

# Interacción *in vitro* entre cepas cubanas de cuatro especies de hongos entomopatógenos

## *In vitro* interaction among Cuban strains of four species of entomopathogenic fungi



<https://cu-id.com/2247/v38e18>

<sup>1</sup>Rolisbel Alfonso de la Cruz<sup>1\*</sup>, <sup>2</sup>Danay Ynfante Mantínez<sup>1</sup>,  
<sup>1</sup>Jersys Arévalo Ortega<sup>1</sup>, <sup>2</sup>Benedicto Martínez Coca<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Carretera de Jamaica y Autopista Nacional. Apdo10. San José de las Lajas. CP32700. Mayabeque. Cuba

<sup>2</sup>Biotor Labs, S.A. Km 108 carretera Panamericana, San Isidro, Nicaragua.

**RESUMEN:** El objetivo del presente trabajo fue evaluar la compatibilidad vegetativa *in vitro* entre cepas cubanas de los hongos entomopatógenos *Lecanicillium lecanii* (Zim.) Zare y Gams, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Isaria fumosorosea* (Wise) Brown y Smith y *Metarhizium anisopliae* (Mestch) Sorokin, previamente seleccionados como agentes de control biológico de insectos nocivos. La compatibilidad se evaluó por el método de Cultivo Dual, y se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). Se clasificó el tipo de interacción de los microorganismos, según la escala recomendada por la literatura. En las pruebas de confrontación realizadas, no se observó proyección de las hifas de ninguna de las especies sobre la otra, lo que sugiere que el efecto de la inhibición del crecimiento fue indirecto, a través de la excreción de metabolitos. En los primeros siete días, se observó inhibición mutua "a distancia" entre *I. fumosorosea* y el resto de los hongos evaluados, y la interacción se clasificó de tipo C, los PICR variaron entre 15,9 - 36,6 %. El crecimiento de *B. bassiana* mostró inhibición además, frente a *L. lecanii* y *M. anisopliae* con PICR de 10,99 % y 17,6 %, respectivamente, y la interacción se clasificó de tipo E. En el resto de las interacciones no se observaron inhibiciones. Todos los hongos resultaron compatibles, por lo que se pueden aplicar combinados para el manejo de insectos plagas.

**Palabras clave:** control biológico, inhibición, compatibilidad.

**ABSTRACT:** The objective of the present work was to evaluate the *in vitro* vegetative compatibility among Cuban strains of the entomopathogenic fungi *Lecanicillium lecanii* (Zim.) Zare and Gams, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Isaria fumosorosea* (Wise) Brown and Smith, and *Metarhizium anisopliae* (Mestch) Sorokin, previously selected as biological control agents for harmful insects. Compatibility was evaluated by the Dual Culture method and the percentage of inhibition of radial growth (PIRG) was determined. The type of interaction of microorganisms was classified according to the scale recommended by the literature. In the confrontation tests carried out, no projection of the hyphae of any of the species onto the other species was observed, suggesting an indirect growth inhibition through the excretion of metabolites. In the first seven days, distant mutual inhibition was observed between *I. fumosorosea* and the rest of the fungi evaluated and the interaction was classified as type C; the PIRG varied between 15.9 - 36.6 %. The growth of *B. bassiana* also showed inhibition against *L. lecanii* and *M. anisopliae* with PIRG of 10.99% and 17.6%, respectively, and the interaction was classified as type E. In the rest of the interactions, no inhibitions were observed. All fungi were compatible so that they can be applied combined with each other in insect pest management.

**Keywords:** biological control, inhibition, compatibility.

En la actualidad, el control de plagas insectiles en cultivos de interés agrícola, se basa fundamentalmente en aplicaciones de plaguicidas químicos, a pesar de lo costoso y perjudicial que resulta para la salud ambiental y humana.

El uso indiscriminado de estos agroquímicos, es la causa directa de la resistencia, y por consiguiente, de la pérdida de su efectividad. Ante esto, es común aumentar dosis y preparar mezclas de varios productos, con frecuencia más tóxicos, por lo que el problema de la resistencia, lejos de solucionarse, se agrava. Además, desencadenan otros efectos, como brotes de plagas secundarias, resurgencia de plagas y disminución de las poblaciones de enemigos naturales (1).

El control biológico surge como una de las alternativas no químicas, que demuestra mayor eficacia en el manejo de plagas (2). El manejo de plagas utilizando patógenos, es una rama del control biológico conocida como control microbiano y hace referencia al uso de microorganismos, tales como, bacterias, nematodos, virus y hongos entomopatógenos. Dentro de este grupo, los hongos entomopatógenos recibieron mayor atención, por la gran variedad de especies y amplio rango de hospederos (3).

Entre las especies de hongos más empleados, debido a su amplio espectro de acción, están *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Mestch) Sorokin, *Nomuraea*

\*Correspondencia a: Rolisbel Alfonso de la Cruz: E-mail: [roly@censa.edu.cu](mailto:roly@censa.edu.cu), [rolisbel93@gmail.com](mailto:rolisbel93@gmail.com)

Recibido: 23/03/2023

Aceptado: 19/04/2023

rileyi, *Lecanicillium lecanii* (Zim.) Zare y Gams e *Isaria fumosorosea* (Wise) Brown y Smith (1). En sus estudios, Lacey *et al.* (4) declararon que estos hongos pueden estar en armonía con las diferentes técnicas utilizadas en el Manejo Integrado de Plagas (MIP) por ello, en los últimos años, la posibilidad de mezcla de cepas o especies se reforzó, lo cual pudiera contribuir a reducir la incidencia de plagas dianas, sin el uso de agroquímicos.

Existen escasos antecedentes sobre aplicaciones conjuntas de hongos controladores; sin embargo, algunos estudios mostraron su eficacia en el control biológico. Elizondo *et al.* (5) en sus investigaciones, obtuvieron resultados alentadores con coaplicaciones de entomopatógenos en el control de *Thrips palmi* Karny. Ríos *et al.* (6) lograron un eficaz control de mosca blanca en el envés de las hojas de lechuga con aplicaciones combinadas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Por otra parte, Canfora *et al.* (7) evidenciaron mayor crecimiento y actividad metabólica de *B. bassiana* y *Beauveria brongniartii* (Sacc.) al aplicarlos de manera conjunta.

El Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) dispone de un cepario de hongos entomopatógenos, que se destacan por su acción biorreguladora de insectos plagas. Sin embargo, se desconocen los efectos de la interacción entre estos hongos, como base para mejorar las estrategias de su aplicación de forma combinada, en el manejo integrado de plagas de interés económico.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la compatibilidad vegetativa *in vitro* entre cepas de las especies *L. lecanii*, *B. bassiana*, *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* (Tabla 1).

El trabajo se realizó en el laboratorio de Micología Vegetal (LMV) del CENSA (Latitud 22,991867 y Longitud -82,153892) ubicado en el municipio de San José de las Lajas, provincia Mayabeque, Cuba.

Los hongos entomopatógenos pertenecientes a la colección del LMV y la cepa LBMa-11 utilizada en los Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE) se reprodujeron previamente en placas Petri de 90 mm de diámetro (Ø) con tentivas de medio Papa Dextrosa Agar (PDA, BioCen) y pH 5,6, e incubados a temperatura de 25±1°C, bajo

régimen de oscuridad constante, en una incubadora (Friocell®) hasta cubrir las 3/4 partes de la placa sin esporular.

La compatibilidad entre cepas se evaluó por el método de Cultivo Dual (CD) descrito por Martínez y Solano (8). El montaje de la técnica se realizó en placas Petri (Ø = 90 mm) que contenían medio de cultivo PDA (BioCen) a pH 5,6. Para ello, se sembraron, a cinco mm del borde de la periferia de la placa Petri, discos de cinco mm de (Ø) diametralmente opuestos, provenientes de la zona de crecimiento activo en la periferia de las colonias puras de los hongos entomopatógenos, crecidas previamente sobre PDA. Se realizaron cinco réplicas por tratamiento (hongo-hongo) y, además, se incluyeron controles de cada uno, sembrados de manera independiente y en igual posición que en el CD. Posteriormente, las placas se incubaron en igual condiciones a las descritas antes.

Las evaluaciones se realizaron cada 24 horas, midiendo el crecimiento micelial con una regla milimetrada hasta que hicieran contacto, y se determinó el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) según la fórmula de Samaniego *et al.* (9):

$$PICR = \frac{(R1 - R2)}{R1 \times R2}$$

Donde, R1 es el crecimiento radial del hongo en el tratamiento control y R2 es el crecimiento radial del hongo en el cultivo dual.

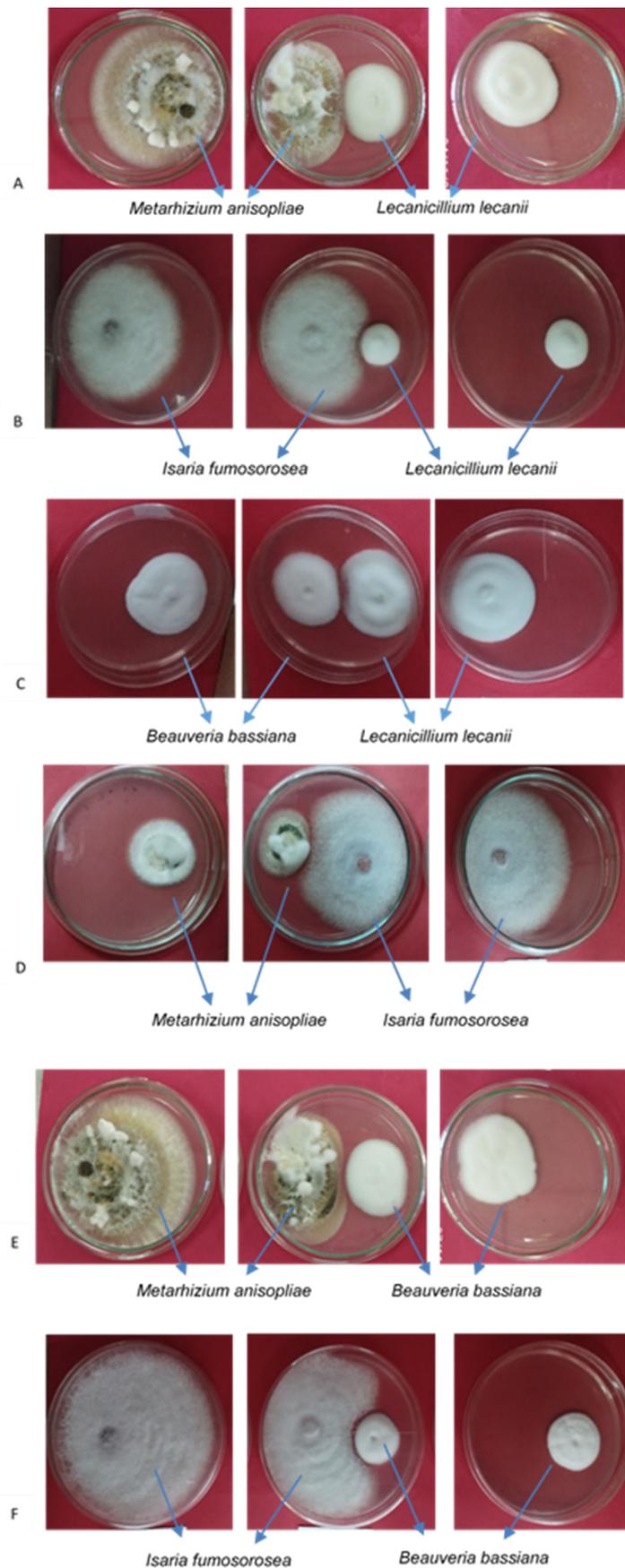
El tipo de interacción, entre los microorganismos, se clasificó según la escala propuesta por Magan y Lacey (10). Se tomaron imágenes de las colonias, utilizando una cámara digital Cannon.

Los hongos entomopatógenos mostraron un crecimiento compatible muy similar hasta el día 15, con respecto a los controles; a partir de ese día, se observó una tendencia a la disminución del crecimiento, sin que se detectaran fenómenos de invasión del espacio colonizado por las especies opuestas. Estos resultados concuerdan con lo informado por Elósegui *et al.* (11) cuando evaluaron la compatibilidad entre los entomopatógenos *B. bassiana*, *L. lecanii* y *M. anisopliae*.

Según señalaron Franco-Chávez *et al.* (12) esto pudiera relacionarse con el hecho de que los hongos entomopatógenos producen metabolitos que son usados para inhibir y degradar el crecimiento y la pared celular de los hongos fitopatógenos. En estudios preli-

**Tabla 1.** Detalles sobre la denominación y otros elementos referidos a las cepas seleccionadas para el estudio de compatibilidad / Details on the name and other elements referring to the strains selected for the study on compatibility.

Entomopatógenos	Código	Hospedante/origen	Dianas
<i>L. lecanii</i>	VI01	Pústulas de roya ( <i>Hemileia vastatrix</i> Berk. & Br.) en café ( <i>Coffea arabica</i> L.)	Moscas blancas, áfidos, escamas,cochinilla, garrapata
<i>B. bassiana</i>	Bb03	<i>Diabrotica</i> spp. en soya ( <i>Glycine max</i> L.)	Trip, mosca blanca, pulgón, araña roja, cri-somélidos,picudos
<i>M. anisopliae</i>	LBMa-11	El gusano falso medidor ( <i>Mocis latipes</i> Guenée)	Coleópteros, chinches, lepidópteros, tisanó- pteros
<i>I. fumosorosea</i>	I01	Desconocido	Mosca blanca, trips, ácaros



**Figura 1.** Interacción entre los agentes entomopatógenos. A, C, E, (interacción a los 17 días) B, D, F (interacción a los siete días)./ *Interaction between entomopathogenic agents. A, C, E, (interaction at 17 days) B, D, F (interaction at seven days).*

minares, Barranco *et al.* (13) observaron una acción inhibitoria en la prueba de antagonismo entre el hongo entomopatogénico *L. lecanii* y el hongo *Oidium* sp. conocido comúnmente como cenicilla del durazno, sugiriendo que *L. lecanii* produce metabolitos o enzimas que afectan e inhiben la biosíntesis de la pared celular del patógeno.

El crecimiento de *B. bassiana* mostró inhibición frente a *L. lecanii* y *M. anisopliae* y la interacción se clasificó de tipo E, siendo una inhibición a distancia, donde la especie inhibitoria continuó su crecimiento sobre el halo producido y la colonia de *B. bassiana* creció a una tasa reducida, en comparación al control. En el resto de las interacciones no se observó inhibición (Tabla 2).

**Tabla 2.** Porcentajes de inhibición y tipo de interacción entre cepas cubanas de hongos entomopatogénicos en Cultivo Dual./ Percentages of inhibition and type of interaction between entomopathogenic fungi in Dual Culture.

Entomopatogénicos	Porcentajes de inhibición y tipo de interacciones							
	<i>L. lecanii</i>		<i>B. bassiana</i>		<i>M. anisopliae</i>		<i>I. fumosorosea</i>	
	PICR (%)	Interacción	PICR (%)	Interacción	PICR (%)	Interacción	PICR (%)	Interacción
<i>Lecanicillium lecanii</i>	*		-		-		22,5	C
<i>Beauveria bassiana</i>	10,98	E	*		17,6	E	18,7	C
<i>Metarhizium anisopliae</i>	-		-		*		28,5	C
<i>Isaria fumosorosea</i>	31,68	C	36,6	C	15,9	C	*	

En las primeras evaluaciones no se evidenció afectación del crecimiento de los hongos; manteniéndose estable. Estos datos sugieren que las cepas de estos microorganismos pueden combinarse o estar en mezclas duales en formulados, si se tiene en cuenta que la germinación y la penetración, a través de la cutícula del insecto, conjuntamente, son eventos claves tempranos para lograr la patogenicidad.

A partir de los 17 días de evaluación, no se observó crecimiento adicional de ninguna de las colonias de las especies en los co-cultivos, aspecto que sugiere una aceptación en un mismo nicho y/o espacio de tiempo.

En los cultivos duales de *Lecanicillium lecanii*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea* se presentó una interacción del tipo inhibición mutua a distancia. Todos los hongos resultaron compatibles, por lo que se sugiere continuar los estudios con estos entomopatogénicos para utilizarlos juntos en el manejo de insectos plagas, como una alternativa agroecológica y compatible con el medio ambiente.

## REFERENCIAS

- Pacheco Hernández MDL, Reséndiz Martínez JF, Arriola Padilla VJ. Organismos entomopatogénicos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México: una revisión. RMCF. 2019;10(56). DOI: [10.29298/rmcf.v10i56.496](https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i56.496)
- Mantzoukas S, Eliopoulos PA. Endophytic entomopathogenic fungi: A valuable biological control tool against plant pests. Applied Sciences. 2020;10(1):360. DOI: [10.3390/app10010360](https://doi.org/10.3390/app10010360)
- Russo ML. Hongos entomopatogénicos: colonización endofítica y control de insectos plaga en cultivos agrícolas [Tesis Doctoral]. Argentina: Universidad Nacional de La Plata; 2017.
- Lacey LA, Horton DR, Unruh TR, Pike K, Márquez M. Control biológico de plagas de papas en Norteamérica. In: 2001 Washington State Potato Conference and Trade Show “Taller en Español sobre la producción de papas.” [Internet]. USA: Washington State University; 2001 [cited 2023 Apr 1]. Available from: <http://aenew.s.wsu.edu/May01AENews/Spanish-Potato.html>
- Elizondo AI, Murguido C, Elósegui O, Matienzo Y, Massó E. Nuevas tácticas para el manejo integrado de *Thrips palmi* Karny en el cultivo de la papa. Fitosanidad. 2008;4(2):102–9.
- Ríos R, Vargas-Flores J, Sánchez-Choy J, Olivares Paredes R, Alarcón-Castillo T, Villegas P. *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* como controladores compatibles y eficientes de insectos plaga en cultivos acuapónicos. Scientia Agropecuaria. 2020;11(3):419–26. DOI: [10.17268/sci.agropecu.2020.03.14](https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.14)
- Canfora L, Abu-Samra N, Tartanus M, Łabanowska BH, Benedetti A, Pinzari F, et al. Co-inoculum of *Beauveria brongniartii* and *B. bassiana* shows *in vitro* different metabolic behaviour in comparison to single inoculums. Scientific Reports. 2017;7(1):1–15. DOI: [10.1038/s41598-017-12700-0](https://doi.org/10.1038/s41598-017-12700-0)
- Martínez B, Solano T. Antagonismo de *Trichoderma* spp. frente a *Alternaria solani* (Ellis & Martin) Jones y Grout. Revista de Protección Vegetal. 1995;10(3):221–5.
- Samaniego G, Ulloa S, Herrera S. Hongos del suelo antagonistas de *Phymatotrichum omnivorum*. Revista Mexicana de Fitopatología [Internet]. 1989;7(1):86–95. Available from: <https://biblat.unam.mx/es/revista/revista-mexica->

- [na-de-fitopatologia/articulo/hongos-del-suelo-antagonicos-de-phymatotrichum-omnivorum](#)
10. Magan N, Lacey J. Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. Transactions of the British Mycological Society. 1984;82(1):83–93. DOI: [10.1016/S0007-1536\(84\)80214-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(84)80214-4)
  11. Elósegui O, Elizondo AI. Evaluación microbiológica *in vitro* de mezclas de especies de hongos entomopatógenos ingredientes activos de bioplaguicidas cubanos. Fitosanidad. 2010;14(2): 103–9.
  12. Franco-Chávez KGF, Cruz HM, Mayagoitia JFC, Cruz VHM. Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente. 2014;(23): 143–60.
  13. Barranco E, Bustamante P, Mayorga-Reyes L, González R, Martínez P, Azola A.  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase production by *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* ATCC 26854 by solid-state fermentation utilizing shrimp shell. Interciencia. 2009;34(5):356–60.

**Declaración de conflicto de intereses:** Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

**Contribución de los autores:** Rolisbel Alfonso de la Cruz: **Conceptualización, metodología, análisis formal, investigación, validación, visualización, redacción del borrador original, redacción (revisión y edición).** Danay Ynfante Martínez: **Metodología, investigación, validación, redacción (revisión y edición).** Jersys Arévalo Ortega: **Metodología, investigación, validación, visualización, análisis formal, redacción (revisión y edición).** Benedicto Martínez Coca: **Metodología, supervisión, redacción (revisión y edición).**

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)