

# Contenido

---

## Diagnóstico fitosanitario

**Detección de  $\beta$ -exotoxina por HPLC en cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* por HPLC** 255  
Yamilé Baró Robaina, Cecilia Linares Jiménez y Gonzalo Dieksmeier Corcuera

**Diagnóstico de fitonematodos en suelos de cultivos frutales** 261  
Raúl Hernández Hernández, Gladis del Vallín y Doris Hernández

**Aislamiento, identificación y caracterización morfológica de aislados nativos de hongos mitosporicos nativos con potencialidad para el control de especies de insectos plaga** 265  
Orestes Elósegui Claro, Jesús Jiménez Ramos y Aidanet Carr Pérez

## Ecología

**Dispersión, distribución actual y nuevos reservorios de *Frankliniella schultzei* Trybom (Thysanoptera: Thripidae) en Cuba** 273

Santiago F. Jiménez Jiménez, Liuva Pérez López, Martha Toro, Criseida Granda, Amelia Mateo, Héctor Sariol, Elisa Rodríguez, Rodney Pérez, Roquelina Jiménez, Ángel Pérez-Alejo y Ransés Vázquez

**Variabilidad de las isoenzimas estererasas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin** 279  
María E. Estrada Martínez y Dolores Piñón Gómez

## Control biológico

**Un medio simplificado a base de soya más azúcar turbinada de caña para la producción del hongo acaropatógeno *Hirsutella nodulosa* Petch en fase líquida** 285  
Reinaldo I. Cabrera, Marlén Vega y Litzzy Ayra

**Estudio del efecto protector de *Bacillus* spp. sobre el desarrollo de la pudrición blanda de la papa (*Solanum tuberosum* L.)** 289  
Yaritza Reinoso Pozo, Luis Casadesús Romero, Armando García Suárez, Ernesto García Pérez y Victoria Pazos Álvarez-Rivera

**Producción de biomasa de *Trichoderma harzianum* por fermentación líquida** 295  
Rosaima García, María A. Durán y Ramón Riera

## Reseña

**Caracterización de *Ralstonia solanacearum* a través del estudio de su diversidad genética** 299  
Yelaine Tejeda Gómez

## Comunicación corta

**Primer registro de cecidómido asociado a síntomas de roya en plantas medicinales en Cuba** 305  
Marlene M. Veitía Rubio, Víctor M. García Infante, Danay López Manes y María O. López Mesa

**Observaciones sobre enemigos naturales de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) en Cuba** 307  
Luis L. Vázquez Moreno, Eleazar Blanco Jiménez, Orestes Elósegui Claro, Yaril Matienzo Brito y Janet Alfonso Simonetti

## Resumen de tesis

**Diagnóstico y saneamiento del Virus Dasheen Mosaic en malanga (*Xanthosoma* spp. y *Colocasia esculenta* (L.) Schott)** 309  
Janet Igarza Castro

**Comportamiento y control de la enfermedad tizón de fuego causada por el hongo *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. en el cultivo del pepino (*Cucumis sativus* L.) en sistemas de organopónicos en la provincia de Camagüey y su relación con otros patógenos fúngicos presentes en el cultivo** 310  
Carlos A. Ferrer González

# Contents

---

## Phytosanitary diagnosis

- Detection of  $\beta$ -Exotoxin by HPLC in Native Strains of *Bacillus thuringiensis*** 255  
Yamilé Baró Robaina, Cecilia Linares Jiménez and Gonzalo Dieksmeier Corcuera

- Phytonematodes Diagnosis on Fruit Crop Soils** 261  
Raúl Hernández Hernández, Gladis del Vallín and Doris Hernández

- Isolation, Identification and Morphometric Characterization of Native Mitosporic Fungi with Potential for the Control of Pest Insects Species** 265  
Orestes Elósegui Claro, Jesús Jiménez Ramos and Aidanet Carr Pérez

## Ecology

- Dispersion, Present Distribution and New Reservoirs of *Frankliniella schultzei* Trybom (Thysanoptera: Thripidae) in Cuba** 273

Santiago F. Jiménez Jiménez, Liuva Pérez López, Martha Toro, Criseida Granda, Amelia Mateo, Héctor Sariol, Elisa Rodríguez, Rodney Pérez, Roquelina Jiménez, Ángel Pérez-Alejo and Ransés Vázquez

- Variability of Esterase Isoenzymes from *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin** 279  
María E. Estrada Martínez and Dolores Piñón Gómez

## Biological control

- A Simplified Medium Based on Soy and Unrefined Sugar Cane for Liquid Phase Production of Fungus *Hirsutella nodulosa* Petch Pathogen to Mites** 285  
Reinaldo I. Cabrera, Marlén Vega and Litzy Ayra

- Study of Protective Effect of *Bacillus* spp. on the Development of Potato Soft Rot (*Solanum tuberosum* L.)** 289  
Yaritza Reinoso Pozo, Luis Casadesús Romero, Armando García Suárez, Ernesto García Pérez and Victoria Pazos Álvarez-Rivera

- Production of *Trichoderma harzianum* Biomass by Liquid Fermentation** 295  
Rosaima García, María A. Durán and Ramón Riera

## Review

- Characterization of *Ralstonia solanacearum* by the Study of its Genetic Diversity** 299  
Yelaine Tejeda Gómez

## Short communication

- First Record of Cecidomide Associate with Rust Symptoms in Cuban Medicinally Plants** 305  
Marlene M. Veitía Rubio, Víctor M. García Infante, Danay López Manes and María O. López Mesa

- Observations on Natural Enemies of Coffee Berry Borer (*Hypothenemus hampei* Ferrari) in Cuba** 307  
Luis L. Vázquez Moreno, Eleazar Blanco Jiménez, Orestes Elósegui Claro, Yaril Matienzo Brit and Janet Alfonso Simonetti

## Thesis abstract

- Diagnostic and Sanitation of Dasheen Mosaic Virus in *Xanthosoma* spp. and *Colocasia esculenta* (L.) Schott** 309  
Janet Igarza Castro

- Behavior and Control of Fire Blight Disease Caused by Fungus *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. in Cucumber Crop (*Cucumis sativus* L.) in Organoponic Systems of Camagüey Province and its Relation with others Fungi Pathogens Present in the Crop** 310  
Carlos A. Ferrer González

## DETECCIÓN DE $\beta$ -EXOTOXINA EN CEPAS NATIVAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* POR HPLC

Yamilé Baró Robaina, Cecilia Linares Jiménez y Gonzalo Dieksmeier Corcuera

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.<sup>a</sup> B y 5.<sup>a</sup> F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, ybaro@inisav.cu

### RESUMEN

Se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) la presencia de  $\beta$ -exotoxina en nueve cepas de *Bacillus thuringiensis*, pertenecientes a la colección del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. La concentración de  $\beta$ -exotoxina en el patrón fue de 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , y en el producto comercial empleado como control positivo fue de 6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . En las cepas evaluadas solo la LBT9 y LBT47 mostraron la presencia de este metabolito a concentraciones de 34 y 4,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivamente.

Palabras claves: *Bacillus thuringiensis*,  $\beta$ -exotoxina, cromatografía líquida (HPLC), detección

### ABSTRACT

The presence of  $\beta$ -exotoxin in nine *Bacillus thuringiensis* strains belonging to Plant Health Research Institute collection was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC).  $\beta$ -exotoxin concentration in the standard was 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , and in a commercial product, used as positive control, was 6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .  $\beta$ -exotoxin was only detected in LBT9 with 34  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and LBT47 with 4.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , among the strains proved.

Key words: *Bacillus thuringiensis*,  $\beta$ -exotoxin, liquid chromatography (HPLC), detection

### INTRODUCCIÓN

Algunas cepas de *Bacillus thuringiensis* producen además de la  $\delta$ -endotoxinas o proteínas Cry una exotoxina termoestable denominada  $\beta$ -exotoxina, la cual se secreta al medio de cultivo al inicio del proceso de esporulación. Esta molécula es un análogo nucleotídico de ADN con un peso molecular de 701 Da y se le atribuye acción insecticida contra diferentes órdenes de insectos como Lepidópteros, Dípteros, Coleópteros, Hemípteros, además de ácaros, nematodos, protozoarios y platelmintos [Hernández *et al.*, 2003].

Diversos métodos como la cromatografía de intercambio iónico, electroforesis capilar, ELISA y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se han descrito para la determinación de la  $\beta$ -exotoxina, como alternativas al bioensayo tradicional con *Musca domestica*, el cual resulta más trabajoso, prolongado en el tiempo y presenta algunas limitaciones como estimaciones inexactas de la potencia de la toxina impura y

poca reproducibilidad. De todos estos métodos la RP-HPLC se emplea más frecuentemente para la detección y cuantificación de este metabolito [Gohar y Perchat, 2001].

El presente trabajo tuvo como objetivo detectar y cuantificar la presencia de la  $\beta$ -exotoxina en nueve cepas cubanas de *Bacillus thuringiensis*.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Como material biológico se emplearon nueve cepas de *B. thuringiensis* pertenecientes a la colección del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, las cuales se seleccionaron de acuerdo con su serotipo flagelar, y la toxicidad exhibida en el sobrenadante del cultivo esterilizado a 121°C frente a un grupo de organismos plaga (Tabla 1).

El estándar de  $\beta$ -exotoxina I lo suministró el doctor Jorge Ibarra (Laboratorio de Bioinsecticidas del Centro de

Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional de México), obtenido a partir de la cepa HD2 Berliner *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. La concentración final de la solución de  $\beta$ -exotoxina I inyectada en el HPLC fue de  $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Como control positivo se utilizó un producto comercial ruso que contiene  $\beta$ -exotoxina, producido a partir de una cepa de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*, y como control negativo se tomó la cepa HD1, estándar internacional de *B. thuringiensis* que no produce  $\beta$ -exotoxina.

**Tabla 1. Serotipos de las cepas en estudio [Fernández-Larrea, 1999]**

Cepas	Serotipo
LBT-4	<i>kenyae</i> (H4)
LBT-5	<i>thuringiensis</i> (H1)
LBT-7	<i>kenyae</i> (H4)
LBT-9	<i>thuringiensis</i> (H1)
LBT-12	<i>thuringiensis</i> (H1)
LBT-13	no determinado
LBT-16	<i>thuringiensis</i> (H1)
LBT-25	<i>israelensis</i> (H14)
LBT-47	no determinado

Las cepas se cultivaron en medio caldo triptona soya, en zaranda orbital a  $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  a una temperatura de crecimiento de  $30^\circ\text{C}$  durante 48 h hasta que se completó el proceso de esporulación.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación el cultivo se centrifugó  $10\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  en centrifuga refrigerada durante 20 min. El precipitado se descartó y el sobrenadante se trató en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 min. El pH de las muestras se ajustó a 3 con ácido fosfórico 85%. El sobrenadante se clarificó por centrifugación a  $10\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  y se guardó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso.

El proceso de separación se realizó según Levinson *et al.* (1990), para lo que se utilizó una columna LiChrospher RP-18 de fase reversa. La corrida se efectuó a  $30^\circ\text{C}$  en 50 milimoles  $\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 3) a una velocidad de flujo de  $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , con detección a 260 nm. El volumen de inyección fue de  $100 \mu\text{L}$ . Se empleó un detector UV, inyector Rheodyne 7725i, bomba water 0,01A. Para el análisis de los cromatogramas se utilizó el *software* EZChrom versión 6.8.

Con el objetivo de evaluar si la  $\beta$ -exotoxina se eliminaba durante el procesamiento de la muestra, se adicio-

naron  $100 \mu\text{L}$  de  $\beta$ -exotoxina estándar a la cepa LBT5 de *B. thuringiensis* una vez iniciado el crecimiento del microorganismo y concluido su desarrollo. La cromatografía se desarrolló en las condiciones descritas anteriormente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

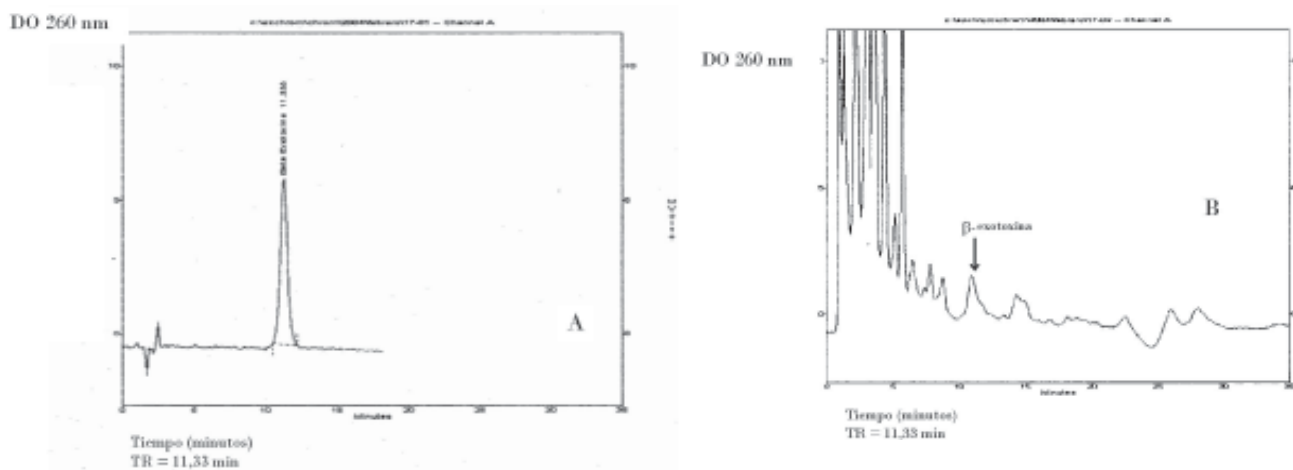
Según los cromatogramas obtenidos en la detección de  $\beta$ -exotoxina para las cepas en estudio, se observó el pico correspondiente al patrón de  $\beta$ -exotoxina estándar a una concentración de  $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Fig. 1(A)). El pico que se observa en la muestra patrón apareció a un tiempo de retención de 11,33 min. El mismo pico apareció en la muestra correspondiente al producto comercial ruso a base de  $\beta$ -exotoxina, cepa utilizada como testigo positivo. Su concentración fue de  $6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Fig. 1(B)). La exotoxina no se detectó en la cepa HD1 estándar internacional de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Fig. 2), la cual no produce esa exotoxina [Galán *et al.*, 1994; Glare y Callaghan, 2000].

En el resto de las cepas en estudio, solo se observó el pico correspondiente a la  $\beta$ -exotoxina en las cepas LBT9 (Fig. 3(A)) y LBT47 (Fig. 3(B)). Los niveles de producción del metabolito en estas cepas fueron de 34 y  $4,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivamente. En la cepa LBT7 también se observó la presencia de un pico que pudiera corresponder a la  $\beta$ -exotoxina, ya que presenta uno similar al del patrón y un tiempo de retención muy cercano.

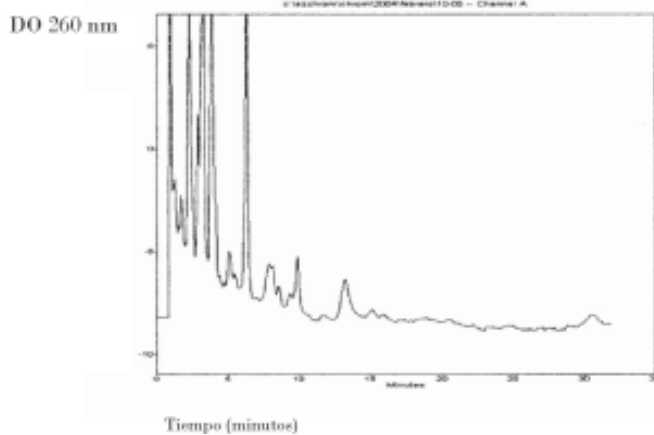
Las cepas evaluadas presentan serotipos que están informados en la literatura como productores de la  $\beta$ -exotoxina [Galán *et al.*, 1994; Glare y Callaghan, 2000]; sin embargo, estos resultados reafirman lo obtenido por Levinson *et al.* (1990) y Hernández y Ferré (2001), los cuales mostraron que la producción de la exotoxina termoestable es más una propiedad específica de la cepa de *B. thuringiensis* que una propiedad serotipo específica. Se ha probado además que su presencia en una cepa en particular no implica la producción de la exotoxina por otras cepas pertenecientes al mismo serovar.

Aunque los estudios que relacionan la producción de la  $\beta$ -exotoxina y el tipo de serovar que presenta la cepa de *B. thuringiensis* son muy escasos, y en la mayoría de ellos se incluyen muy pocas cepas, algunos autores plantean que la producción de  $\beta$ -exotoxina está limitada a ciertos serotipos flagelares presentes en las cepas de *B. thuringiensis* [Hernández y Ferré, 2001].

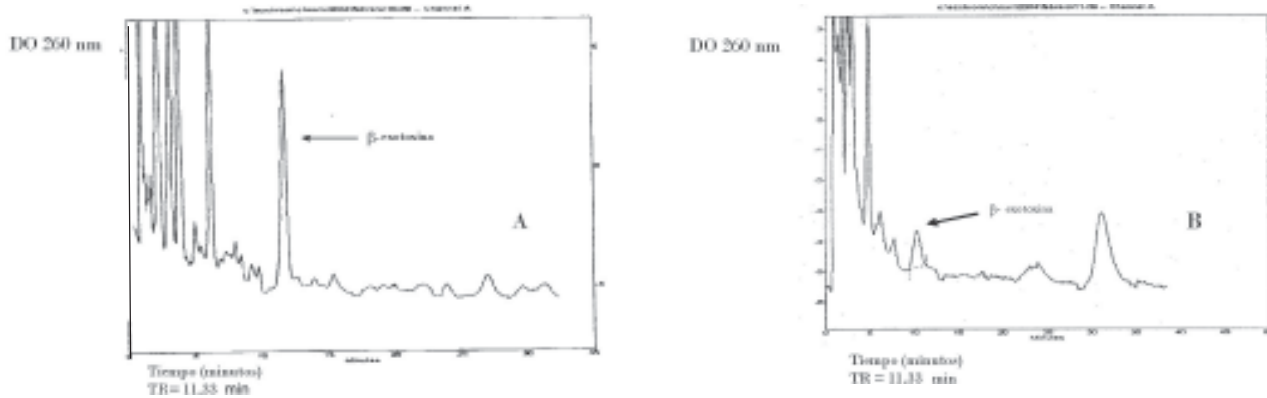
*Detección de  $\beta$ -exotoxina en cepas...*



*Figura 1.* Cromatogramas obtenidos para el patrón de  $\beta$ -exotoxina ( $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (A) y para el producto comercial ( $6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (control positivo) (B). Columna LiChrospher RP-18, 5 mm ( $250 \times 4,6$  mm), flujo  $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda$  260 nm, volumen de inyección  $100 \mu\text{L}$ , fase móvil  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 3,0.



*Figura 2.* Cromatograma obtenido por HPLC para la cepa HD1 (control negativo). Columna LiChrospher RP-18, 5 mm ( $250 \times 4,6$  mm), flujo  $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda$  260 nm, volumen de inyección  $100 \mu\text{L}$ , fase móvil  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 3,0.



*Figura 3.* Cromatogramas obtenidos por HPLC para las cepas LBT9  $34 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (A) y LBT47  $4,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (B). Columna LiChrospher RP-18, 5 mm ( $250 \times 4,6$  mm), flujo  $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $\lambda$  260 nm, volumen de inyección  $100 \mu\text{L}$ , fase móvil  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 3,0.

La clasificación de las cepas de *B. thuringiensis* en serovares se desarrolló sobre la base de los antígenos flagelares; sin embargo, las bases genéticas y bioquímicas del sistema de antígenos flagelares aún son desconocidas. Esto hace especialmente difícil encontrar una relación directa entre los genes determinantes del serovar y otros genes en *B. thuringiensis*, como los que determinan la síntesis de  $\beta$ -exotoxina [Hernández *et al.*, 2003]. En este estudio no fue posible establecer esta relación debido a que se emplearon muy pocas cepas, y las dos que resultaron positivas pertenecen a serotipos diferentes.

En estudios previos realizados en el Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal se demostró que el sobrenadante de cultivos obtenidos a partir de las cepas estudiadas en este trabajo, y esterilizado a 121°C, presentaron actividad tóxica contra un grupo de organismos plaga como ácaros y nematodos [Márquez *et al.*, 1999; 2003]; sin embargo, resulta interesante destacar que no pudo observarse en cada una de ellas el pico correspondiente a la  $\beta$ -exotoxina. Estos resultados pudieran tener explicación con lo afirmado por Levinson *et al.* (1990) en cuanto a que los patrones de aparición de la exotoxina termoestable sugieren que puede estar involucrado solo un único gen. La producción de exotoxina puede ser resultado de una sola reacción enzimática, a partir de moléculas precursoras presentes tanto en las cepas Exo<sup>+</sup> como Exo<sup>-</sup>. Es probable que estos precursores estén involucrados en el control de la transcripción de los genes de la esporulación y no

como sugirieron Johnson y Peterson (1983) en la producción de la exotoxina, lo que implicaría que la  $\beta$ -exotoxina no se produzca por todas las cepas de *B. thuringiensis*.

Otra explicación a la no detección del metabolito en las restantes cepas pudo deberse también a niveles de concentración bajos en el medio de fermentación, a lo cual se suma la presencia de moléculas contaminantes en la solución que hace difícil su determinación. Oehler *et al.* (1982) emplearon una columna C<sub>18</sub> y como fase móvil H<sub>2</sub>O y ácido trifluoroacético; sin embargo, el método no dio resultado debido a que los contaminantes del sobrenadante del cultivo de *B. thuringiensis* coelúan con la toxina, lo cual se considera que también pudo ocurrir en los resultados presentes. Debido a esto y a su pequeña masa molecular, la utilización de un método altamente eficiente en el proceso de obtención de la exotoxina constituye un proceso clave para el recobrado y purificación de la  $\beta$ -exotoxina.

La adición de  $\beta$ -exotoxina estándar durante el proceso de crecimiento de la cepa LBT 5 dio como resultado la presencia del pico correspondiente a la  $\beta$ -exotoxina a concentraciones de 0,42  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y 35,8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figs. 4(A) y (B)). Esto indica que la  $\beta$ -exotoxina no se pierde durante el proceso de obtención previo a la cromatografía. La adición de  $\beta$ -exotoxina estándar a un grupo de cepas en estudio también la utilizaron Gohar y Perchat (2001) para corroborar la presencia de la toxina. A este procedimiento se le denominó *método del testigo externo*.

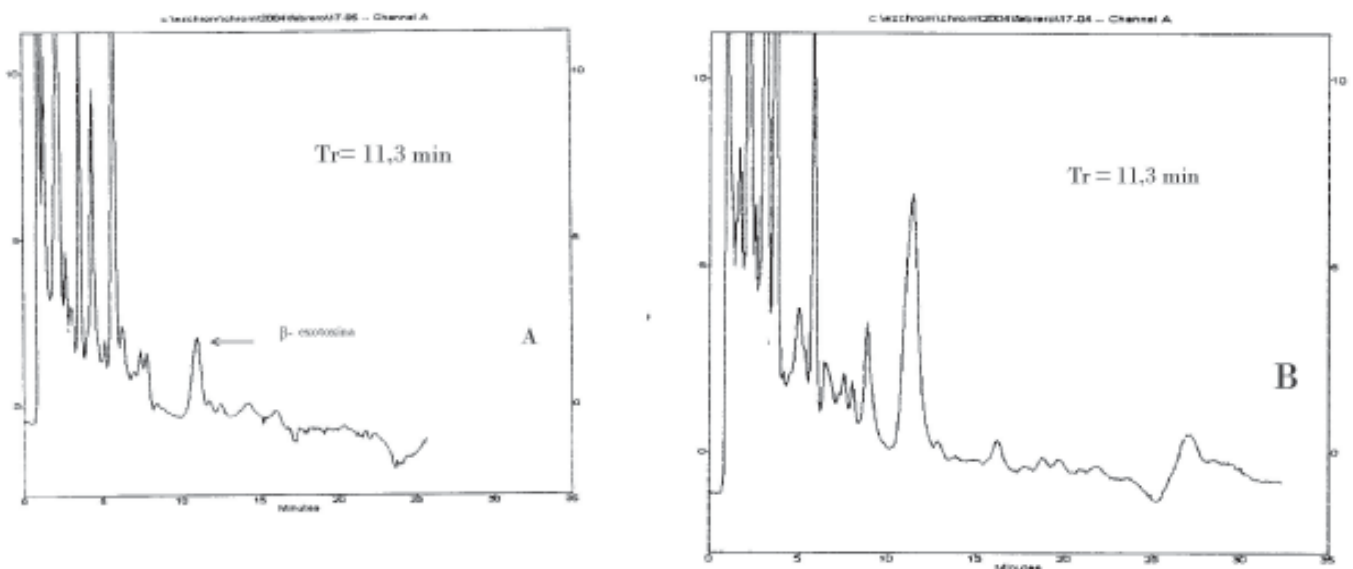


Figura 4. Cromatogramas de la cepa LBT5 contaminada con  $\beta$ -exotoxina estándar al inicio del cultivo (A) y una vez concluido el procesamiento de la muestra (B). Columna LiChrospher RP-18, 5 mm (250 x 4,6 mm), flujo 2 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>,  $\lambda$  260 nm, volumen de inyección 100  $\mu\text{L}$ , fase móvil KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 3,0.

Otra explicación a la ausencia del pico típico de la  $\beta$ -exotoxina en las cepas LBT4, LBT5, LBT7, LBT12, LBT13, LBT16 y LBT25 es la presencia de una segunda exotoxina denominada *tipo II*, la cual se produce a concentraciones mucho más bajas que la  $\beta$ -exotoxina tipo I. Este resultado fue corroborado por Levinson *et al.* (1990) al identificar la  $\beta$ -exotoxina tipo I en un grupo de cepas de *B. thuringiensis*; sin embargo, no se pudo detectar en una cepa de *B. thuringiensis* var. *morrisoni*, que exhibió actividad tóxica en el sobrenadante esterilizado a 121°C contra *Musca domestica*, *Diabotrica undecimpunctata* y *Leptinotarsa decemlineata*. El análisis realizado por estos autores dio como resultado la identificación de este nuevo tipo de exotoxina. Esta molécula es menos hidrofóbica y se sugiere que sea un análogo de uracilo de la exotoxina tipo I [Levinson *et al.*, 1990].

La existencia de esta toxina aclaró resultados confusos y contradictorios reportados en la literatura. Igualmente Gohar y Perchat (2001) lograron identificar la exotoxina tipo II al emplear RP-HPLC, pero con la utilización previa de precipitación con solventes orgánicos y una cromatografía de intercambio aniónico. Estos autores confirman que resulta de vital importancia la preparación previa de la muestra para la detección y cuantificación de este metabolito, e indican que una alternativa promisoría sería la utilización de detección fluorescente en lugar de absorción UV, lo que incrementaría ampliamente la sensibilidad y la selectividad de la determinación.

## CONCLUSIONES

- Se detectó la presencia de  $\beta$ -exotoxina en las cepas LBT9 y LBT47 a concentraciones de 34  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y 4,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivamente.

## REFERENCIAS

- Fernández-Larrea, O.: «Aislamiento, selección y estudio de cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control fitosanitario». Informe Final PNCT, Biotecnología Agrícola, INISAV, Cuba, 1999.
- Galán, W.; K. Arévalo: «Uso de un método sencillo para detección de  $\beta$ -exotoxina en cepas de *Bacillus thuringiensis*», *South Western Entomologist* 19 (4):385-390, 1994.
- Glare, T.; M. Callaghan: *Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety*, Eds. John Wiley and Sons, 2000.
- Gohar, M.; S. Perchat: «Sample Preparation for  $\beta$ -Exotoxin Determination in *Bacillus thuringiensis* Cultures by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography», *Anal. Biochem.* 298:112-117, 2001.
- Hernández, C.; C. Martínez; H. Porcar; J. Ferré: «Correlation Between Serovars of *Bacillus thuringiensis* and Type I  $\beta$ -Exotoxin Production», *J. Invertebr. Pathol.* 82:57-62, 2003.
- Hernández, C.; J. Ferré: «Target-Thiéry Update on the Detection of  $\beta$ -Exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by HPLC Analysis», *J. Appl. Microbiol.* 90:643-647, 2001.
- Johnson, D.; R. Peterson: «Limitations of HPLC for the Detection of  $\beta$ -Exotoxin in Cultures Filtrate of *Bacillus thuringiensis*», *European Journal of Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17:231-234, 1983.
- Levinson, B.; K. Kasyan; S. Chiu; T. Curier; J. González: «Identification of  $\beta$ -Exotoxin Production, Plasmids Encoding  $\beta$ -Exotoxin, and a New Exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by Using High Performance Liquid Chromatographic», *J. Bacteriol.* 172:3172-3179, 1990.
- Márquez, María E.; Orietta Fernández-Larrea; Lérida Almaguel: «Producción y evaluación de cultivos de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) con efecto acaricida sobre *P. latus* (Banks.) (Acarina: Tarso-nemidae)», *Fitosanidad.* 3 (3):53-58, 1999.
- Márquez, María E.: «Actividad nematocida de cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Meloidogyne incognita* en Cuba» Tesis en opción al título académico de Maestro en Microbiología General, Universidad de La Habana, 2003.
- Oehler, D.; R. Gingrich; M. Haufler: «High Performance Liquid Chromatographic Determination of  $\beta$ -Exotoxin Produced by the Bacterium *Bacillus thuringiensis*», *J. of Agric. Food Chem.* 30:407-408, 1982.



## DIAGNÓSTICO DE FITONEMATODOS EN SUELOS DE CULTIVOS FRUTALES

Raúl Hernández Hernández<sup>1</sup>, Gladis del Vallín<sup>2</sup> y Doris Hernández<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.<sup>a</sup> B y 5.<sup>a</sup> F, Playa, Ciudad de La Habana, [rhernandez@inisav.cu](mailto:rhernandez@inisav.cu)

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Ave 7.<sup>a</sup> no. 3005 e/ 30 y 32, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11300

### RESUMEN

Se diagnosticaron campos agrícolas en fase de presiembra para conocer los principales géneros de nematodos en suelos previamente sembrados de piña (*Ananas comosus* Lin. Merr.), papaya (*Carica papaya* Lin.), guayaba (*Psidium guajava* Lin.), aguacate (*Persea americana* Lin.), mango (*Mangifera indica* Lin.) y uva (*Vitis vinifera* Lin.) de las provincias de Ciudad de La Habana, La Habana, Ciego de Ávila, Matanzas y el municipio especial de Isla de la Juventud. Para la extracción de los nematodos móviles se utilizó el método de Baermann, mientras el índice de infestación del suelo con el nematodo de las agallas se valoró mediante la prueba de la planta indicadora con la contribución de los agricultores. En todas las muestras de suelo y raíces se observaron nematodos parásitos de plantas con diversos niveles de densidad de población. Los géneros detectados con mayor frecuencia fueron *Meloidogyne Goeldi* (100%), *Rotylenchulus Linford & Oliveira* (72%), *Helicotylenchus Steiner* (33%) y *Pratylenchus Filipjev* (22%). Las mayores densidades de población se correspondieron con los suelos que anteriormente habían sido cultivados con guayaba.

Palabras claves: *Meloidogyne*, *Rotylenchulus*, *Helicotylenchus*, *Pratylenchus*, guayaba, piña

### ABSTRACT

Pre sowing agricultural fields which were planted with fruits as pineapple (*Ananas comosus* Lin. Merr.), papaya (*Carica papaya* Lin.), guava (*Psidium guajava* Lin.), avocado (*Persea americana* Lin.), mango (*Mangifera indica* Lin.) and grape fruit (*Vitis vinifera* Lin.) from four provinces of Cuba and especial county Isla de la Juventud, were nematologically assayed in vitro, to know current status of nematodes main genera. Motile nematodes extraction was achieved by using Baermann method, while root-knot nematodes soil infestation was valorised with indicator plant test and farmers contribution. Different population densities of plant-parasites nematodes were detected in all soil and roots samples. Most frequently nematodes were *Meloidogyne Goeldi* (100%), *Rotylenchulus Linford & Oliveira* (72%), *Helicotylenchus Steiner* (33%) y *Pratylenchus Filipjev* (22%). Soils before cultivated with guava showed the highest nematode population.

Key words: *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Rotylenchulus*, *Helicotylenchus*, guava, pineapple

### INTRODUCCIÓN

En la agricultura cubana actual se incrementa el fomento y la diversificación de frutales, pero para lograr cosechas productivas y consistentes es necesario enfrentarse a las plagas desde el vivero o ya en la plantación. Entre ellas se encuentran los nematodos parásitos que pueden ocasionar pérdidas de rendimiento entre 10 y 30% en los cultivos susceptibles [Fernández, 1991; INIFAP, 2002].

El fruticultor debe valerse del diagnóstico nematológico para conocer el tipo y la cantidad de nematodos en el suelo antes de sembrar o plantar, a fin de adoptar medidas preemergentes cuando se detectan poblaciones por

encima de los niveles que causan daño económico. Por esa razón el análisis de laboratorio y campo proporciona la ventaja de realizar tratamientos al suelo con un ahorro en el costo de la estrategia de manejo [Stirling y Kopittke, 2000]. Además de lo señalado, se deben tener en cuenta otros aspectos como la topografía y el drenaje del campo, la eficacia del sistema de riego y la capacitación de los agricultores.

El presente trabajo muestra la situación nematológica de diversos campos de producción de frutales, lo que permite facilitar la aplicación del manejo preventivo de nematodos en los campos evaluados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un diagnóstico de nematodos en presiembra en suelos que previamente estuvieron sembrados con guayabo, en fincas de los municipios de Alquizar y Bejucal en la provincia de La Habana; con mango y aguacate en el municipio de La Lisa, de Ciudad de La Habana; con piña en Ciego de Ávila, en la propia provincia; con papayo en Jagüey Grande, en Matanzas, y con uva en el municipio especial de Isla de la Juventud.

Para la evaluación se establecieron parcelas entre 0,5 y 1,0 ha/campo, y en sus diagonales se tomaron porciones de suelo de un perfil entre 6 y 30 cm de profundidad, con una piocha o pico, y siempre se desechó el suelo de los primeros 5 cm; el número de muestras para cada parcela se determinó a partir del producto del valor del área por 50, con aproximación por exceso, de acuerdo con la metodología establecida por Fernández (1991). En los puntos donde existía vegetación se extrajeron entre 100 y 300 g de raíces que aún no estuvieran muertas, marchitas o con ataques de otros patógenos, conjuntamente con el suelo.

Las muestras se depositaron en una o varias bolsas de polietileno negro identificadas por área, campo, localidad, provincia, cultivo, variedad, fecha de siembra o cosecha, cultivo y variedad anterior, fecha del muestreo y técnico colector.

La extracción de los estadios móviles de nematodos se realizó de acuerdo con el método de Baermann. Se procesaron 18 muestras de 50 g cada una, y los nematodos se recuperaron en viales de 15 mL, y para la identificación de los géneros se realizaron observaciones al microscopio estereoscópico de acuerdo con las claves taxonómicas [Siddiqi, 2000]. Inmediatamente después se realizó el conteo con un contador manual y se calculó el promedio de ejemplares por muestra.

En las muestras de suelo colocadas en bolsas o macetas se sembraron tres semillas pregerminadas de calabaza (*Cucurbita moschata* Lin.) o pepino (*Cucumis sativus* Lin.), a razón de tres bolsas o macetas por muestra de suelo o materia orgánica, y se colocaron sobre una superficie separada del suelo, a fin de evitar la contaminación por contacto con el suelo. Las plantas se regaron e inspeccionaron periódicamente durante 35 días de cultivo (en el verano) o 45 (en el invierno); luego se extrajeron con sumo cuidado para evitar que se partieran las raíces. La presencia de nematodos se determinó mediante inspección visual de acuerdo con una escala de seis grados [Zeck, 1971; Püntener, 1981]. A cada planta indicadora se le asignó un grado entre 0 y 5 (*Tabla 1*), y se calculó el promedio del grado de agallamiento o índice de agallas del total de plantas evaluadas.

**Tabla 1. Descripción de las raíces de acuerdo con el grado de infestación con *Meloidogyne* spp.**

Grado	Descripción
0	Raíces sin agallas
1	Pequeñas agallas difíciles de descubrir o distribuidas por todas las raíces
2	Desde numerosas agallas pequeñas distribuidas en las raíces (algunas pueden estar encadenadas entre sí) hasta numerosas agallas de mayor tamaño
3	Agallas presentes en 25-50% de las raíces contaminadas
4	Desde 75% de las raíces con agallas semejantes a tumoraciones, hasta la raíz casi totalmente contaminada (aún la planta conserva su aspecto verde)
5	Desde la raíz casi totalmente contaminada y reducida (la planta muestra síntomas del daño) hasta el deterioro total por la muerte

Se calculó la frecuencia de aparición de los nematodos por la división de la cantidad de muestras por género detectado entre el total de muestras evaluadas expresado en por ciento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todas las áreas diagnosticadas se detectaron nematodos parásitos de plantas con diversos niveles de

densidad de población, que en la mayoría fueron bajos o moderados, aunque en las muestras correspondientes a los campos de Bejucal y Alquizar de la provincia

de La Habana previamente sembrados de guayaba los niveles alcanzaron valores elevados o muy elevados (Tabla 2).

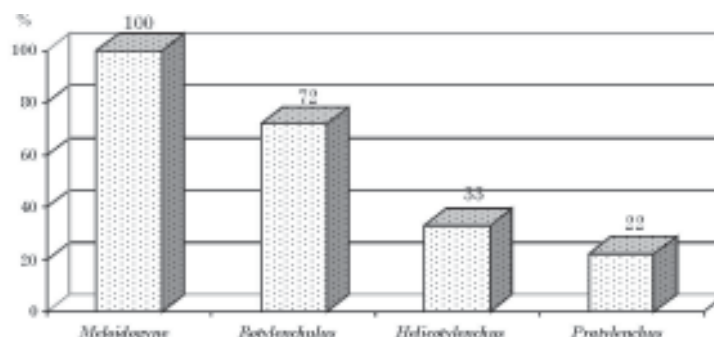


Figura 1. Frecuencia de aparición de los diferentes géneros de nematodos en cultivos frutícolas.

El análisis de laboratorio reveló que en los campos de frutales en fase de presiembra los géneros más frecuentes fueron *Meloidogyne* y *Rotylenchulus*. Ambos estuvieron presentes en todos los cultivos en algunas de sus etapas infectivas (Fig. 1), lo que permite asumir la existencia de una estrecha asociación entre estos organismos y los cultivos frutícolas. Estos resultados son similares a los obtenidos en Venezuela por Petit (1990) en los estudios de biodiversidad nematológica. Los complejos formados por estos géneros pudieran representar un peligro potencial, fundamentalmente para frutales como el guayabo y la piña, debido a los daños que pueden causar en su sistema radical, que limitan sensiblemente la absorción de los nutrientes y por consiguiente el desarrollo y la productividad.

*Helicotylenchus* y *Pratylenchus* no estuvieron presentes en las áreas agrícolas que anteriormente se cultivaron con aguacatero y uva; *Helicotylenchus* tampoco se presentó en campos de papayo, y *Pratylenchus* no se detectó en campos de mango (Tabla 2).

En general las mayores poblaciones de nematodos se apreciaron en los campos de guayabo, con predominancia de *Meloidogyne* sobre *Pratylenchus*, lo cual coincide con Fernández (1991), quien aseveró que este cultivo es un buen hospedero de ambas especies, y que las pérdidas económicas que ocasionan estos nematodos pueden alcanzar 20 t/ha en plantaciones jóvenes, según Suárez *et al.* (1998) con valores máximos entre 48 y 57% en plantaciones establecidas. Los daños incluso pueden ser aún mayores en la fase de producción, cuando

se emplean posturas contaminadas, pues la alimentación y reproducción del nematodo tiene lugar desde el mismo inicio del crecimiento del cultivo en la fase de vivero. En este trabajo se observó una tendencia descendente del índice de agallamiento de *Meloidogyne* desde la máxima densidad de población hasta 240 J<sub>2</sub>/250 g de suelo, a partir de la cual no se presentó una infestación visible en raíces (Tabla 2).

En las muestras de los suelos dedicados a la piña se observaron poblaciones de *Rotylenchulus* y *Meloidogyne*. Estos géneros de nematodos usualmente están asociados al cultivo con una incidencia negativa en el desarrollo de la planta y el rendimiento agrícola, por lo que es muy útil realizar el diagnóstico nematológico antes de la siembra [Gandoy y Ortega, 1980; MINAGRI, 1989; Araya, 2006].

## CONCLUSIONES

- *Meloidogyne* y *Rotylenchulus* con 100 y 72% respectivamente fueron los géneros de nematodos más frecuentes en las muestras de suelos de frutales en fase de presiembra.
- Los suelos procedentes del guayabo se distinguieron notablemente por las elevadas densidades de población de *Meloidogyne* en comparación con los de piña, uva, papayo, mango y aguacatero.
- *Helicotylenchus* y *Pratylenchus* no estuvieron presentes en las áreas agrícolas anteriormente cultivadas con aguacatero y uva, mientras el primero tampoco estuvo en papayo y el segundo en mango.

**Tabla 2. Fauna de nematodos parásitos de los cultivos frutales detectados. Individuos por 250 g de suelo**

Municipio/ provincia	Unidad agrícola	Cultivo precedente	Variedad	<i>Meloidogyne</i> sp.			<i>Rotylenchus</i> sp.		<i>Helicotylenchus</i> sp.	<i>Pratylenchus</i> sp.
				J <sub>2</sub>	M	G	J <sub>4</sub>	M		
Alquízar/ La Habana	Estación Experimental de Fruticultura	Guayabo	Enana EEA 18-40	2756		4				25
				1305		2				
				620		1				
				305		0,3	100			
Bejucal/ La Habana	Finca La Milagrosa	Guayabo	Enana EEA 18-40	240		0,3	50			
				130		0	15	5	15	
				110		0	10			
				100		0	40		35	
La Lisa/ Ciudad de La Habana	Finca de autoconsumo	Mango	Super Hayden	70		0	10		5	
			Hyden	30		0	35	10	5	
		Aguacatero	Catalina- Govin	10		0	5			
Ciego de Ávila/ Ciego de Ávila	Empresa de la Piña	Piña	Española roja	160	10	0	110		20	
					5	0	5			
			Cayena lisa	53	5	0	85		10	5
Jagüey Grande/ Matanzas	Estación Experimental de Fruticultura	Papayo	Solosunrise	100	10					5
			Maradol	60	5	0	5			5
Isla de la Juventud	Finca orgánica	Uva	Aramón	140		0				
				90		0				
				30		0	200			

J<sub>2</sub>: Larva infectiva del segundo estadio.

M: Especimen adulto macho.

G: Grado de infestación con agallas.

J<sub>4</sub>: Hembra adulta joven infectiva.

## REFERENCIAS

Araya, M.; Comunicación personal, 2006.

Fernández, E. «Los nematodos del género *Meloidogyne* Goeldi en el cultivo de la guayaba (*Psidium guajava* L.) y su control». Tesis de Doctorado en Ciencias Agrícolas, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, La Habana, 1991.

Gandoy, P.; J. Ortega: «Nematodos parásitos del cultivo de la piña en Cuba y posibilidades de su control», *Ciencias de la Agricultura* 7:19-28, 1980.

INIFAP: «Control de nematodos fitoparásitos en piña. Ficha tecnológica por sistema tecnológico», estado de Veracruz, México, 2002.

<http://www.inifap.gob.mx/contenido/innovaciones/innovaciones.html#sanidad>.

MINAGRI: *Instructivo técnico para el cultivo de la piña*, Departamento Independiente de Frutales. Área No Cañera, Centro de Información y Documentación Agropecuaria, La Habana, 1989.

Petit, P.: «Reconocimiento de nematodos fitoparásitos asociados a frutales de importancia económica en Venezuela», *Fitopatol. Venez.* 3(1):2-5, 1990.

Püntener, W.: *Manual para ensayos de campo de protección vegetal*, 2.ª ed. revisada y ampliada, Documenta CIBA-GEIGY, Basilea, Suiza, 1981.

Siddiqi, M. R.: *Tylenchida. Parasites of Plants and Insects*, 2th Ed., CABI Publishing, Wallingford, Inglaterra, 2000.

Stirling, G. R.; R. Kopittke: «Sampling Procedures and Damage Thresholds for Root-Knot Nematode (*Meloidogyne javanica*) on Pineapple», *Aust. J. Exp. Agric.* 40(7):1003-1010, 2000.

Suárez, H. Z.; L. C. Rosales; M. S. González: «Nematodos asociados a los frutales de importancia y su control. I: frutales perennes», *Fonaiap Divulga.* 59:13-18, 1998.

Zeck, W. M.: «El esquema de valoración del ataque de cecidios radicícolas», *Pflanzenchutz Nachrichten Bayer* 24(1):147-150, 1971.

# AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA DE AISLADOS NATIVOS DE HONGOS MITOSPÓRICOS CON POTENCIALIDAD PARA EL CONTROL DE ESPECIES DE INSECTOS PLAGA

Orestes Elósegui Claro, Jesús Jiménez Ramos y Aidanet Carr Pérez

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.<sup>a</sup> B y 5.<sup>a</sup> F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

## RESUMEN

Se realizó una prospección de hongos entomopatógenos a partir de especies de insectos plaga sospechosos de micosis en cultivos de gran importancia económica y de muestras de suelo. De un total de 53 muestras se obtuvieron 17 útiles que correspondieron a 15 aislados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., una de *Paecilomyces lilacinus* Samson y una de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. El predominio de aislados de *Beauveria* fue consecuencia en parte del amplio rango de hospedantes de esta especie fúngica y a la cantidad de muestras procesadas que pertenecieron a *Hypothenemus hampei* (broca del café), donde este microorganismo es un patógeno muy habitual. Solamente se obtuvo un aislado de hongo de las 15 muestras de suelo procesadas mediante el trapeo con insectos patrones. Todos los aislados se incorporaron a la Colección de Cepas de Hongos Entomopatógenos del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), donde se registraron sus características macroculturales, microculturales, origen y especie a que pertenecen, con el objetivo de conservarlos para futuros estudios como agentes potenciales de biocontrol de insectos plaga.

Palabras claves: hongos entomopatógenos, hongos mitospóricos, control biológico, plagas

## ABSTRACT

A screening for entomopathogenic fungi from both mycosis suspect insect cadavers in crops of economical importance and soil samples was carried out. Of a total out of 53 samples collected 17 resulted successful which belonged to 15 isolates of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., one of *Paecilomyces lilacinus* Samson and one of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. The predominance of *Beauveria* isolates was a consequence in part of the large amount of samples taken from *Hypothenemus hampei* (coffee berry borer) where this microorganism has been found as a very common pathogen as well as the broad host range this fungal species exhibits in nature. Only one fungal isolate of fifteen different soil samples tested by insect bait method was obtained. All the isolates recovered were stored in the Plant Health Research Institute (INISAV) Culture Collection being previously recorded in a datasheet with the micro and macro cultural characteristics, origin and species name, for further research for a potential use as biological control agents of insect pests.

Key words: entomopathogenic fungi, mitosporic fungi, biological control, pests

## INTRODUCCIÓN

Los hongos mitospóricos están catalogados como un grupo mundialmente reconocido de agentes microbianos a usarse tanto en los programas de control biológico de plagas como en los de manejo integrado de plagas (MIP). Esto es debido a su forma de actuar, que es por contacto directo con la cutícula del hospedero y por la disponibilidad de tecnologías para producirlos masivamente. Algunos géneros además se pueden formular en aceites y así aplicarse con técnicas de volumen ultrabajo [Bateman *et al.*, 1993; Bateman *et al.*, 1996].

Está demostrado que para llegar a obtener un producto altamente efectivo para controlar una especie plaga se debe partir de un amplio rango de aislados, seleccio-

nados en principio en cuanto a su virulencia. Los aislados que causan epizootias espectaculares, como es el caso de algunos de los géneros fúngicos imperfectos entomopatógenos, son candidatos promisorios para usarse en el control de plagas, siempre y cuando logren clasificar sobre la base de otras características esenciales como son un nivel de especificidad de hospedante estrecho, buena tolerancia a factores ambientales adversos, facilidad de producción, comportamiento en almacenaje adecuado y alta seguridad en mamíferos [Bateman *et al.*, 1996].

Clásicamente hay tres vías de enriquecer el número de aislados fúngicos para utilizarse como candidatos en el

control biológico de plagas. La primera es mediante el aislamiento del hongo a partir de artrópodos y nematodos micosados, la segunda a través de muestras de suelo y por último directamente de las colecciones de cultivo [Rhodes y Smith, 1992].

Una vez aislado el agente es necesaria una correcta identificación. La identificación tradicional por medio de las características morfológicas mantiene un peso relevante, aunque se han introducido conceptos nuevos que conllevan a algún tipo de marcador molecular que permita, entre otras cosas, identificar al agente incluso después de su liberación [Bridge y Arora, 1998 citados por Bieliková *et al.*, 2002].

En Cuba, dentro de los hongos entomopatógenos están autorizados a producirse masivamente solamente dos cepas de *Beauveria bassiana* de las que una no es nativa, y la otra es de *Metarhizium anisopliae*. Para el caso de *Lecanicillium lecanii* (syn. *Verticillium lecanii*) se cuenta con dos cepas en la producción, ambas foráneas. Por estas razones surge la necesidad de contar con mayor cantidad de aislados e introducir nuevos en la producción, que tengan ventajas como controladores de determinadas plagas agrícolas con respecto a las que ya se producen masivamente en el país.

Los objetivos del trabajo fueron realizar aislamientos de hongos patógenos a artrópodos (insectos), con énfasis en especies plaga de relevancia económica, identificarlos taxonómicamente e incorporarlos a la Colección de Hongos Entomopatógenos y Antagonistas del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV) para estudios posteriores.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En los Laboratorios Provinciales de Sanidad Vegetal (LAPROSAV) y en el INISAV se recibieron muestras que consistieron en individuos muertos pertenecientes a la clase Insecta, sospechosos de micosis, según síntomas de momificación y/o mecanización, o con esporulación de naturaleza fúngica en la superficie cuticular; también se recibieron muestras de suelo. Ambas muestras procedían de zonas donde se habían observado epizootias y no aplicado productos a base de hongos entomopatógenos, de acuerdo con registros históricos de campo.

Para el aislamiento del hongo, que ya estaba esporulado sobre los individuos colectados, se realizaron siembras en placas Petri de 9 cm de diámetro, por agotamiento en agar sabouraud dextrosa o agar papa dextrosa (PDA) o agar extracto de malta (MEA), en presencia de antibióticos, según el método descrito por Rhodes y

Smith (1992). Para los individuos sospechosos de micosis se realizaron lavados con agua estéril y desinfecciones con NaHClO a 0,5% durante 1 min. Seguidamente se realizaron dos lavados por agua estéril y se colocaron en cámaras húmedas incubadas a 28°C por 7-9 días. A partir del segundo día se observaron, y en los individuos donde se detectó emergencia de micelio se realizaron transferencias bajo condiciones asépticas, con siembras por agotamiento de acuerdo con el método ya mencionado.

Para el aislamiento de hongos entomopatógenos con *Galleria mellonella* se siguió el método de trampeo descrito por Zimmermann en 1986 [citado por Sun, 2002] con algunas modificaciones para este trabajo. Las muestras de suelo se obtuvieron a partir de la selección de una hectárea que fuese representativa de un agroecosistema con registros de infecciones por hongos entomopatógenos en insectos plaga. Se tomaron cinco puntos al azar y de cada punto se colectaron 10 submuestras de 10 cm<sup>3</sup> de suelo cada una. El material se colocó en bolsas oscuras y se homogenizaron en una muestra única en el laboratorio. Se vertieron 6-10 g de suelo por placa Petri de 12 cm de diámetro y en cada una se colocó un individuo de *Galleria mellonella* o *Corcyra cephalonica* de primeros estadios larvales, como insectos cebo o trampeadores. Las placas se observaron a partir del segundo día hasta el noveno, con movimiento diario. Si en este intervalo ocurría la muerte se procedía a la desinfección superficial, incubación y aislamiento del supuesto hongo de forma similar a lo explicado en el párrafo anterior para los individuos sospechosos de micosis.

Las colonias obtenidas en placa se observaron al microscopio estereoscópico y se realizaron preparaciones al microscopio óptico que se compararon con las descripciones de géneros hifomicetos de Carmichael *et al.* (1980) y Barnett y Hunter (1998). En caso de pertenecer el individuo a un género patogénico de interés, se realizaba un subcultivo en medio agarizado y se registraba como un nuevo aislado de la colección; en caso contrario las muestras procesadas se destruían. La identificación del patógeno a nivel de especie se realizó con ayuda de las descripciones de especies de hongos entomopatógenos del CMI, de acuerdo con las características macro y microculturales [CMI, 1979].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los aislados de hongos entomopatógenos obtenidos correspondieron a los géneros *Beauveria*, *Paecilomyces* y *Metarhizium*, a los que se les estudiaron sus características macro y microculturales más notables (*Tabla 1*).

Tabla 1. Aislados de hongos entomopatógenos obtenidos. Principales características macro y microculturales

Aislado (número de registro de origen)	Origen	Identificación	Características macroculturales	Características microculturales
Bb-102	<i>Metamasius hemipterus ceriseus</i> (coleóptero), Matanzas	<i>Beauveria bassiana</i>	En PDA colonias al inicio blancas afieltradas que con el tiempo se tornan crema polvorientas. Reverso amarillo ligero	Células conidiógenas muy típicas de la especie, con bases globosas. 2,0-3,0 (2,3 µm) x 2,0-2,5 (2,1 µm). Conidios hialinos, globosos a subglobosos 1,0-2,5 (1,9 µm) x 1,0-2,0 (1,7 µm)
Bb-103	<i>Metamasius hemipterus</i> (coleóptero), Santiago de Cuba	<i>Beauveria bassiana</i>	En PDA colonias algodonosas y blancas al inicio que se tornan crema y polvorientas con el tiempo. Reverso amarillo ligero	Muy abundantes conidioforos con grupos densos de células filídicas. Células conidiógenas globosas unas y otras en forma de botella con formas intermedias, 1,5-3,0 (2,7 µm) x 2,0-3,0 (2,2 µm). Conidios hialinos, a veces con un ápice muy definido, globosos a elipsoidales 1,5-3,0 (2,3 µm) x 1,5-3,0 (2,1 µm)
Bb-105	<i>Hypothenemus hampei</i> (coleóptero), cafetal, zona montañosa, Granma	<i>Beauveria bassiana</i>	Colonias en PDA que al inicio son blancas y algodonosas y se tornan beis claro y ligeramente polvorientas, según esporulan con el tiempo. Reverso amarillo ligero	Células conidiógenas muy típicas de la especie, con bases globosas. 2,0-3,0 (2,3 µm) x 2,0-2,5 (2,2 µm). Conidios muy homogéneos, hialinos, globosos, algunos subglobosos, 2,0-2,0 µm
Bb-106	<i>Hypothenemus hampei</i> (coleóptero), café, zona montañosa, Granma	<i>Beauveria bassiana</i>	Colonias en PDA que al inicio son blancas y algodonosas y se tornan crema claro y ligeramente polvorientas según esporulan con el tiempo. Algunos coremios. Reverso amarillo ligero	Células conidiógenas globosas unas y otras en forma de botella con formas intermedias, 2,0-3,5 (2,3 µm) x 1,0-2,5 (1,9 µm). Conidios hialinos, globosos a subglobosos 1,5-2,0 (1,9 µm) x 1,0-2,0 (1,7 µm)
Bb-107	<i>Hypothenemus hampei</i> (coleóptero), café, zona montañosa, Granma	<i>Beauveria bassiana</i>	Colonias en PDA que al inicio son blancas y algodonosas y se tornan beis claro y ligeramente polvorientas según esporulan con el tiempo. Algunos coremios Reverso amarillo ligero	Células conidiógenas globosas unas y otras en forma de botella con formas intermedias, 2,0-3,5 (2,3 µm) x 1,0-2,5 (1,9 µm). Conidios hialinos, globosos a subglobosos 1,5-2,0 (1,9 µm) x 1,0-2,0 (1,7 µm)
Bb-SP	<i>Spodoptera frugiperda</i> (lepidóptero), maíz, Camagüey	<i>Beauveria bassiana</i>	En PDA colonias algodonosas y blancas al inicio que se tornan beis y ligeramente polvorientas con el tiempo. Reverso miel	Células conidiógenas muy típicas de la especie, con bases globosas, 2,0-3,0 (2,4 µm) x 2,0-2,5 (2,3 µm). Conidios muy homogéneos, hialinos, globosos, algunos ligeramente subglobosos, 2,0-2,0 µm

