

## Detección de enzimas extracelulares en cepas cubanas del complejo *Metarhizium anisopliae* con acción entomopatogénica contra *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera: Brentidae)

### Detection of extracellular enzymes in Cuban strains of *Metarhizium anisopliae* complex with entomopathogenic action against *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera: Brentidae)

Yohana Gato-Cárdenas<sup>1</sup>, María E. Márquez-Gutiérrez<sup>2</sup>, Yamilé Baró-Robaina<sup>1</sup>, Jaime de Jesús Calle-Osorno<sup>3</sup>

#### Resumen

El presente trabajo informa la detección, por métodos bioquímicos, de enzimas extracelulares relacionadas con la actividad biológica de nueve cepas del complejo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Se determinó, a diferentes concentraciones, la capacidad patogénica contra el insecto *Cylas formicarius* Fabricius, y se calculó el tiempo y la concentración letal. Se analizó tanto la presencia de enzimas extracelulares en las cepas fúngicas como su relación con el efecto entomopatogénico y virulencia contra *C. formicarius*. Todas las cepas del complejo *M. anisopliae* estudiadas resultaron patogénicas exhibiendo un índice de actividad enzimática superior a 1. La cepa LBM-30 fue la más eficiente al detectarse la presencia de enzimas proteasa, quitinasa, caseinasa, amilasa y lipasa. Esto corrobora la relación de la actividad enzimática con la virulencia observada.

**Palabras clave:** actividad patogénica, actividad enzimática, control biológico, coleóptero, hongos entomopatógenos, virulencia

#### Abstract

This study reports the detection, by biochemical methods, of extracellular enzymes related to the biological activity of nine strains of the complex *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. We determined the pathogenic capacity against the insect *Cylas formicarius* Fabricius at different concentrations, calculated the lethal time and concentration, and analyzed both the presence of extracellular enzymes in the fungal strains as well as their relation to the entomopathogenic effect and virulence against *C. formicarius*. All strains of the *M. anisopliae* complex studied were pathogenic with an enzymatic activity index greater than 1. The LBM-30 strain was the most effective with presence of protease, chitinase, caseinase, amylase and lipase enzymes. This result corroborates the relationship between of the enzymatic activity with the observed virulence.

**Key words:** pathogenic activity, enzymatic activity, biocontrol, coleopteran, entomopathogenic fungi, virulence

---

Recibido: mayo 2016; aceptado: junio 2017.

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). Calle 110 # 514 e/ 5ta B y 5ta F, Playa, La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> Universidad de la Habana. Calle M # 255e/ 19 y 21, Vedado, La Habana, Cuba.

<sup>3</sup> Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia. Calle 67 No. 53-108. Medellín, Colombia.  
Correos electrónicos: <ygato@inisav.cu>, <ygatocardenas86@gmail.com>, <maria.elena@rect.uh.cu>, <jaime.calle@udea.edu.co>

## INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Metarhizium* Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) son consideradas agentes de control biológico efectivas, dada su acción ante una amplia gama de organismos diana y el bajo impacto sobre el ambiente y la fauna benéfica (Reddy et al. 2014). Se utilizan a nivel mundial para la prevención y el manejo de diversas plagas, fundamentalmente artrópodos de interés agrícola (Bischoff et al. 2009, Perinotto et al. 2014, Souza et al. 2014).

Los hongos entomopatógenos pertenecientes al género *Metarhizium* destacan por su modo de acción al invadir los patógenos y actuar por contacto. El desarrollo de la micosis incluye diferentes pasos, cada uno con una importancia particular, que provocan la muerte del hospedador y la posterior diseminación en el hábitat (Roberts y St. Leger 2004).

La actividad entomopatógena requiere de la acción de enzimas hidrolíticas; entre las más estudiadas se encuentran: proteasas, quitinasas y lipasas, que degradan los componentes cuticulares y proporcionan nutrientes para una mayor proliferación del hongo dentro del insecto. En la determinación de la virulencia de los aislados, Carrillo-Rayas y Blanco-Labra (2009) demostraron la importancia de las enzimas que son secretadas durante el proceso de infección fúngica. Además, estos autores describieron las interacciones que tienen lugar entre el hongo y el insecto hospedador.

El presente trabajo tuvo como objetivo detectar, por métodos bioquímicos, la presencia de enzimas extracelulares relacionadas con la actividad patogénica de nueve cepas cubanas del complejo *M. anisopliae*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon como materiales biológicos cepas nativas del complejo *M. anisopliae* obtenidas de diferentes hospedadores, las cuales pertenecen a la colección de cultivos del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), La Habana, Cuba (tabla 1).

Se hicieron cultivos monoconidiales a las cepas en estudio y posteriormente se conservaron en tubos de ensayo con Medio Completo y se mantuvieron a 4 °C (10 réplicas por cepa) hasta la ejecución de los ensayos (Gato et al. 2016).

### Virulencia de las cepas del complejo *M. anisopliae* sobre *C. formicarius*.

De cada cepa evaluada se realizó una suspensión a una concentración de  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  conidios/ml, ajustada por conteo en cámara de Neubauer a partir de cultivos de primer pase. Se evaluó la virulencia de las cepas según Márquez et al. (2010). Se determinaron los tiempos ( $TL_{50}$  y  $TL_{90}$ ) y las concentraciones letales ( $CL_{50}$  y  $CL_{90}$ ) (Barriga et al. 2002, Suárez-Gómez 2009).

Tabla 1. Hospedadores y origen de las cepas del complejo *M. anisopliae* empleadas en los estudios

Código de la cepa	Hospedadores		Origen geográfico
	Especie	Orden y Familia	
LBM-5	Hospedador desconocido	Hemiptera	Cuba
LBM-10	Hospedador desconocido	Hemiptera	Cuba
LBMa-11(*)	<i>Mocis latipes</i> Guenée	Lepidoptera: Erebididae	Cuba
LBM-12	<i>Corcyra cephalonica</i> (S.)	Lepidoptera: Pyralidae	Cuba
LBM-30	Suelo, técnica del "insecto cebo" con <i>Galleria mellonella</i> (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)		La Habana
LBM-41	<i>Hypothenemus hampei</i> Ferrari	Coleoptera: Curculionidae	Granma
LBM-42	<i>H. hampei</i>	Coleoptera: Curculionidae	Granma
LBM-146	Salta hojas	Hemiptera: Cicadellidae	Cuba
LBM-267	Salta hojas	Hemiptera: Cicadellidae	Cuba

(\*) Cepa empleada en la producción masiva de bioplaguicidas en Cuba. Se utilizó como control positivo en los ensayos realizados.

Los tiempos letales ( $TL_{50}$  y  $TL_{90}$ ) se calcularon para cada concentración evaluada a partir de las ecuaciones de regresión que expresan la relación entre el porcentaje de mortalidad acumulada y el tiempo. Se empleó en los análisis el paquete estadístico StatSoft (versión 6.0).

Las concentraciones letales ( $CL_{50}$  y  $CL_{90}$ ) se calcularon a partir de las ecuaciones de regresión que expresan la relación entre el probit de la mortalidad y el logaritmo de la concentración. La evaluación se realizó a los siete días de realizado el ensayo. Se empleó en los análisis el paquete estadístico StatSoft (versión 6.0).

### Determinación de enzimas extracelulares

La actividad enzimática se expresó como la relación entre el diámetro de la colonia y el diámetro del halo causado por la degradación del sustrato. La actividad enzimática se confirmó a partir de valores de índice enzimático mayores a 1 (St. Leger et al. 1997). La determinación de la actividad proteasa, amilasa, caseinasa, lipasa y quitinasa se realizó según el protocolo propuesto por Sanivada y Challa (2014).

**Determinación de la actividad proteasa:** Se empleó 1% de extracto de gelatina en un medio mínimo (0,003% NaCl, 0,03%  $MgSO_4$  y 0,015% de  $K_2HPO_4$ ) con 2% de agar. Las placas se inocularon con discos de 4 mm de diámetro con micelio de las cepas evaluadas y se incubaron a 26 °C durante 10 días. Luego del período de incubación se adicionó reactivo Frazier (compuesto por 15%  $HgCl_2$  en 2 N HCl). Se observó la completa degradación de la gelatina como una zona clara alrededor de la colonia.

**Determinación de la actividad amilasa:** Se empleó 1% de almidón soluble en medio mínimo y 2% de agar. Las placas se inocularon con discos de 4 mm de diámetro con micelio de las cepas evaluadas y se incubaron a 26 °C durante 10 días. Para determinar la degradación del almidón se utilizó el reactivo Lugol. La presencia de actividad amilasa se observó como un halo amarillo alrededor de la colonia embebida en una solución azul.

**Determinación de la actividad caseinasa:** Se empleó 1% de leche descremada en medio mínimo y 2% de agar. Las placas se inocularon con discos de 4 mm de diámetro con micelio de las cepas evaluadas y se incubaron a 26 °C durante 10 días. La producción de caseinasa se constató con la aparición de un halo transparente alrededor de la zona más próxima a la colonia, mientras el resto se observó de color blanco.

**Determinación de la actividad lipasa:** Se empleó 1% de Tween 80 en medio mínimo más 2% de agar. Las placas se inocularon con discos de 4 mm de diámetro con micelio de las cepas evaluadas y se incubaron a 26 °C durante 10 días. La producción de lipasas por las cepas se observó como un precipitado visible alrededor de las colonias debido a la completa degradación de los ácidos grasos.

**Determinación de la actividad quitinasa:** Se empleó el medio quitina coloidal (Lang et al. 2002). Las placas se inocularon con discos de 4 mm de diámetro con micelio de las cepas evaluadas y se incubaron a 26 °C durante 10 días. La prueba se consideró positiva al observar crecimiento o un halo claro alrededor del crecimiento de las cepas después del período de incubación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Virulencia de las cepas del complejo *M. anisopliae* sobre *C. formicarius*

Las cepas evaluadas a la concentración de  $1 \times 10^6$  conidios/ml presentaron, de forma general, un bajo porcentaje de mortalidad acumulada en el control de *C. formicarius*, en contraste con las concentraciones de  $10^7$  y  $10^8$  conidios/ml, a los 14 días post-inoculación. Al evaluar la concentración de  $5 \times 10^6$  conidios/ml se alcanzaron valores de mortalidad entre 58,0 y 97,6% en ese período de tiempo. Las cepas evaluadas a  $1 \times 10^7$  y  $5 \times 10^7$  conidios/ml presentaron porcentajes de mortalidad acumulada en el rango de 63,3-90% y 64-100% respectivamente a los 7 días post-inoculación. Los valores más elevados de mortalidad se registraron con la concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/ml en el rango de 90-100% a los 7 días de realizado el ensayo.

La cepa LBM-30 tuvo el valor más elevado de mortalidad en todas las concentraciones utilizadas, con 96,6% de mortalidad acumulada a los 7 días, a una concentración de  $5 \times 10^7$  conidios/ml, lo cual fue similar a lo obtenido con la cepa control LBMA-11 (figura 1A). El valor más bajo de mortalidad acumulada se registró para LBM-12 con 63,3% a la concentración de  $5 \times 10^7$  conidios/ml (figura 1B). Los resultados están en concordancia con lo alcanzado por Reddy et al. (2014), quienes al utilizar *Metarhizium brunneum* Petch para el control de *C. formicarius* obtuvieron un 100% de mortalidad acumulada a los 5 días. Estos resultados también son similares a lo alcanzado por Cito et al. (2014) quienes obtuvieron en sus experimentos valores de mortalidad superiores al 90% sobre adultos del coleóptero *Rhynchophorus ferrugineus*

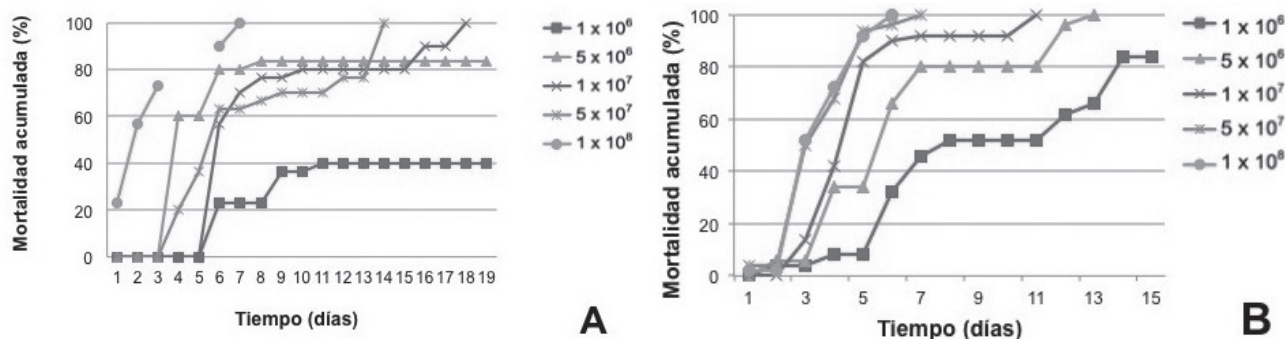


Figura 1. Mortalidad acumulada de adultos de *C. formicarius*, tratados con distintas concentraciones de las cepas: A) LBM-12, B) LBM-30.

Tabla 2. Virulencia de las cepas del complejo *M. anisopliae* a diferentes concentraciones

Cepas	Concentración (conidios/ml)	TL <sub>50</sub> (días)	TL <sub>90</sub> (días)	Ecuación de regresión	Coefficiente de determinación (R <sup>2</sup> )
LBM-5	$1 \times 10^7$	7,94	13,0	$y=7,9x-12,7$	0,965***
	$5 \times 10^7$	5,09	9,5	$y = 13,3x-24,3$	0,928 ***
	$1 \times 10^8$	1,56	4,84	$y = 12,2x +31$	0,90 *
LBM-10	$1 \times 10^7$	7,88	15,0	$y= 5,63x+5,64$	0,90*
	$5 \times 10^7$	6,91	12,4	$y=7,35x-0,80$	0,93 ***
	$1 \times 10^8$	4,41	6,91	$y=16,0x-20,6$	0,97 ***
LBMa-11	$1 \times 10^7$	7,2	11,0	$y=0,55x+0,26$	0,976***
	$5 \times 10^7$	6,2	9,2	$y=0,50x+0,02$	0,942*
	$1 \times 10^8$	3,8	6,8	$y=0,37x-1,27$	0,961 ***
LBM-12	$1 \times 10^7$	7,68	12,6	$y=8,06x-11,9$	0,784***
	$5 \times 10^7$	7,38	12,8	$y=7,41x-4,65$	0,873***
	$1 \times 10^8$	2,08	5,75	$y=10,9x+27,3$	0,87 *
LBM-30	$1 \times 10^7$	5,48	9,44	$y=10,1 x -5,37$	0,72 ***
	$5 \times 10^7$	4,2	6,61	$y=16,6 x -19,7$	0,79 ***
	$1 \times 10^8$	4,12	6,11	$y=20,1 x -32,9$	0,91 ***
LBM-41	$1 \times 10^7$	6,5	15,0	$y=0,55x+0,51$	0,867 *
	$5 \times 10^7$	6,8	15,4	$y=0,52x-0,08$	0,963 ***
	$1 \times 10^8$	4,0	7,0	$y=0,71x-1,35$	0,827*
LBM-42	$1 \times 10^7$	5,0	16	$y=0,42x+0,24$	0,976***
	$5 \times 10^7$	4,8	9,8	$y=0,39x+0,20$	0,897*
	$1 \times 10^8$	4,0	5,8	$y=0,37x-0,003$	0,827*
LBM-146	$1 \times 10^7$	5,75	12,0	$y=6,37x+13,4$	0,716**
	$5 \times 10^7$	3,34	5,06	$y = 23,3x-28$	0,834 *
	$1 \times 10^8$	1,75	4,01	$y=17,7x+19,0$	0,795 ns
LBM-267	$1 \times 10^7$	3,83	7,34	$y=11,4x+6,3$	0,80**
	$5 \times 10^7$	4,58	8,75	$y =9,59x+6,1$	0.917 ***
	$1 \times 10^8$	3,46	6,18	$y = 14,7x+0,9$	0.902 *

(\*) Representa 5% de significación, (\*\*) 1% de significación, (\*\*\*) 0,1% de significación, (ns) no significativo (p=0,1%). n= 300 Adultos de *C. formicarius* empleados en las pruebas de virulencia.

Olivier (Coleoptera: Dryophthoridae) al ser inoculados con aislados de *M. anisopliae* y *M. pingshaense* Chen y Guo.

La virulencia de las cepas fúngicas en el presente estudio fue determinada con base en los TL y CL. La comparación de TL<sub>50</sub> y TL<sub>90</sub> a las diferentes concentraciones ensayadas (tabla 2) confirman la variabilidad de la actividad patogénica de las cepas del complejo *M. anisopliae* estudiadas.

Las cepas evaluadas presentaron rangos de TL<sub>50</sub> entre 1,5 y 7,94 días y TL<sub>90</sub> entre 4,01 y 16,0 días. Estos resultados son similares a los alcanzados por Cito et al. (2014) quienes obtuvieron, para *M. pingshaense*, TL<sub>50</sub> de 7 días y TL<sub>90</sub> de 13 días contra *R. ferrugineus*. Estos mismos autores, con un aislado de *M. anisopliae* contra *R. ferrugineus*, alcanzaron TL<sub>50</sub> de 6 días y TL<sub>90</sub> de 21 días; este último valor fue inferior a lo reportado en el presente estudio.

Durante el bioensayo con la cepa LBM-267, la cual presentó un TL<sub>50</sub> de 3,83 días a la concentración de 1x10<sup>7</sup> conidios/ml, la mortalidad comenzó a registrarse a partir del segundo día, mientras que para las cepas LBM-12 (TL<sub>50</sub> de 7,68 días) y LBM-146 (TL<sub>50</sub> de 5,78 días), la mortalidad comenzó a registrarse entre el cuarto y quinto día, respectivamente. El progreso de la infección de LBM-30 y LBM-267 en *C. formicarius* fue gradual y la esporulación del hongo se expresó de manera marcada a partir de los 7 días. Los valores de TL<sub>50</sub> para estas dos cepas

fueron menores que los obtenidos con LBMa-11, lo cual indica que podrían considerarse nuevas cepas promisorias en el control de *C. formicarius*.

Un factor clave a considerar es la expresión de la patogenicidad de una cepa en función del hospedador. El efecto control de los hongos entomopatógenos no está necesariamente limitado a una especie, género o grupo hospedador de procedencia (Zimmermann 2007). Esto explica el hecho de que las cepas LBM-5 y LBM-267, aisladas de un hemíptero y LBM-30 proveniente de muestras de suelo, mostraron altos valores de mortalidad por micosis de *C. formicarius*, aunque este último pertenece a otro orden taxonómico.

Las CL en cada cepa estuvieron entre el orden de 10<sup>6</sup> y 10<sup>7</sup> conidios/ml (tabla 3) y los valores más bajos se obtuvieron con la cepa LBM-30.

El resultado obtenido con la cepa LBM-30 sugiere que la rápida mortalidad obtenida puede relacionarse con altos niveles de producción de enzimas vinculadas con la virulencia, que forman parte del mecanismo de acción. Por tanto, hay correspondencia con lo informado por Dong et al. (2009), Schrank y Vainstein (2010), Niassy et al. (2013), y Cito et al. (2014), quienes plantearon que factores como la producción de proteasas, esterases, quitinasas, lipasas y toxinas, son los que determinan la patogenicidad de un hongo entomopatógeno.

**Tabla 3.** Concentraciones letales 50 (CL<sub>50</sub>) y concentraciones letales 90 (CL<sub>90</sub>) de las cepas evaluadas a los 7 días de realizados los ensayos

Cepas	CL <sub>50</sub> (conidios/ml)	CL <sub>90</sub> (conidios/ml)	Ecuación de regresión	Coefficiente de determinación (R <sup>2</sup> )
LBM-5	1,8x10 <sup>6</sup>	4,4x10 <sup>7</sup>	y=3,4x-19,7	0.58 ns
LBM-10	4,2x10 <sup>6</sup>	3,5x10 <sup>7</sup>	y=1,41x-4,34	0,987**
LBMa-11	2,7x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>7</sup>	y=2,1x-8,5	0,98 **
LBM-12	3,5x10 <sup>6</sup>	1,3x10 <sup>7</sup>	y=2,2x-9,4	0.63 ns
LBM-30	1,8x10 <sup>6</sup>	8,8x10 <sup>6</sup>	y=1,9x-6,9	0.89*
LBM-41	3.5x10 <sup>6</sup>	1,3x10 <sup>7</sup>	y=2.2x -9.4	0.94 **
LBM-42	2.8x10 <sup>6</sup>	4,8x10 <sup>7</sup>	y= 3,6x -20	0,60 ns
LBM-146	4,4x10 <sup>6</sup>	1,2x10 <sup>7</sup>	y=2,8x-13,6	0.95 **
LBM-267	2,7x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>7</sup>	y=2,1x-8,5	0.83*

(\*) Representa 5 % de significación, (\*\*) 1% de significación, (\*\*\*) 0,1% de significación, (ns) no significativo (p=0,1%). n= 300 Adultos de *C. formicarius* empleados en las pruebas de virulencia.

### Determinación de enzimas extracelulares

En la tabla 4 se muestra el índice de la actividad enzimática de las cepas del complejo de especies de *M. anisopliae* empleadas en este estudio.

Todas las cepas evaluadas produjeron enzimas proteolíticas como proteasas y caseinasas. La producción de proteasas en todas las cepas se evidenció como una zona clara alrededor de la colonia (figura 2A) y se obtuvieron valores de índice enzimático entre 1,26 y 2,09. La producción de caseinasa se evidenció con la aparición de un halo transparente alrededor de la zona más próxima a la colonia, mientras el resto se observó de color blanco (figura 2C). En este caso se obtuvieron valores de índice enzimático entre 1,1 y 1,49.

Las enzimas proteolíticas, son secretadas para la degradación de la cutícula, proporcionando nutrientes para el crecimiento del hongo (Franco-Chávez et al. 2011). Las proteasas son sintetizadas por los hongos entomopatógenos en el primer paso de la infección del organismo diana (Carrillo-Rayas y Blanco-Labra 2009).

Únicamente en las cepas LBM-5, LBM-10, LBM-30 y LBM-267 se detectó actividad amilasa, lo cual se constató mediante un halo de hidrólisis de color amarillo alrededor de la colonia (figura 2B). Al respecto, Carrillo-Rayas y Blanco-Labra (2009) expusieron que algunos autores encontraron una relación entre la producción de amilasa y la virulencia, donde niveles elevados de esta enzima se asocian con una hipervirulencia en *M. anisopliae* mientras

los aislados con deficiencia en la producción de amilasa, no presentan virulencia.

En el presente estudio las cepas que no tuvieron actividad amilasa también manifestaron virulencia frente a *C. formicarius*. Esto puede deberse a la presencia de otras enzimas hidrolíticas involucradas en la penetración de la cutícula como son las proteasas, quitinasas y lipasas, las cuales también forman parte de los factores determinantes de la virulencia de los hongos entomopatógenos (Yang et al. 2007, Carrillo-Rayas y Blanco-Labra 2009, Franco-Chávez et al. 2011).

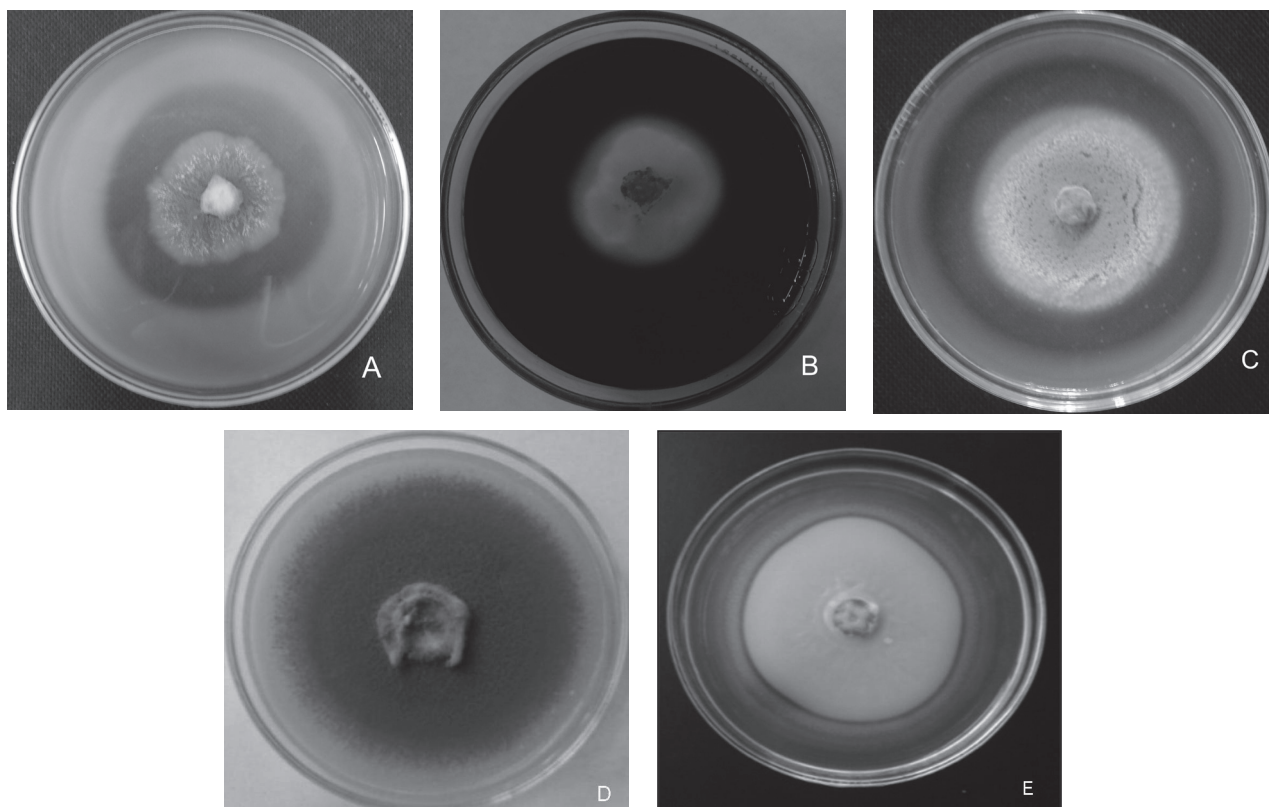
La utilización de la quitinasa se manifestó con una abundante producción de conidios en el medio de cultivo empleado, lo cual fue más destacado en las cepas LBM-41 y LBM-42 (figura 2D). Las quitinasas actúan sinérgicamente con las proteasas, para hidrolizar la cutícula del insecto (Franco-Chávez et al. 2011), además de estar implicadas en muchas etapas como la germinación, el crecimiento hifal, la morfogénesis, la nutrición y la defensa contra competidores (Seidl 2008, Hartl et al. 2012).

En el caso de LBM-12 y LBM-30 fueron las únicas que mostraron actividad lipasa con valores de 1,13 y 1,19, respectivamente (figura 2E). Carrillo-Rayas y Blanco-Labra (2009) indicaron que solo a través de la acción combinada de las tres principales enzimas hidrolíticas (proteasa, quitinasa y lipasa) se puede llevar a cabo la desintegración completa de la cutícula. Además, Beys da Silva et al. (2010) relacionaron la degradación de los

Tabla 4. Índice de actividad enzimática de las cepas del complejo *M. anisopliae*

Cepas	Índice de actividad enzimática				
	Proteasa	Amilasa	Lipasa	Caseinasa	Quitinasa
LBM-5	1,56	1,1	-	1,3	*
LBM-10	1,48	1,18	-	1,16	*
LBMa-11	1,71	-	-	1,17	*
LBM-12	2,09	-	1,13	1,14	*
LBM-30	1,75	1,1	1,19	1,49	*
LBM-41	1,26	-	-	1,18	*
LBM-42	1,47	-	-	1,13	*
LBM-146	2,0	-	-	1,32	*
LBM-267	1,35	1,39	-	1,1	*

(\*) Las colonias cubren el 90% de la placa y manifiestan abundante producción de conidios. (-) No hubo producción de la enzima.



**Figura 2.** Evaluación de la actividad enzimática de las cepas. A. Proteasa, B. Amilasa, C. Caseinasa, D. Quitinasa, E) Lipasa.

lípidos de la capa externa como una etapa de crecimiento previo a la penetración del hongo. Se ha sugerido la posterior síntesis de enzimas hidrolíticas (proteasas, quitinasas, lipasas, entre otras) que degradan la cutícula y proporcionan nutrientes para el desarrollo del hongo dentro del insecto (Franco-Chávez et al. 2011).

En los experimentos realizados todas las cepas evaluadas fueron patógenas a *C. formicarius*. La cepa LBM-30 fue la más virulenta, y además resultó positiva para la presencia de las enzimas amilasa, proteasa, caseinasa, quitinasa y lipasa. En este sentido Yang et al. (2007) informaron que la actividad entomopatogénica de los hongos depende de su arsenal enzimático, ya que para la penetración de la cutícula del insecto plaga, se requiere de la acción de enzimas hidrolíticas. Entre las más estudiadas se encuentran: proteasas, quitinasas, lipasas, quitobiosas y lipooxigenasas, que van degradando los componentes cuticulares importantes y proporcionan nutrientes para una mayor proliferación del hongo dentro del insecto.

En estos ensayos se constataron diferencias en el control de *C. formicarius* por nueve cepas distintas pertenecientes al complejo *M. anisopliae*, lo cual se manifestó en los valores de concentraciones y tiempos letales. Perinotto et al. (2014) indicaron que la variación en la virulencia se atribuye a varios factores, como el origen geográfico del aislado, el sustrato del cual el hongo fue aislado, la variabilidad genética, los subcultivos en medio artificial, la susceptibilidad de hospedadores, así como las diferencias en la secreción de proteasas, lipasas y quitinasas.

En este estudio se demostró la variabilidad de cepas cubanas del complejo *M. anisopliae* con acción de control contra *C. formicarius*. Se evidenció la relación entre la patogenicidad y virulencia de las cepas con la producción de enzimas hidrolíticas. Se resalta la importancia de realizar estudios de determinación de las enzimas involucradas en el modo de acción de hongos entomopatógenos, lo cual influye en la selección de cepas promisorias para el control biológico, y constituye un aspecto básico para la obtención

de bioproductos efectivos en la protección fitosanitaria de los cultivos.

En conclusión, las cepas del complejo *M. anisopliae* evaluadas, provenientes de diferentes hospedadores, fueron patogénicas contra *C. formicarius* en condiciones de laboratorio. Se recomienda evaluar la actividad patogénica *in vitro* de todas las cepas frente a otras plagas de importancia agrícola pertenecientes a otros órdenes insectiles. Además, se evidenció la variabilidad de la actividad patogénica de las cepas del complejo *M. anisopliae* y la alta virulencia de la cepa promisoría LBM-30 contra adultos de *C. formicarius*. Se recomienda evaluar la virulencia *in vivo* de esta cepa frente a *C. formicarius*. La presencia de enzimas amilasa, proteasa, caseinasa, quitinasa y lipasa está relacionada con la acción entomopatogénica y la virulencia en cepas cubanas del complejo *M. anisopliae*.

## REFERENCIAS

- Barriga E, Lándaruzi P, Gallegos P, Williams R. 2002. Evaluación en laboratorio de la patogenicidad de aislamientos nativos de *Beauveria* sp. y *Metarhizium anisopliae* para el control de *Premnotrypes vorax*. Revista Latinoamericana de la Papa, 13: 104-111.
- Beys da Silva WO, Santi L, Schrank A, Vainstein MH. 2010. *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhizoglyphus* (*Boophilus*) *microplus* infection. Fungal Biology, 114: 10-15.
- Bischoff J, Rehner S, Humber R. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. Mycology, 100(4): 512-530.
- Carrillo-Rayas MT, Blanco-Labra A. 2009. Potencial y algunos mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga. Acta Universitaria, 19(2): 40-49.
- Cito A, Mazza G, Strngi A, Benvenuti C, Brazanti G, Dreassi E, Turchetti T, Francadi V, Roversi P. 2014. Characterization and comparison of *Metarhizium* strains isolated from *Rhynchophorus ferrugineus*. Microbiology Letters, 335: 108-115.
- Dong CH, Zhang J, Huang H, Chen W, Hu Y. 2009. Pathogenicity of a new China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) to subterranean termite *Odontotermes formosanus*. Microbiological Research, 164: 27-35.
- Franco-Chávez K, Rodríguez S, Cervantes JF, Barranco JE. 2011. Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente, 11 (22): 143-160.
- Gato Y, Márquez ME, Baró Y, Porras A, Ulloa Y, Quesada Y. 2016. Caracterización de aislados cubanos del complejo de especies *Metarhizium anisopliae* con actividad patogénica frente a *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera: Brentidae). Protección Vegetal, 31(1): 50-56.
- Hartl L, Zach S, Seidl V. 2012. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. Applied Microbiology and Biotechnology, 93: 533-543.
- Lang W, Lung I, How C, Choan K, Teish W, Kuo Y, Jon J, Lu C. 2002. Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*. Enzyme and Microbial Technology, 31: 321-328.
- Marqu岸ez ME, Fernández-Larrea O, Jiménez J, Elósegui O, Gómez R, Carreras B, Laguardia E, Monzón S, Ayala J, Massó E, Veitía M, Borges G, Baró Y.
2010. Formas de obtención de controladores biológicos microbianos para su uso en el sistema de producción agrícola del MINAG. La Habana (Cuba): Centro de Información y Documentación de Sanidad Vegetal (Cidisav). Instituto de Investigaciones de Sanidad de Vegetal (INISAV). ISBN: 978-959-7194-37-8
- Niassy S, Subramanian S, Ekesi S, Bargul JL, Villinger J, Maniania NK. 2013. Use of *Metarhizium anisopliae* chitinase genes for genotyping and virulence characterization. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2013: 1-9.
- Perinotto W, Golo P, Coutinho Rodrigues C, Sá F, Santi L, Beys da Silva W, Junges A, Vainstein M, Schrank A, Salles C, Bittencourt V. 2014. Enzymatic activities and effects of mycovirus infection on the virulence of *Metarhizium anisopliae* in *Rhizoglyphus microplus*. Veterinary Parasitology, 203: 189-196.
- Reddy G, Zhao Z, Humber R. 2014. Laboratory and field efficacy of entomopathogenic fungi for the management of sweet potato weevil, *Cylas formicarius* (Coleoptera: Brentidae). Journal of Invertebrate Pathology, 122: 10-15.
- Roberts D and St. Leger RJ. 2004. *Metarhizium* spp., Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Mycological Aspects. Advances in Applied Microbiology, 54: 1-58.
- Sanivada SM and Challa M. 2014. Mycolytic effect of extracellular enzymes of entomopathogenic fungi to *Colletotrichum falcatum*, red rot pathogen of sugarcane. Journal of Biopesticides, 7: 33-37.
- Schrank A and Vainstein M. 2010. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. Journal of the International Society on Toxinology, 56: 1267-1274.
- Seidl V. 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. Fungal Biology, 22: 36-42.
- Souza R, Azevedo R, Lobo A, Rangel D. 2014. Conidial water affinity is an important characteristic for termotolerance in entomopathogenic fungi. Biocontrol Science and Technology, 24 (4): 448-461.
- StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), version 6.0.
- St. Leger RJ, Joshi L, Roberts D. W. 1997. Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. Microbiology, 143: 1983-1992.
- Suárez-Gómez H. 2009. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) sobre *Sitophilus zeae mais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) plaga del maíz almacenado. Revista Intropica, 4: 47-53.
- Yang J, Tian B, Liang L, Zhang K. Q. 2007. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, 75: 21-31.
- Zimmermann G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Science and Technology, 17 (9): 879-920.