

Incremento de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*, utilizando integumento del insecto en el medio de cultivo

María Teresa González García*
Arnubio Valencia Jiménez**
Alex Enrique Bustillo Pardey***

RESUMEN. El integumento de los insectos posee condiciones que pueden ser exploradas como fuente de nutrición para un grupo de hongos especializados. *Beauveria bassiana* puede germinar, penetrar la cutícula e invadir el hemocelo y causar la muerte de los insectos, lo cual sugiere que las condiciones necesarias para la germinación de las conidias y el crecimiento hifal están presentes en el integumento del insecto susceptible. Dada la importancia que tiene el sustrato de producción en la virulencia de los hongos, se cuantificó y determinó la relación entre la patogenicidad de cuatro aislamientos de *B. bassiana* (Bb9007, Bb9009, Bb9015 y Bb9205) aislados de insectos de los órdenes Coleoptera, Hemiptera y Lepidoptera, cultivados en medio SDA suplementado con integumento de broca al 0,5%, en amortiguador fosfato pH 7,0, al igual que la patogenicidad del aislamiento Bb9205 subcultivado durante cinco meses en el mismo medio. Se observaron incrementos altamente significativos, superiores al 80%, en los cuatro aislamientos evaluados después de ser cultivados en el medio SDA + integumento de broca. El aislamiento Bb9205 subcultivado cada quince días, en este medio conservó una patogenicidad entre 87,5% y 100%, con un tiempo promedio de mortalidad inferior a 3,7 días. Se determinaron diferencias significativas ($P > 0,05\%$) entre tratamientos. La mayoría de los aislamientos de *B. bassiana* pueden causar alta mortalidad a la broca, si permanentemente se proporciona al hongo el sustrato requerido para desarrollarse e inducir las enzimas requeridas para su patogenicidad.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, *Hypothenemus hampei*, Broca del café, Patogenicidad, Café, Control biológico.

ABSTRACT. Increase of pathogenicity of *Beauveria bassiana* towards *Hypothenemus hampei* using insect integument in the culture medium. The insect integument has conditions that may be explored as a nutritional source for a group of specialized fungi *B. bassiana* can germinate, penetrate the cuticle, invade the hemocele and cause the death of insects which suggests that the conditions necessary for germination of the conidia and growth of the hyphae are present in the integument of the susceptible insect. Given the importance of the production substrate in the virulence of fungi, the relation among the pathogenicity of four isolates (Bb9007, Bb9009, Bb9015 and Bb9205) of *B. bassiana*, isolated from insects of the orders Coleoptera, Hemiptera and Lepidoptera and grown on SDA medium supplemented with 0,5% borer integument ground in phosphate buffer pH7,0 was quantified and determined, as well as the pathogenicity of isolated Bb9205 subcultured for five months on the same medium. Highly significant increases were observed, greater than 80%, in the four isolates evaluated after being cultured on the SDA + borer integument medium. Isolate Bb9205 subcultured every 15 days, on this medium maintained a pathogenicity of between 87.5% and 100%, with an average mortality time of less than 3.7 days. Significant differences ($P > 0,05\%$) between the treatments were determined. Most of the *B. bassiana* isolates can cause high borer mortality, if the fungus is constantly provided with the substrate required for the development and induction of the enzymes required for its pathogenicity.

Key words: *Beauveria bassiana*, *Hypothenemus hampei*, Coffee borer, Pathogenicity, Coffee, Biological control.

* Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé) Caldas, Colombia

** Departamento de Química, Universidad de Caldas, Colombia.

*** Centro Nacional de de Investigaciones de Café (Cenicafé) Caldas, Colombia. Correo electrónico: alex.bustillo@cafedecolombia.com

Introducción

En Colombia, la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari), se ha constituido en la principal plaga de la caficultura, debido a los graves daños que causa en los frutos, la disminución de su calidad, la reducción en el volumen de café para exportación y las pérdidas económicas del caficultor por la inversión en labores de control (Bustillo *et al.* 1998).

El integumento de los insectos, formado por la epidermis y la cutícula, tiene gran importancia en relación con su defensa y protección, al crear barreras contra la desecación y enfermedades. Además de proteínas y quitina contiene otros compuestos menores como precursores fenólicos de quinonas, ácidos grasos, ésteres de alcaloides y alcoholes grasos. (Ander sen 1979). Su estudio es importante para entender los mecanismos de virulencia de los distintos patógenos (Willis 1987, Khachatourians 1991). La composición del integumento de los insectos se ha explorado como fuente de nutrición de algunos hongos (Smith y Grulla 1981), por ejemplo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin puede germinar, penetrar la cutícula e invadir el hemocele de muchos insectos, lo que sugiere que las condiciones necesarias para estos procesos están presentes en los insectos susceptibles (Ferrón 1981, Khachatourians 1991). Los niveles de germinación, desarrollo micelial, producción de conidias y virulencia se han incrementado en *B. bassiana* al adicionar al medio de crecimiento cadáveres de insectos, manteniendo estas características después de varias transferencias en medios de cultivo sin los insectos (Elsufty 1983). La penetración se produce por un sistema enzimático de lipasas, proteasas y quitinasas liberadas al comienzo de la germinación de la espóra (Khachatourians 1991, St Leger *et al.* 1991).

Para el control de *H. hampei* dentro de un esquema de manejo integrado se recomienda el uso del *B. bassiana* (Bustillo 1998), el cual se ha convertido en un importante factor de mortalidad en los cafetales (Ruíz 1996). Los programas de control con este hongo buscan aislamientos altamente patogénicos, recomendándose para su producción reactivar el hongo sobre adultos vivos de *H. hampei* (Vélez *et al.* 1997). Sin embargo, esto requiere mantener una colonia del insecto lo cual retrasa y encarece el proceso. Una alternativa en este proceso sería el uso de integumento obtenido de material muerto de la broca del café. El objetivo de este trabajo fue determinar el incremento de la patogenicidad de aislamientos de *B. bassiana* a *H. hampei* utilizando integumento del insecto en el medio de cultivo.

Materiales y métodos

Obtención de las cepas y medios de cultivo

Se evaluaron los aislamientos de *B. bassiana* codificados como: Bb9007, proveniente de *Leptopharsa gibbicarina* (Stal), Bb9009 de *H. hampei*; Bb9015 de origen tailandés y hospedante desconocido y Bb9205 de *Diatraea saccharalis* (F.), los cuales se mantienen en el cepario de entomología de Cenicafé bajo refrigeración (4°C) en medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar (SDA). Para la recuperación y crecimiento del hongo se utilizó el medio SDA sólo y suplementado con integumento de broca. Para la preparación del medio de cultivo, se recolectaron brocas muertas de la unidad de cría de parasitoides de Cenicafé, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0,5%, se maceraron en una solución amortiguadora fosfato pH 7,0 y se esterilizó en autoclave a 120 lb de presión durante 20 min. Se usaron 0,5 g del macerado de broca, los cuales se adicionó a 100 ml del medio de cultivo SDA, posteriormente se esterilizó la mezcla. El medio se vertió en cajas de Petri de 9 cm de diámetro, colocando 12 ml de medio por caja.

Prueba de germinación

La viabilidad de las conidias de los aislamientos de *B. bassiana* se determinó al iniciar el experimento y después de aplicar los tratamientos. Inicialmente, la germinación se determinó en el medio Agar-Agua (AA) sin acidificar. Luego se cultivó el hongo en el medio SDA + integumento de broca y después de la esporulación se evaluó la germinación en los medios AA y SDA + integumento de broca. Las observaciones sobre germinación se realizaron a las 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas, después de la siembra, siguiendo la metodología descrita por Vélez *et al.* (1997).

Bioensayos de patogenicidad

En los bioensayos de patogenicidad se siguió el procedimiento descrito por González *et al.* (1993). La concentración del inóculo empleado fue de 1×10^7 esporas/ml y para cada tratamiento se utilizaron cuatro repeticiones de 10 brocas cada una. La mortalidad se evaluó diariamente durante 10 días con la ayuda de un estereoscopio. Las pruebas de patogenicidad se realizaron a los cuatro aislamientos antes y después de cultivar el hongo en el medio SDA + integumento, y al aislamiento Bb9205 subcultivado 10 veces, uno cada quince días, en medio de cultivo SDA + integumento. A cada subcultivo se le realizaron las pruebas de patogenicidad descritas. Con los resultados obtenidos se estimó el porcentaje de mortalidad de cada aislamiento, el tiempo promedio de mortalidad y el tiempo en el cual muere la mitad de la población (TM_{50}) de cada uno de los aislamientos.

Resultados y discusión

Crecimiento del hongo

En todos los tratamientos con *B. bassiana* cultivado en SDA + integumento de broca del café se observó un crecimiento más rápido y una producción más abundante de esporas, posiblemente, debido a los nutrientes aportados por el integumento, a diferencia del hongo cultivado solo en SDA, el cual alcanzó un menor desarrollo. Resultados similares fueron encontrados por Smith y Grula (1981), quienes registran un mayor crecimiento de *B. bassiana* cuando el medio de cultivo, contiene fuente de carbono, fracciones de integumento pulverizado, almidón o quitina.

Germinación

Los aislamientos de *B. bassiana* seleccionados para este estudio se recolectaron de una colección del hongo mantenida en refrigeración. Cuando se colocaron en el medio de cultivo Agar- Agar (AA) para su germinación, ésta fue nula a las 24 horas de incubación. Sin embargo, cuando el hongo se cultivó en SDA + integumento de broca, hubo germinación. Un nuevo subcultivo de estos aislamientos usando AA y SDA + integumento presentó una germinación mayor y más rápida usando el último medio (Cuadro 1). A las 24 horas de incubación, se observaron hifas más gruesas, largas y más oscuras. Estos resultados muestran que la germinación es más rápida cuando se utilizan sustratos enriquecidos, lo que se traduce en una mayor virulencia del patógeno, como se observó posteriormente. Esto ha sido comprobado por otros investigadores que han encontrado estímulo al proceso germinativo en otros hongos, al adicionar al medio de cultivo integumento de insectos (Al-Aidroos y Roberts 1978, Dillon y Charnley 1990, El Sayed *et al.* 1991, El Sayed *et al.* 1993a, 1993b).

Patogenicidad

Los resultados de mortalidad de los cuatro aislamientos evaluados se presentan en el Cuadro 2. Los diferentes aislamientos incrementaron su patogenicidad significativamente cuando se subcultivaron en el medio suplementado con integumento con respecto a los no suplementados con integumento. Este aumento varió entre 80 y 100% para todos los aislamientos. Resultados similares se han determinado con otros insectos y diferentes hongos (Hayden *et al.* 1992).

Después de subcultivar el aislamiento Bb9205 diez veces, con intervalos de 15 días, en el medio SDA + integumento, su patogenicidad se mantuvo entre 87,5% y 100% con un tiempo de mortalidad que varió entre 3,1 y 3,7 días (Cuadro 3). Este resultado coincide con los obtenidos por Elsufty (1983), quien informó que la virulencia de *B. bassiana* se incrementó a través de seis subcultivos en un medio enriquecido con larvas de insectos. St Leger *et al.* (1992), sugieren que la susceptibilidad o resistencia de un insecto a un hongo en particular, puede estar determinada por los componentes de la cutícula al inicio de la infección. Estos resultados son de gran utilidad, si se tiene en cuenta que los hongos entomopatógenos cultivados en medios no enriquecidos o carentes de insectos reducen su patogenicidad a través de pases sucesivos, como ha sido demostrado con los hongos *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Verticillium lecanii* por varios investigadores (Kawakami 1960, Schaerffenberg 1964, Fargues 1972, Nagaich 1973, Hall 1980, Morrow *et al.* 1989, Ignoffo *et al.* 1992).

Otro aspecto importante en el incremento de la patogenicidad, se debe a que *B. bassiana* produce muchas enzimas extracelulares en medios nutritivos tales como proteasa, lipasa y quitinasa, las cuales están in-

Cuadro 1. Germinación de cuatro aislamientos de *B. bassiana* recuperados en SDA suplementado con integumento de *H. hampei* varias horas después de su exposición en dos medios de cultivo.

Aislamiento recuperado	Medio de germinación	Horas de exposición y germinación (%)					
		4	8	12	16	20	24
9007	AA*	0	0	10,5	58,6	83,6	92
	SDA**+ integumento	0	0,3	23,1	70,7	92,1	100
9009	AA	0	0	10	45	62	73
	SDA + integumento	0	0	16	55	88	100
9015	AA	1,7	1,2	16,1	47,1	73,2	88,5
	SDA + integumento	2,2	3,2	28,8	67,3	88,8	100
9205	AA	0	1,3	16,2	62,4	83,5	96,1
	SDA + integumento	0	2,3	24,4	87,7	95,5	100

*AA= medio Agar- Agua

**SDA= medio Sabouraud Dextrosa Agar

Cuadro 2. Mortalidad promedio y tiempo promedio de mortalidad de *H. hampei* causado por cuatro aislamientos de *B. bassiana* en medio SDA sin ser suplementado con integumento de broca (a) y después de ser suplementado (d).

	Mortalidad (%)				Tiempo de mortalidad (días)			
	a		d		a		d	
	\bar{X}	$\pm DE$	\bar{X}	$\pm DE$	\bar{X}	$\pm DE$	\bar{X}	$\pm DE$
Bb9007	12,5	1,5	97,5	0,5	5,0	1,4	2,9	0,8
Bb9009	0	0	100	0	0	0	3,4	0,8
Bb9015	12,5	1,25	100	0	4,2	2,2	3,2	0,9
Bb9205	20,0	1,15	100	0	4,8	0,8	2,7	0,5

*DE= desviación estándar

volucradas en la penetración del integumento del hospedante y en consecuencia en la infección y su expresión está influenciada por la concentración de la cutícula y el origen de la misma en el medio de cultivo (St Leger *et al.* 1992, El Sayed 1993a).

Los resultados de este estudio comprueban que *B. bassiana* puede ser conservado en medio de cultivo suplementado con integumento de broca, para incrementar y mantener su patogenicidad, lo cual obviaría la necesidad actual de pasar por un proceso de reactivación en un bionensayo con colonias de broca del café, lo que resulta en un proceso más rápido y económico (González *et al.* 1993, Vélez *et al.* 1997).

Tiempo medio de mortalidad (TM₅₀)

La mortalidad de los adultos de broca, tratados con los cuatro aislamientos cultivados en SDA + integumento de broca, inició a los dos días con los aislamientos Bb9007 y Bb9205 y hasta el quinto día con Bb9009 y Bb9015, con un TM₅₀ entre 2,4 días (Bb9007) y 3,1 días (Bb9009) (Fig. 1). Cuando el hongo se cultivó solo en SDA la mortalidad no fue mayor al 20% (Cuadro 2).

Una tendencia similar en el TM₅₀ se presentó con el aislamiento Bb9205 subcultivado 10 veces sucesivamente en el medio SDA + integumento, el cual osciló entre 2,7 y 3,5 días, observándose que a medida que el hongo se desarrolla en este medio, disminuye el valor del TM₅₀ (Cuadro 3). La muerte rápida de la broca y la producción temprana de un gran número de esporas sobre el cadáver de insectos puede facilitar una mayor diseminación de la enfermedad sobre sus poblaciones (Heale *et al.* 1989). De acuerdo con Bidochka y Khachatourians (1990), las proteasas son, probablemente, las enzimas más importantes en la patogenicidad de un aislamiento y su ausencia conduce a la prolongación del tiempo de mortalidad.

Cuadro 3. Mortalidad promedio, tiempo promedio de mortalidad y TM₅₀ de adultos de *H. hampei* causada por *B. bassiana* (Bb9205) cultivado en SDA suplementado con integumento de broca durante 10 subcultivos.

Subcultivos de Bb9205	Mortalidad (%)		Tiempo promedio de mortalidad (días)		T
	\bar{X}	$\pm DE^*$	\bar{X}	$\pm DE$	TM ₅₀
	1°	87,5	1,5	3,7	0,9
2°	87,5	0,5	3,7	0,6	3,2
3°	87,5	1,5	3,4	0,8	3,0
4°	90,0	0,5	3,4	1,1	2,9
5°	90,0	1,0	3,6	0,8	3,0
6°	97,5	0,5	3,5	0,6	3,1
7°	92,5	1,0	3,1	1,1	2,8
8°	100	0	3,4	0,6	2,8
9°	87,5	1,9	3,7	0,8	3,1
10°	97,5	0,5	3,3	0,4	2,7

*DE= desviación estándar

Estos resultados sugieren que es posible que la mayoría de los aislamientos de *B. bassiana* puedan causar altas mortalidades a la broca del café si a través de su cultivo se le proporciona el sustrato requerido para su desarrollo e inducir así, las enzimas requeridas en el proceso de patogenicidad, lo cual contribuirá en la formulación de un producto con mejores características biológicas y consecuentemente en un mayor control de *H. hampei*.

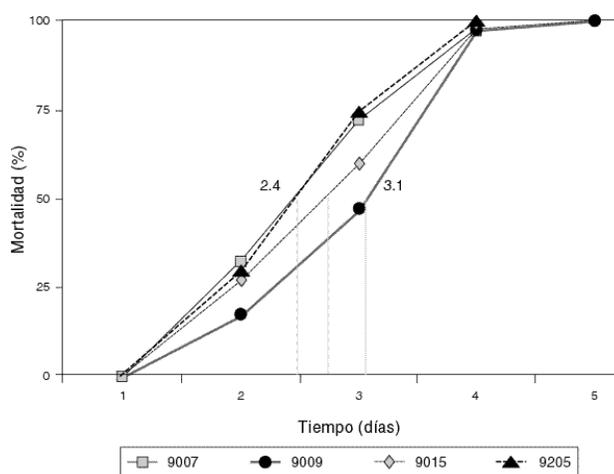


Figura 1. Mortalidad acumulada y tiempo medio de mortalidad (TM₅₀) de *H. hampei* causada por cuatro aislamientos de *B. bassiana* después de subcultivos en medio SDA + integumento de broca.

Literatura citada

- Al-Aidroos, K; Roberts, DW. 1978. Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increased virulence towards mosquito larvae. Canadian Journal of Genet.Cytol.,20:211-219.
- Andersen, SO. 1979. Biochemistry of insect cuticle. Annual Review of Entomology 24 (1):29-61.
- Bidochka, MJ; Khachatourians, GG. 1990. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factors in pathogenicity towards the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. Journal of Invertebrate Pathology 56:362-370.
- Bustillo, AE. 1998. Control of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, by fungal pesticides in Colombia. In Internac. Workshop. on Biotechnology for crop protection – Its potential for developing countries (1996, Berlin, Germany).Proceedings. (ZEL)- Feldafing/Zschortau p. 219 – 229.
- Bustillo, AE;Cárdenas, R; Villalba, DA.; Benavides, P;Orozco, J; Posada, FJ. 1998. Manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. Chinchiná, Colombia,Cenicafé.134 p.
- Dillon, RJ; Charnley, AK. 1990. Initiation of germination in conidia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Mycological Research 94 (3):299-304
- El Sayed, GN;Ignoffo, CM;Leathers,TD. 1991.Effects of cuticle source and concentration on germination of conidia of two isolates of *Nomuraea rileyi*. Mycopathologia 113 (1): 95-102.
- El Sayed, GN; Ignoffo, CM; Leathers, TD; Gupta, SC. 1993a. Cuticular and non-cuticular substrate influence on expression of cuticle-degrading enzymes from conidia of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. Mycopathologia 122 (1):79-87
- El Sayed, GN; Ignoffo, CM; Leathers, TD; Gupta, SC. 1993b. Effects of cuticle source and concentration on expression of hydrolytic enzymes by an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. Mycopathologia 122:149-152.
- Elsufty, R. 1983. Enhanced culture of *Beauveria bassiana* by incorporation of insect material into the growth medium. Journal of Agricultural Research 9:871-879.
- Fargues,J. 1972.Étude des conditions d' infection des larves de doryphore, *Leptinotarsa decemlineata* Say, par *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.Entomophaga 17 (4):319-337.
- Ferrón, P. 1981. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In Burges, HD. Ed. Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. London, Academic Press. p. 465-482.
- González G, MT; Posada, FJ; Bustillo, AE. 1993. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. Cenicafé (Colombia) 44(3):93-102.
- Hall, RA. 1980. Effect of repeated subculturing on agar and passaging through and insect host on pathogenicity, morphology and growth rate of *Verticillium lecanii*. Journal of Invertebrate Pathology 36:216-222.
- Hayden, TP; Bidochka, MJ; Khachatourians, GG. 1992. Entomopathogenicity of several fungi towards the english grain aphid (Homoptera: Aphidae) and enhancement of virulence with host passage of *Paecilomyces farinosus*. Journal Economic Entomology 85 (1):58-64.
- Heale, JB; Isaac, JE; Chandler, D. 1989. Prospects for strain improvement in entomopathogenic fungi. Pesticide Science 26 (1):79-92.
- Ignoffo, CM; Puttler, B; Hosteller, DL; Dickersos, WA. 1992. Effects of successive *in vitro* and *in vivo* passages on the virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. Entomophaga 27 (4):371-378.
- Kawakami, K. 1960. On the changes of characteristics of the silkworm muscardines through successive cultures. Bulletin Sericultural Experimental Station (Japón) 16: 83-99.
- Khachatourians, G. G. 1991. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. In Aurora, DK; Ajello, A; Mukerji, KG. Eds. Handbook of Applied Mycology. Humans, Animals and Insects. New York, Marcel Dekker. Vol. 2 p.613-661.
- Morrow, BJ; Boucias, DG; Heath, MA. 1989. Loss of virulence in an isolate of an entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*, after serial *in vitro* passage. Journal of Economic Entomology 82 (2):404-407.
- Nagaich, BB. 1973. *Verticillium* species pathogenic on aphids. Indian Journal of Phytopathology 26:163-165.
- Ruiz C, R. 1996.Efecto de la fenología del fruto de café sobre los parámetros de la tabla de vida de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Tesis Ing. Agr. Manizales Colombia, Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuarias. 87p.
- Schaerffenberg, B. 1964. Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria* and *Metarhizium*. Journal of Insect Pathology 6 (1): 8-20.
- St. Leger, RJ; Goetlel, M; Roberts, DW; Staples, RC. 1991. Prepenetration events during infection of host cuticle by *M. anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology 58 (2):168-179.
- St. Leger, RJ; Frank, DC; Roberts, DW; Saples, RC. 1992. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading-protease structural gene from entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. European Journal of Geochemistry 204:991-1001.
- Smith, RJ;Gruha,EA.1981.Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology 37 (2):222-230.
- Willis, JH. 1987. Cuticular proteins: The neglected component. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 6 (2): 203-215.
- Vélez, PE; Posada, FJ; Marín, P; González, MT; Osorio, E; Bustillo, AE. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Chinchiná, Colombia, Cenicafé. 37p. Boletín Técnico no 17.