

Hoja TECNICA

No. 40

CATIE



¿Cómo reactivar la virulencia de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café?

Alex E. Bustillo P.¹
Patricia Marin M¹

Para desarrollar programas de control de insectos plagas mediante hongos entomopatógenos es necesario obtener formulaciones que conserven sus características biológicas al ser utilizadas en el campo (Alves y Pereira 1998). La producción industrial de estos hongos se debe iniciar con un organismo cuya viabilidad y eficacia asegure la calidad del producto final, para ello se requiere que estos se pasen o reactiven sobre el insecto al cual van dirigidos y así conservar sus propiedades patogénicas y su virulencia (Aizawa 1971, Wasti y Hartmann 1975, Fargues y Robert 1983, Moore y Prior 1993). Este es el caso de la broca del café (*Hypothenemus hampei*, Ferrari) para el cual se ha demostrado que el cultivo sucesivo de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, en un sustrato sintético o sobre un cereal como arroz, reduce la virulencia del hongo (Cenicafé 1993a).

Existen muchos procesos de laboratorio documentados en la literatura (Alves *et al.* 1998) para trabajar con insectos, pero muy poca información sobre los detalles para la reactivación o incremento de la virulencia de hongos a partir de insectos sanos. El proceso de reactivación de la virulencia del hongo no es difícil pero hay que tener acceso a colonias sanas del insecto en estudio y un equipo básico de materiales y elementos en un área aséptica para evitar la contami-

nación. Un programa de investigación con entomopatógenos implica la necesidad inicial de obtener los aislamientos más eficientes y el desarrollo de un bioensayo confiable que permita la selección del mejor entomopatógeno sobre el hospedante a controlar (González *et al.* 1993, Prior *et al.* 1995).

Es posible seleccionar un aislamiento de un entomopatógeno por especificidad y mayor virulencia a partir de cultivos multiespóricos, realizando pases sucesivos sobre el insecto de interés. La reactivación se puede hacer aún en sitios distintos a laboratorios, como cocinas de fincas cafeteras pero guardando la mayor asepsia posible, como es el caso de hongos producidos en fincas o por cooperativas cafeteras, en los cuales se reemplazan algunos de los elementos necesarios por otros menos costosos o más asequibles al productor (Antía *et al.* 1992, Cenicafé 1993b). En Colombia, recientemente se han desarrollado técnicas para el control de calidad de formulaciones de entomopatógenos que permiten dar seguimiento a los laboratorios (Vélez *et al.* 1997). Los procesos sobre almacenamiento y preservación de la virulencia de los hongos entomopatógenos en diferentes sustratos han sido recientemente estudiados por Alves *et al.* (1996) y Bahamon *et al.* (2001).

¹ Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé, Caldas, Colombia. alex.bustillo@cafedecolombia.com, patricia.marin@cafedecolombia.com

Necesidades

Para la reactivación de la virulencia de *B. bassiana* sobre adultos de *H. hampei*, se necesita lo siguiente: una área aséptica de trabajo, hipoclorito de sodio comercial al 5,25%, (Hipoclor®, Clorox®, etc.), alcohol de 70° y 90°, adultos de *H. hampei* activos, cajas plásticas tipo galletera (17cm x 11cm x 7cm), papel toalla o papel filtro, agua destilada estéril (ADE), "beaker" de 250 ml, botellas de licor planas de boca angosta y 375 cc de capacidad, cajas Petri, mecheros de gas o alcohol, olla autoclave ó autoclave horizontal, pinceles #1, pipetas de 1 y 10 ml y tubos de ensayo de 20 ml con tapa rosca, medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), arroz de buena calidad, cultivo puro de *B. bassiana*.

Procedimiento

Para reactivar la virulencia de *B. bassiana* sobre la broca del café se procede como se describe a continuación:

- 1) Se limpia el área donde se va a trabajar con hipoclorito de sodio o alcohol antiséptico (70°). Inmediatamente después se prenden los mecheros que se van a utilizar.
- 2) Para la inoculación con el hongo se deben seleccionar brocas adultas recién emergidas de una colonia de laboratorio, que muestren gran actividad, las cuales se transportan en cajas plásticas a las que se les adiciona papel picado para evitar su mutilación. Este material biológico se debe utilizar lo más rápido posible. Los cultivos de los hongos entomopatógenos que se van a utilizar deben estar libres de contaminantes (Fig. 1).
- 3) Los beakers, cajas Petri, el ADE, papel filtro y demás material necesario se esterilizan en un autoclave a 121 °C a 15 libras de presión durante 15 min. El medio SDA se prepara usando 65 g en 1 L de agua y disolviéndolo al calor. Se vierte en tubos de ensayo, 8 ml en cada tubo; si se usan botellas planas se adicionan 50 ml del medio. Para preparar las botellas con sustrato de arroz se agregan 50 g de arroz y 50 ml de agua. Luego estos medios se esterilizan en autoclave de la forma antes descrita. Para su solidificación, los tubos se colocan en forma inclinada y las botellas horizontalmente. También se puede preparar el SDA en cajas Petri esterilizadas, adicionando 15 ml del medio previamente esterilizado cuando alcance una temperatura de ± 40 °C.

- 4) Las brocas se desinfectan con hipoclorito de sodio al 0,5%, que se prepara tomando 10 ml del producto comercial de una concentración del 5,25% y se diluye con ADE hasta alcanzar un volumen de 100 ml.
- 5) Las brocas se sumergen durante 10 min en la solución de hipoclorito de sodio, se pasan a través de una tela fina (tul), se lavan tres veces con abundante ADE (Fig. 2).
Luego se colocan en papel toalla esterilizada, para eliminar el exceso de agua, con la ayuda de un pincel, se escogen 50 brocas activas y se pasan a una caja Petri esterilizada (Fig. 3).
- 6) Posteriormente, las brocas se inoculan por inmersión durante 2 min en 10 ml de la suspensión del hongo a una concentración de 1×10^8 conidios/ml. Luego las brocas se pasan a una caja Petri o recipiente adecuado, que tenga en su interior una toalla de papel esterilizada la cual debe permanecer húmeda para facilitar el desarrollo del hongo sobre el insecto. Las cajas se deben sellar con un plástico adhesivo Vinilpel® ó cinta adhesiva Tesa® (Fig. 4).
- 7) Después de 6 a 10 días, es decir, cuando el hongo se ha desarrollado completamente sobre el cuerpo de la broca (Fig. 5), estas se toman individualmente con un pincel esterilizado o desinfectado con alcohol antiséptico, se someten a una nueva desinfección superficial con hipoclorito de sodio comercial al 5,25% por 1 min y sin lavar se colocan inmediatamente sobre papel filtro o toalla previamente esterilizado para retirar el exceso de hipoclorito de sodio.
- 8) Luego las brocas se introducen individualmente en el centro de tubos de ensayo con el medio de cultivo SDA inclinado, ó en cajas Petri. En las botellas con sustrato de arroz esterilizado, se colocan tres brocas por botella (Fig. 6).

Cuando el hongo invade totalmente el medio (Fig. 7), las esporas se suspenden asépticamente en ADE, a la cual se le adiciona "Tween 80" al 0,1% para lograr su separación. Esto se hace en tubos de ensayo con tapa rosca o en beakers de 250 ml. La suspensión de conidios se utiliza para preparar los "cultivos madre" (los que servirán para reproducir el hongo); adicionando 1 ml con una pipeta o con una jeringa estéril en botellas planas de 375 ml con SDA ó sustrato de arroz, preparados como se describe en punto 3. Estos cultivos madre son los que se utilizan para iniciar cualquier proceso de producción masiva, tanto artesanal como industrial (Fig. 8).

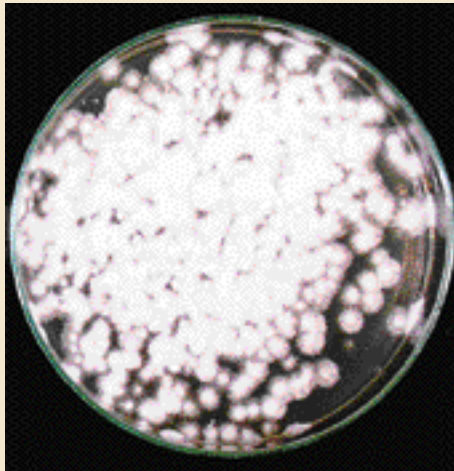


Figura 1.
Cultivo puro
del hongo
B. bassiana.

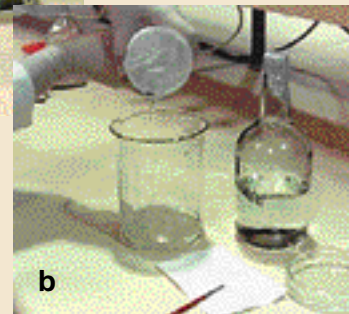
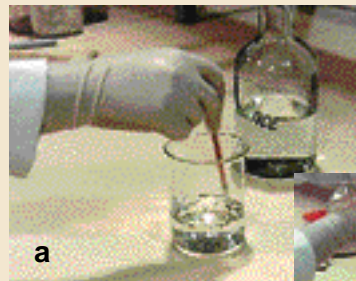


Figura 2. Desinfección
de las brocas, a)
inmersión en una
solución de hipoclorito
de sodio; b) remoción
del hipoclorito con agua
destilada estéril.

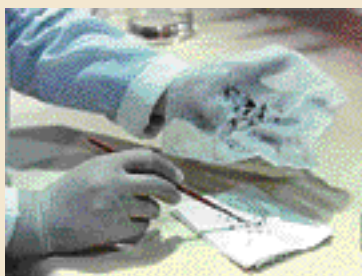


Figura 3. Secado de
las brocas sobre
papel toalla estéril.



Figura 4. Infección de
adultos de broca con el
hongo; a) adición de la
suspensión del hongo
sobre adultos de brocas; b)
traspaso de las brocas de
la tela de tul a una caja de
Petri, con papel toalla
humedecido para favorecer
la infección del hongo.

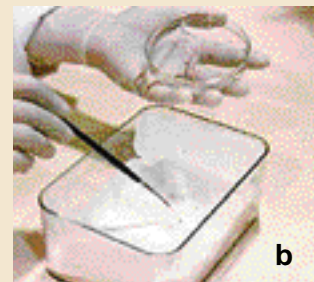


Figura 5. Adulto de
broca del café
infectado con el
hongo *B. bassiana*.



Figura 6.
Inoculación del
hongo usando
insectos infectados,
a) siembra en una
caja de Petri con
medio SDA; b)
siembra en una
botella con sustrato
de arroz.

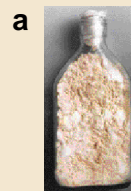


Figura 7. Apariencia del hongo *B. bassiana* reactivado en broca, (a), cultivado en sustrato de arroz, (b) en un tubo de ensayo con SDA.

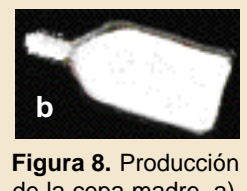


Figura 8. Producción
de la cepa madre. a)
Inoculación en SDA con suspensión del hongo reactivado
en broca, b) desarrollo del hongo *B. bassiana* en SDA
después de ocho días de inoculación.

Consideraciones finales

El procedimiento descrito se puede seguir para aislar y reactivar la virulencia de hongos entomopatógenos que afectan muchas especies de insectos,

con fines de investigación y/o producción masiva para ser utilizados comercialmente, haciendo las variaciones pertinentes de acuerdo al insecto en estudio.

Literatura citada

- Aizawa, K. 1971. Strain improvement and preservation of virulence of pathogens. In Burges, HD; Hussey, NW Ed. Microbial control of insects and mites. London, Academic Press. p. 655-672.
- Alves, SB; Almeida, JEM; Moino Junior, A; Alves, LFA. 1998. Técnicas de laboratorio. In Alves, SB. Ed. Controle microbiano de insetos. 2. ed. Piracicaba, Brasil, FEALQ. p. 637-711.
- Alves, SB; Pereira, RM. 1998. Producao de fungos entomopatogenicos. In Alves, SB. Ed. Controle microbiano de insetos. 2. ed. Piracicaba, Brasil, FEALQ. p. 845-869.
- Alves, SB; Pereira, RM; Stimac, JL; Viera, SA. 1996. Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia after prolonged storage at low, above freezing temperatures. Biocontrol Science and Technology 6 (4):575-585.
- Antía, OP; Posada, FJ; Bustillo, AE; González, MT. 1992. Producción en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. Avances Técnicos Cenicafé No. 182:1-12.
- Bahamón, T; Aycardi, E; Orozco, J; Marin, P; Bustillo, AE. 2001. Preservación de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Moniliales: Moniliaceae) contra la broca del café en diferentes sistemas. Revista Colombiana de Biotecnología 3 (1):80-90.
- CENICAFE (Centro Nacional de Investigaciones de Café). 1993a. Pérdida de virulencia del hongo *Beauveria bassiana* cultivado sucesivamente en sustrato de arroz. Brocarta No. 14.2 p.
- CENICAFE (Centro Nacional de Investigaciones de Café). 1993b. ¿Cómo aislar el hongo *Beauveria bassiana* directamente de la broca?. Brocarta No. 8.2 p.
- Fargues, JF; Robert, PH. 1983. Effects of passaging through scarabid hosts on virulence and host specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. Canadian Journal of Microbiology 29 (5): 576-583.
- González, MT; Posada, FJ; Bustillo, AE. 1993. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. Revista Cenicafé (Colombia) 44 (3):93-102.
- Moore, D; Prior, C. 1993. The potential of mycoinsecticides. Biocontrol News and Information, 14:31N - 40N.
- Prior, C; Carey, M; Abraham, YJ; Moore, D; Bateman, RP. 1995. Development of a bioassay method for the selection of entomopathogenic fungi virulent to the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.) Journal of Applied Entomology 119:567-573.
- Wasti, SS; Hartmann, GC. 1975. Experimental parasitization of larvae of the gypsy moth, *Porthetria dispar* L., with the entomogenous fungus, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. Parasitology 70:341-346.
- Vélez, PE; Posada, FJ; Marín, P; Bustillo, AE; González, MT; Osorio, E; 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Chinchiná, Cenicafé. 37 p. (Boletín Técnico N° 17).