

# Efecto de la toxina beauvericina sobre *Hypothenemus hampei*

Jorge W. Arboleda V.<sup>1</sup>  
Fernando Delgado B.<sup>2</sup>  
Arnubio Valencia J.<sup>3</sup>

**RESUMEN.** El estudio de la toxina beauvericina (BEA) producida por *Beauveria bassiana* es de suma importancia en el ámbito entomológico, no solo porque este organismo forma parte del control biológico de muchos insectos plaga, sino también porque este tipo de biomoléculas tóxicas participa activamente en los mecanismos de infección de hongos entomopatógenos. En este estudio, se evaluó el efecto de la BEA sobre larvas de primer instar y adultos de *Hypothenemus hampei*, por inmersión y aplicación tópica, respectivamente, utilizando concentraciones de 25, 50 y 75 ng/ml de toxina al 1, 3 y 5 día. Los bioensayos se incubaron en un cuarto climatizado, a 27 °C ± 1° y HR de 75 - 80%, y se realizaron evaluaciones diarias de mortalidad y desplazamiento de los individuos. Los resultados muestran que no hubo diferencia estadística significativa en el efecto de la toxina sobre adultos, pero sí en los efectos sobre larvas de primer instar. Se sugiere que la acción de la BEA fue más activa en larvas que en adultos; alcanzando mortalidades inferiores al 10% al día 1 de evaluación, mayores al 30% para los días 3 y 5, y superiores al 50% al día 8.

**Palabras clave:** BEA, broca del café, micotoxina, *Beauveria bassiana*.

**ABSTRACT. Effect of the toxin beauvericin on *Hypothenemus hampei*.** Beauvericin (BEA) is a toxin produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, a pathogenic agent used in the biological control of plagues. It has been demonstrated that this toxin is involved during the infection process of the host insect by *B. bassiana*. In this study, the effect of beauvericin was evaluated by immersion and topical application on larvae and adults of *Hypothenemus hampei*, respectively, by using concentrations of 25, 50 and 75 ng/ml of toxin in days 1, 3 and 5. The bioassays were incubated at 27 ± 1°C and a RH of between 75-80%. Mortality and individual displacement were evaluated daily. Results did not show significant statistical difference of the toxic effect on adults, but effects on first instar larvae were detected. These results suggest that the toxic effect of BEA was more effective on larvae than on the adults, showing a mortality rate of less than 10% on day 1, more than 30% on days 3 and 5, and more than 50% on day 8.

**Keywords:** BEA, coffee berry borer, mycotoxin, *Beauveria bassiana*.

## Introducción

El cultivo del café constituye uno de los sectores más amplios de la economía de Colombia. Este producto genera grandes fuentes de empleo al sector agroindustrial, y su participación en mercados nacionales e internacionales sitúa al país como uno de los más competitivos en esta área, cuya característica se atribuye al cultivo no sólo de diferentes variedades, sino también al manejo y beneficio de las cosechas.

En los últimos años, el café se ha visto seriamente afectado por la aparición de plagas que deterioran tanto la calidad como la producción en un buen número de hectáreas del cultivo. Actualmente, los centros de investigación y el gremio cafetalero en general centran su atención en el estudio y control de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), insecto coleóptero que ingresó a Colombia

<sup>1</sup> Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFE). Apartado 2427 Manizales, Caldas, Colombia. JorgeWilliam.Arboleda@cafedecolombia.com

<sup>2</sup> Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFE). Apartado 2427 Manizales, Caldas, Colombia. fdelgado@ucaticolcamz.edu.co

<sup>3</sup> Departamento de Química. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas. Apartado 275, Manizales. Colombia. arnubio@laciudad.com

en 1988, proveniente de Brasil y Ecuador. Este insecto ataca el grano del café donde deposita sus huevos y se reproduce en forma masiva; el daño se traduce en serios problemas económicos, expresados en la disminución de la producción de café y las exportaciones del mismo (Bustillo *et al.* 1998). Uno de sus métodos de combate consiste en la utilización de hongos entomopatógenos para el control de plagas (Ferrón 1981), aspecto que recibe cada día mayor atención debido a sus efectos sobre el insecto.

Uno de los factores relevantes durante el proceso de infección llevado a cabo por los hongos entomopatógenos es la acción enzimática que se presenta sobre la cutícula del insecto, la cual facilita la degradación de los substratos cuticulares y la producción de micotoxinas, como la beauvericina. Este ciclopéptido juega un papel importante en la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre el insecto, dado que, al parecer, determina la capacidad real del hongo para afectar de manera negativa al insecto y bloquear sus mecanismos de respuesta inmunológica (Vey *et al.* 1985, Ignoffo y Mandava 1988, Eyal *et al.* 1994).

El hongo *B. bassiana* produce la beauvericina (BEA), una toxina bioactiva de naturaleza peptídica, a la que se le atribuyen propiedades insecticidas y antimicrobiales (Thakur y Smith 1997, Nilanonta *et al.* 2000). En 1973, Zacharuk observó que existe una relación directa entre la cantidad de toxina y la patogenicidad producida por el hongo, causando en el huésped la degeneración progresiva de los tejidos, cambios estructurales de las membranas y deshidratación. Asimismo, se evidencian cambios en la actividad eléctrica de los nervios causada por el incremento del consumo de oxígeno en un intento del insecto por restablecerse (Evlakhova y Rakitin 1968). Zizca y Weiser (1993) probaron el efecto de la beauvericina sobre larvas de *Culex pipiens*, encontrando que aun con bajas concentraciones de la toxina (0,1 mg/ml) aplicadas tópicamente sobre el

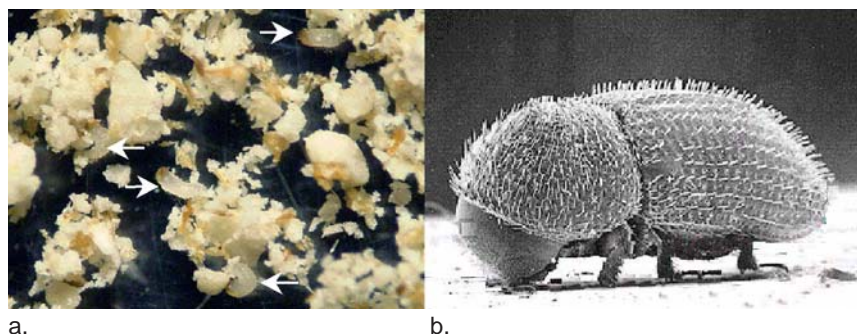
insecto, se obtiene una mortalidad del 44% en 48 horas. De igual forma, encontraron que el principal síntoma de intoxicación presentado fue la vacuolización generalizada y el efecto tóxico en las mitocondrias, las cuales se hincharon y tomaron el aspecto de vacuolas esféricas; además, la cromatina de los núcleos se concentró en forma de gránulos alargados a lo largo de la membrana nuclear, siendo más afectado el epitelio de las moscas y rompiéndose la membrana basal.

La necesidad de encontrar o desarrollar un mejor bioinsecticida contra la broca del café a partir de *B. bassiana* exige un análisis detenido de los mecanismos de patogenicidad de este hongo; en especial, la participación de la toxina en el proceso degenerativo que se lleva a cabo en el insecto tratado con ella. Por tal motivo, en éste estudio se pretende evaluar el efecto de la BEA sobre adultos jóvenes de *H. hampei* y larvas de primer instar.

## Materiales y métodos

Se utilizaron larvas de primer instar y adultos recién emergidos de *H. hampei*, procedentes de la unidad de cría de parasitoides adscrita a la disciplina de entomología del Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFE) (Fig. 1a). Las larvas y adultos del insecto se obtuvieron por disección de granos de café pergamino seco, mantenidos en la oscuridad a 25°C y HR de 75%. Se seleccionaron los adultos que mostraron mayor actividad de vuelo en la colonia (Fig. 1b).

Para la desinfección de las brocas, los adultos activos seleccionados de la colonia se sumergieron durante 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%; se lavaron 3 veces con agua destilada estéril (ADE) y, posteriormente, fueron separados con una malla de muselina. Con la ayuda de un pincel y una toalla estéril, se retiraron los individuos y se secaron durante 2 minutos a temperatura ambiente.



**Figura 1.** a. Larvas de primer instar de *Hypothenemus hampei* consumiendo café molido. b. Adulto recién emergido.

Se disolvió BEA (cyclo(D-alpha-Hydroxyisovaleryl-L-N-methyl-Phe)<sub>3</sub>) comercial obtenida de Sigma Chemical co. B7510, con masa molecular de 784 y una pureza del 97%, se disolvió inicialmente con metanol puro (Sigma 2001) y, posteriormente, se prepararon soluciones de la toxina a concentraciones de 25, 50 y 75 ng/ml en una mezcla de metanol y agua destilada estéril (30:70). Estas soluciones se aplicaron sobre los adultos y las larvas.

Para el montaje de los ensayos de toxicidad en los adultos, se utilizó una metodología modificada de Vélez *et al.* (1997), mediante la cual se transfirieron los insectos con pinceles estériles en forma individual a viales de vidrio que contenían tres discos de papel húmedo y una mota de algodón estéril a manera de tapa. Se distribuyeron los insectos en cajas plásticas en grupos de 15 individuos, y se realizaron tres aplicaciones tópicas de 2 µl a cada insecto en la parte posterior del tórax, utilizando concentraciones de 25, 50 y 75 ng/ml al 1, 3 y 5 día. Los controles se trataron con aplicación tópica de metanol/agua (30:70) y sin ella. Se depositaron 10 larvas de primer instar de *H. hampei* en cajas de Petri completamente estériles, que contenían 0,5 gramos de café molido; cada una de ellas fue inmersa durante 1' en una solución que contenía 25, 50 y 75 ng/ml de la toxina, al 1, 3 y 5 día. Los controles se trataron con inmersión y sin ella en una mezcla de metanol y agua (30:70). Ambos bioensayos fueron incubados en un cuarto climatizado a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  y HR del 80%.

Para el bioensayo con adultos de *H. hampei*, la unidad experimental constó de 15 viales de vidrio, con cuatro repeticiones por tratamiento distribuidos en dos cajas plásticas que contenían papel toalla para conservar la humedad. En el bioensayo con las larvas de primer instar fueron usados 10 individuos por caja de Petri como unidad experimental, usando tres repeticiones para todos los tratamientos. Para ambos bioensayos, la variable por evaluar fue el porcentaje de mortalidad en diferentes tiempos y, cualitativamente, el comportamiento de los individuos observados por microscopía de luz.

Las evaluaciones de la mortalidad se realizaron durante 20 días, registrando la mortalidad diaria y el desplazamiento de los individuos mediante microscopía óptica de luz. Se calcularon los porcentajes de mortalidad para los 3, 5, 10 y 15 días en insectos adultos y a los 1, 3, 5 y 8 días para las larvas de primer instar. Los individuos se consideraban muertos cuando al

ser observados por el microscopio no presentaban desplazamiento ni respondían a estímulos físicos con el pincel. Además, se evaluaron los individuos muertos por ahogamiento y los contaminados con hongos entomopatógenos. La actividad biológica de la toxina se determinó mediante tres aplicaciones tópicas de 2 µl con una solución de 75 ng/ml, la cual había sido sometida previamente a ebullición durante 10 minutos.

## Resultados y discusión

Existen dos formas por las cuales un producto químico puede penetrar el cuerpo de un insecto: por ingestión directa a través del tubo digestivo, o por los intersticios y poros presentes en la cutícula (Perrot 1996). Por eso, la metodología para la aplicación de la toxina en ambos bioensayos es apropiada y recomendada para estudiar el efecto de la beauvericina sobre larvas de primer instar y adultos de *H. hampei*, porque se obtuvieron resultados similares a los de modelos de campo derivados de las dinámicas de penetración de los insecticidas. Es importante tener en cuenta que para que un producto insecticida sea considerado en el manejo integrado de plagas, su aplicación tópica requiere de la incorporación de otros factores, tales como luz, clima, temperatura y humedad (Stark *et al.* 1995). Por otro lado, este estudio permite conocer aún más la acción insecticida de la BEA y su potencial uso en programas de transformación genética de café.

Al iniciar los bioensayos, los adultos de la broca del café mostraron permanente actividad motora y de desplazamiento, la cual fue disminuyendo gradualmente. En este caso, no se observaron signos de parálisis en los insectos después de cada aplicación de la toxina. Los insectos tratados con 25 ng/ml presentaron una mortalidad de 8,47% y 28,21% al 3 y 10 día, respectivamente. En los insectos tratados con 50 ng/ml no se detectó ningún efecto de mortalidad, pero en el tratamiento de 75 ng/ml se presentó mortalidad al 3, 5 y 10 día, siendo más baja que en el testigo para el día 15 (Cuadro 1).

No se detectaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos y el testigo, lo que denota ausencia de efecto de la toxina. Lo anterior muestra una alta variación de la mortalidad en el bioensayo, lo cual puede deberse a la escasa penetración de la toxina, por factores como la fuerte esclerotización de los adultos de broca, sumada a la pérdida del producto por absorción o evaporación, aspecto diferente al que se presenta en larvas, donde una mayor

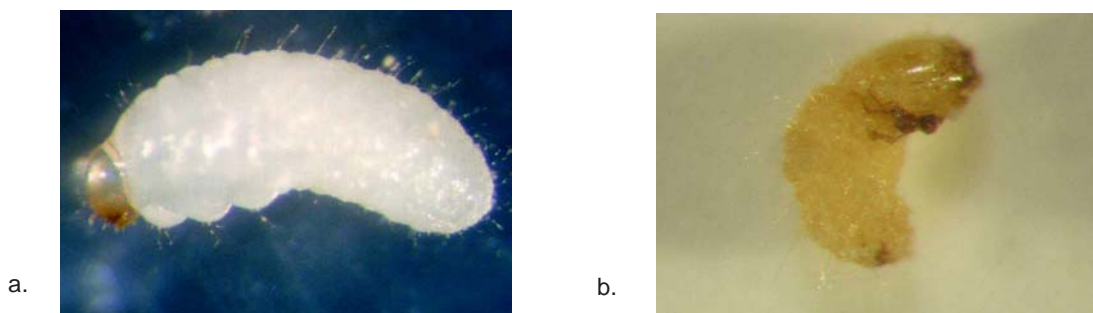
presencia de proteínas debilita la cutícula, permitiendo la penetración de los productos (Miller 1980).

Durante el bioensayo con adultos, se registró un porcentaje de mortalidad por *B. bassiana* del 1,15% y 0,25% por *Aspergillus* sp., y 0,51% de mortalidad debida a otras causas.

Durante el bioensayo con larvas de primer instar, estas presentaron signos de parálisis y escasa actividad motora. Con el tiempo, las larvas de color blanco lechoso se tornaron amarillas y posteriormente tomaron un color pardo oscuro en todo el cuerpo (Baker 1999) (Fig. 2a). Asimismo, se observó crecimiento de la cápsula cefálica, acortamiento de los segmentos abdominales, disminución del tamaño de la larva tratada y, por último, su muerte (Fig. 2b). Estos resultados son similares a los re-

portados por París y Ferrón (1981) sobre parálisis y muerte en larvas de *Bombix mori*, evaluando el efecto de la toxinas destruxina B y protodestruixina (Suzuki y Tamura 1972), ambas obtenidas de *Metarhizium anisopliae*.

En larvas de primer instar, se observó a las 24 horas (día 1) un incremento en la mortalidad, directamente proporcional a la concentración usada. Este fue el caso contrario a lo sucedido el día 3, donde no se presentaron diferencias entre tratamientos, pero sí diferencias significativas con respecto al testigo para todos los días. La mayor mortalidad acumulada fue de 53,33% al día 8, correspondiente con el tratamiento de 25 ng/ml con tres aplicaciones, pero este valor no difiere estadísticamente de los demás tratamientos en sus respectivas frecuencias (Cuadro 2).



**Figura 2.** Larvas de primer instar de *Hypothenemus hampei* a. Sin tratar. b. Tratada con 75 ng/ml de una solución de beauvericina (BEA).

**Cuadro 1.** Mortalidad de adultos de *Hypothenemus hampei* durante los días de evaluación.

Día de evaluación	N° de aplicaciones	Mortalidad (%)			Control (metanol y agua 30:70)
		25 ng/ml	50 ng/ml	75 ng/ml	
3	1	3,87366	1,89707	1,27183	2,03830
5	1	8,47343	3,42132	3,81550	2,98249
	2	4,50535	2,00535	0	1,78562
10	1	20,31845	8,24500	17,84971	13,50618
	2	2,22779	9,04264	0,00170	9,09044
	3	28,21127	8,92862	3,57066	3,57124
15	1	29,19129	19,24044	17,84971	31,50090
	2	25,61410	13,87885	8,06528	27,73732
	3	28,21127	14,74192	25,08039	9,96796

**Cuadro 2.** Mortalidad de larvas de primer instar de *Hypothenemus hampei* durante los días de evaluación.

Día de evaluación	N° de aplicaciones	Mortalidad (%)			Control (metanol y agua 30:70)
		25 ng/ml	50 ng/ml	75 ng/ml	
1	1	2,22222	2,22222	4,44444	1,11111
3	1	25,38586	21,82265	18,40450	2,46579
5	1	32,14290	32,14290	17,85710	1,19048
	2	27,73810	18,45238	18,67820	3,10345
8	1	46,42857	50	42,857143	11,30952
	2	50	42,85714	25	7,14286
	3	53,33333	50	36,66667	10

El efecto de la beauvericina ya ha sido evaluado previamente sobre larvas de otros insectos y sobre bacterias, haciendo uso de diferentes métodos de aplicación: por aspersión en hojas contra *Leptinotarsa decemlineata* (Gupta *et al.* 1991); con pruebas directas en líneas celulares de *Aedes albopictus* (Uribe *et al.* 1997); y a través de bioensayos de toxicidad sobre bacterias (Castlebury *et al.* 1999). En todos los casos, las alteraciones morfológicas fueron similares a las reportadas en este estudio con larvas de primer instar de *H. hampei*. Estudios similares evaluaron el efecto de destruxina B sobre larvas de *Galleria mellonella*, presentando una mortalidad del 50% (Tamura y Suzuki 1978, Paris *et al.* 1981). Aplicaciones tópicas de la misma toxina sobre larvas de *C. pipiens* mostraron porcentajes de mortalidad similares (Tamura y Takahashi 1971).

Los resultados de este estudio indican que, además de la acción enzimática que ejercen los hongos patogénicos como *B. bassiana* sobre *H. hampei* (Delgado *et al.* 2001), las toxinas que estos organismos producen cumplen una función muy importante dentro de los mecanismos de infección de los hongos entomopatógenos (Kucera 1971), en virtud del incremento en la mortalidad a través del tiempo para todos los tratamientos sobre larvas de primer instar; así como por su poca movilidad y los cambios en la coloración de las larvas tratadas, posiblemente por la presencia de la toxina en sus tejidos.

Se considera que factores como el grosor de la cutícula, la presencia de melanina, la fuerte esclerotización en coleópteros adultos, la detoxicación de la mo-

lécula y la mayor permeabilidad de la cutícula, entre otros, inciden de manera diferencial con respecto a la eficiencia de la toxina sobre larvas y adultos.

La baja mortalidad de adultos de *H. hampei* causada por la aplicación tópica de beauvericina se debió a factores como la vía de penetración, el grosor de la cutícula, la notable presencia de melanina en el insecto adulto, la fuerte esclerotización que se presenta en coleópteros y la mayor capacidad del adulto para metabolizar la toxina a través de su respuesta de defensa. Todos los tratamientos y dosis de beauvericina usadas en los bioensayos con larvas de primer instar sugieren que la penetración de la toxina es mucho más rápida y activa en estas que en los adultos, debido a que en ellas existen las condiciones que favorecen o incrementan la permeabilidad y circulación del compuesto a través de la cutícula.

El estudio de biomoléculas de interés entomológico, como las toxinas, permitirá plantear nuevas alternativas en la lucha contra los insectos plaga. Los resultados de este estudio permiten profundizar más en el conocimiento de los mecanismos de infección de los hongos entomopatógenos, especialmente en *B. bassiana*, agente biológico productor de toxinas tipo beauvericina y patógeno de la broca del café *H. hampei*.

### Agradecimientos

El presente estudio se realizó gracias al apoyo financiero del Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco José de Caldas” (CONCIENCIAS) y la Federación Nacional de Cafeteros, a través de su Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFE).



## Literatura citada

- Bustillo, AE; Cárdenas, MR; Villalba, DA; Benavides P; Orozco, J; Posada, FJ. 1998. Manejo Integrado de la Broca del Café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. Chinchiná, CO. Centro Nacional de Investigaciones en Café CENICAFE. 134 p.
- Baker, PS. 1999. La broca del Café en Colombia; Informe final del proyecto MIP para el Café. Chinchiná, CO. DIFD – CENICAFE – CABI Bioscience. 154 p.
- Castlebury, LA; Sutherland, JB; Tanner, LA; Henderson, AL; Cerniglia, CE. 1999. Use of a bioassay to evaluate the toxicity of beauvericin to bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15:119-121.
- Delgado, F; López, Y; Girado EM. 2001. Actividad enzimática de hongos y su patogenicidad sobre *Hypothenemus hampei*. *Manejo Integrado de Plagas* 60: 43-49.
- Evlakhova, A; Rakitin, A. 1968. Insecticidas biológicos y sus aplicaciones. *Doklady Akademii Nauk.* 178:485-488.
- Eyal, J; Mabud, KJ; Fischbein, JF; Walter, JF; Osborne, LS. 1994. Assessment of *Beauveria bassiana*. Eco-1strain, which produces a red pigments for microbiological control. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 44:65-79.
- Ferrón, P. 1981. Pest control by the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. In BURGESS, H. ed. *Microbial control of pest and plant diseases. 1970-1980.* New York, US. Academic Press. p. 465-482.
- Gupta, S; Krasnoff, SB, Underwood, NL, Renwick, JAA; Roberts, DW. 1991. Isolation of beauvericin as an insect toxin from *Fusarium semitectum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Mycopathologia* 115:185-189.
- Ignoffo, CM; Mandava, NB. 1988. Handbook of natural pesticides. v. 5 Microbial Insecticides. Part A. Entomogenous protozoa and fungi. Boca Ratón, US. CRC Press. 243 p.
- Kucera, M. 1971. Toxins of the entomogenous fungus *B. bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 17:211-215.
- Miller, TA. 1980. Cuticle techniques in arthropods. New York, US. Springer-Verlag. 410 p.
- Nilanonta, Ch; Isaka, M; Kittakoop, P; Palittapongarnpim, P; Kamchonwongpaisan, S; Pittayakhajonwut, D; Tanticharoen, M; Thebtaranonth, Y. 2000. Antimycobacterial and Antiplasmodial Cyclodepsipeptides from the Insect Pathogenic Fungus *Paecilomyces tenuipes* BCC 1614. *Planta Medica* 66:756-758.
- Paris, M; Das, BC; Ferrón, P. 1981. Depsipeptides from *Metarhizium anisopliae*. *Phytochemistry* 20(4): 715-723.
- Perrot, M. 1996. Les insectes font de la résistance. *Science & Vie mars* 942: 92-97.
- Sigma (SIGMA, US). 2001. Catalog Sigma - Aldrich 2000 - 2001. US. 2843 p.
- Stark, DJ; Jepson, CP; Mayer, FD; 1995. Limitations to use of topical toxicity data for predictions of pesticide side effects in the field. *Journal of Economic Entomology* 88 (5):1081-1088.
- Suzuki, A; Tamura, T. 1972. *Agricultural biological chemistry* (36): 896.
- Tamura, T; Suzuki, A. 1978. *Bioactive peptides.* Tokio. 105 p.
- Thakur, R; Smith, J. 1997. Liquid Chromatography / Thermospray / Mass Spectrometry Analysis of Beauvericin. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 45:1234-1239.
- Uribe, SS; Saldarriaga, Y; Pineda, F; Arango, J; Vélez, I. 1997. Producción de beauvericina por *Beauveria bassiana* 9401 aislada sobre *Lutzomya* sp. *Revista Colombiana de Entomología* 23:3-4.
- Vélez A, PE; Posada F, FJ; Marín M, P; Gonzáles, MT; Osorio V, E; Bustillo P, AE. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Chinchiná, CENICAFE. p. 1-34. (Boletín Técnico Cenicafé N° 17).
- Vey, A; Quiot, JM; Vago, C; Farges, J. 1985. Effect immunodépresseur de toxines fongiques inhibition de la reaction de encapsulement multicellulaire par les destruxines. *Comptes Rendus de l'academie des Séances*, 300: 647-651.
- Zacharuk, R. 1973. Penetration of the cuticular layers of elaterid larvae (Coleoptera) by the fungus *Metarhizium anisopliae* and notes on bacterial invasion. *Journal of Invertebrate Pathology* 21: 01-106.
- Zizca, J; Weiser, J. 1993. Effect of beauvericin a toxic metabolite of *Beauveria bassiana*, on the ultrastructure of *Culex pipiens* autogenicus larvae. *Cytobios* 75:13-19.