

## Método para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei* (Ferrari) Method to evaluate the pathogenicity of *Beauveria bassiana* on *Hypothenemus hampei* (Ferrari)

René Cupull Santana<sup>1</sup>, Amaray Ortiz Arbolaez<sup>2</sup>, Yraida Delgado Pérez<sup>2</sup>.

1. Centro de Investigaciones Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní, km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP: 54830.
2. Estación de Investigaciones de Café, Jibacoa, Manicaragua, Villa Clara.

E-mail: reneacs@uclv.edu.cu; invcafe@eima.vcl.cu

**RESUMEN.** En la Estación de Investigaciones de café de Jibacoa, se estandarizó un método de bioensayos para evaluar la patogenicidad del hongo *Beauveria bassiana* sobre adultos de *Hypothenemus* obtenidos de granos de café pergamino. Las brocas fueron desinfectadas por inmersión en hipoclorito de sodio al 0.5 % durante diez minutos y luego se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente se expusieron al hongo usando un título de  $1 \times 10^7$  UFC/ mL durante dos minutos. Una vez expuestas las brocas al inóculo del hongo se colocaron individualmente en tubos de ensayos con papel de filtro húmedo y tapados con algodón. A las 24 horas se les adiciono un grano de café pergamino. Se probaron dos aislamientos el Bb 18-1 obtenido de *Cylas formicarius elegantulus* Summer y el Bb 18-2 de brocas muertas provenientes de la Estación de Investigaciones de café y un control. Se encontró que 24 horas después de la inoculación en las brocas infectadas se presentó una menor actividad y pérdida de antenas y una inhibición de la actividad de brocado. El porcentaje de mortalidad causado por Bb 18-1 fue 64.4 % y para Bb 18-2 de 98 %. Este bioensayo se puede utilizar como un modelo para probar diferentes entomopatógenos contra *Hypothenemus hampei*.

**Palabras clave:** *Beauveria bassiana*, *Hypothenemus hampei*.

**ABSTRACT:** In the Station of Investigations of Coffee of Jibacoa, a bioassay method was standardized to evaluate the pathogenicity of the mushroom *Beauveria bassiana* on adults of obtained *Hypothenemus* of grains of brown parchment. The drills were disinfected by immersion in hypochlorite of sodium at the 0.5 % during ten minutes and then they washed the selves three times with it diluted distilled sterile. Later on they were exposed to the mushroom using a title of  $1 \times 10^7$  UFC / mL during two minutes. Once exposed the drills to the inoculate of the mushroom were placed individually in tubes of rehearsals with paper of humid filter and covered with cotton. At the 24 hours they were added a grain of brown parchment. Two isolations the Bb 18-1 were proven obtained of *Cylas formicarius elegantulus* Summer and the Bb 18-2 isolated of dead drills coming from the Station of Investigations of coffee and a witness. It was found that 24 hours after the inoculation in the infected drills a smaller activity was presented and lost of antennas and an inhibition of the brocade activity. The percentage of mortality caused by Bb 18-1 was 64.4 % and Bb stops 18-2 of 98 %. This bioassay you can use as a model to prove different entomopathogens against *Hypothenemus hampei*.

**Key words:** *Beauveria bassiana*, *Hypothenemus hampei*.

## INTRODUCCIÓN

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae), es una de las principales plagas del café. Su importancia radica en que ataca directamente los granos de café provocando la caída de los frutos en estado acuoso, la pérdida de peso del grano y la alteración de la calidad de la bebida, aumentándose los gastos por su manejo y reduciéndose el precio de venta del producto (Benavides y Arevalo, 2002) citado por Castaño *et al* 2005.

La broca del café es susceptible al ataque de *Beauveria bassiana*. Su infección se inicia con adhesión de las esporas sobre su integumento; estas germinan y penetran mediante un proceso físico y químico que involucra la producción de enzimas, posteriormente, el hongo invade la cavidad hemocélica del insecto y ocasiona su muerte debido a deficiencias nutricionales, destrucción de los tejidos y por la liberación de toxinas Bustillo (2002). Una

vez el hongo ha crecido dentro del insecto sale de él a través de los tejidos destruidos y lo cubre con estructuras miceliales. Finalmente, bajo condiciones ambientales adecuadas de humedad y temperatura ocurre la conidiogénesis.

Aplicar una sola cepa seleccionada por su virulencia hacia un insecto puede resultar en una supresión corta y limitada de la plaga, pueden ser requeridos para iniciar y mantener una epizootia en una población de insectos heterogénea en el campo (Boucias *et al* 2000, Tiganom *et al* 1995). El uso de mezclas de biocontroladores ya ha sido reportado en diferentes partes del mundo y en todos los casos los mejores resultados se han obtenido cuando se han utilizado mezclas de cepas, y no cuando se ha aplicado una sola cepa (Arcia, 1995; Leal *et al.*, 2000; Pino *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004). La germinación de los conidias de *B. bassiana* ocurre en un periodo de 12 horas después de la inoculación. El hongo penetra a través del integumento por acción mecánica y efectos enzimáticos, lo cual toma otras 12 horas. Después de unas 72 horas de la inoculación el insecto está totalmente colonizado. La duración de las diferentes fases de este ciclo depende de la especie atacada y de las condiciones ambientales presentes durante la infección (Alves, 1986) citado por González *et al.*, 1993.

La habilidad de un hongo entomopatógeno para sobreponerse a los mecanismos de defensa de sus hospedantes se debe en gran parte a la producción de toxinas.

La producción de toxinas es uno de los componentes principales de la patogenicidad y uno de los más difíciles de establecer (González *et al.*, 1993).

La presente se realizó con el objetivo de evaluar la eficacia de dos cepas del hongo *Beauveria bassiana* en el laboratorio y seleccionar la mas eficiente para el control de la broca del café en condiciones de campo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este experimento se realizó en la Estación de Investigaciones de café de Jibacoa, situada a una altura de 340 msnm. Para el presente estudio se utilizaron los aislamientos de *B. bassiana* provenientes de *Cylas formicarius* proveniente del

cultivo del boniato y de *H. hampei* muertos en granos de café afectados de la Estación de Investigación de café.

Los insectos utilizados en el ensayo fueron obtenidas de granos de café afectados, las cuales se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % durante 10 minutos y tres enjuagues con agua destilada estéril. Se seleccionaron las mas activas, completamente sanas, negras o melanizadas.

El experimento se organizó en un diseño completamente al azar compuesto de tres tratamientos con tres repeticiones, empleando 30 brocas por repetición. El primer tratamiento fue el aislamiento obtenido del picudo que se denominó Bb 18-1 y el segundo fue Bb 18-2 aislado de brocas muertas y el tercero, el control.

Estos aislamientos se realizaron primero en agar de agua con antibióticos y se purificó en agar de papa (PDA). Los aislados se multiplicaron en el sustrato de cabecilla de arroz, transcurrido siete días se tomó 1 g y se disolvió en 9 mL de agua destilada estéril y se le añadió dos gotas de Tween 80 al 0.1 %. El título del inóculo se determinó con la cámara de Neubauer ajustándola posteriormente a  $1 \times 10^7$  UFC/ mL. La viabilidad del inóculo se determinó antes de los bioensayos, evaluando la germinación de los conidias a las 24 y 48 horas por el método de gota colgante.

Las brocas del testigo solo se trataron en agua destilada estéril durante dos minutos y se dispusieron en forma individual dentro de los tubos de ensayos de 2 cm de diámetro y 4 cm de altura, que contenían un disco de papel de filtro húmedo. Estos se taparon con un tapón de algodón para impedir la salida de las brocas y mantener las condiciones de humedad. La inoculación de las brocas de cada tratamiento se hizo sumergiéndolas en una suspensión de *B. bassiana* con un título de  $1 \times 10^7$  UFC/mL en una placa de petri y agitándola durante 2 minutos. Cumplido el tiempo de exposición se retiró exceso de inóculo de las brocas invirtiendo la placa de petri sobre un papel de filtro estéril. Luego con pincel estéril, se colocaron los insectos individualmente en los tubos de ensayos y se distribuyeron en tres repeticiones, por tratamiento de 30 individuos cada uno. Veinticuatro horas más tarde se adicionó a cada

uno de los tubos de ensayos un grano de café pergamino seco como sustrato alimenticio. Para mantener una alta humedad en cada uno de los tubos de ensayos, se le adiciona diariamente 0.2 mL de agua destilada estéril. Los tratamientos y el testigo se mantuvieron en condiciones naturales de luz, a temperatura de  $25 \pm C^0$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de germinación suspensiones de conidias fue superior al 85 %, lo que indicó la buena calidad biológica del control biológico. La calidad del inoculo se relaciona directamente con la viabilidad de los conidias y con el tiempo de sobrevivencia del hongo en el medio. Diferencias en la viabilidad de las conidias generan variabilidad en las respuestas que podrían ser atribuidas a diferencias de patogenicidad, (Lazo, 1990).

La sobrevivencia de las brocas después de la desinfección con hipoclorito de sodio fue del 100 % y no influyó en el proceso de germinación de las conidias. Esto concuerda con lo reportado por Jiménez (1992), quien obtuvo una sobrevivencia del 80 % en el control al efectuar desinfección de los granos con hipoclorito de sodio al 5 % durante 5 minutos. El bioensayo permitió la sobrevivencia de las brocas por un tiempo superior a los 6 días, suficiente para la evaluación del experimento y para la expresión de los síntomas y signos de acción de *B. bassiana*.

La mortalidad de las brocas se evaluó diariamente durante 6 días después de la inoculación, utilizando para ello microscopio estereoscópico que permitió realizar la disección del grano sin causar daño a la broca. Se estimó el porcentaje de mortalidad total, la pérdida de las antenas y la penetración en el grano y la distribución de la mortalidad diaria.

Al cabo de 24 horas se empezaron a observar los primeros síntomas de enfermedad en los insectos tratados con el hongo. Se observó una menor actividad en su desplazamiento y desprendimiento de las antenas. En los tratamientos con *B. bassiana* el porcentaje de ataque a los granos de café pergamino fue de 31.1 %, mientras en el control alcanzo un 87 %, lo que significa que las brocas infectadas por el hongo realizan un menor daño y de penetrar en los granos, resultados similares a los obtenidos por González *et al.*, 1993.

En la patogenicidad de los aislamientos se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. El porcentaje de mortalidad causado por el aislamiento Bb 18-1 fue de 64.4 % y para el aislamiento Bb 18-2 fue 98 %.

En el control no se presentó mortalidad por el hongo, ni por agentes contaminantes, pero la mortalidad es atribuida a otras causas. (Tabla 1)

**Tabla 1. Porcentaje de mortalidad promedio, pérdida de antenas y penetración de los granos por *Hypothenemus hampei* por la incidencia de *Beauveria bassiana***

Tratamientos	Muertas por <i>B. bassiana</i>	Perdidas de Antenas	Penetración al grano
Bb 18-1	64.4 b	71.1 b	55.5 ab
Bb 18-2	98.0 a	80.0 b	7.0 b
Control	0.0 c	3.3 a	87.0 a
E. S ±	0.707	1.953	4.148
C. V (%)	6.600	21.904	48.251

Letras desiguales difieren por la prueba de Duncan para  $p \leq 0.05$

La mortalidad diaria (Figura 1) presentó diferente distribución en la población inoculada. El aislamiento Bb 18-1 a las 24 horas presentó un 20 % de muertes y la Bb 18-2 un 24 % siendo ligeramente superior, pero a partir de las 72 horas la cepa Bb 18-2 actuó más rápida al mostrar un 64 % de muertes y así sucesivamente en el transcurso de las

horas esta cepa fue aumentando su efecto biológico al presentar a las 96 horas un 81 % de efectividad y terminar a las 144 horas con un 98 % y sin embargo la cepa Bb 18-1 en este periodo mostró solo un 64 % de muertes de *H. hampei*.

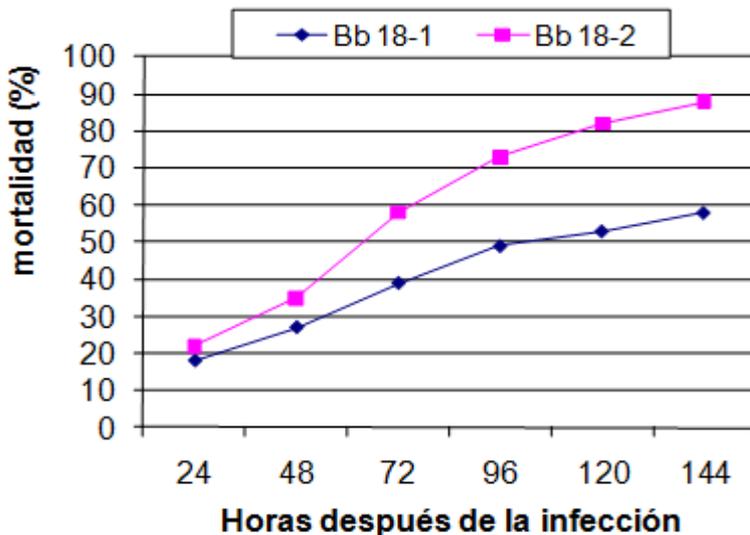


Figura 1. Mortalidad de *Hypothenemus hampei* causada por

## CONCLUSIONES

1. Con la cepa Bb 18-2 aislada de brocas muertas se logro un 98 % de muerte y la penetración de las brocas inoculas a los granos fue inferior a la cepa Bb 18-1 con un 7.0 %.+
2. En la distribución de la mortalidad diaria de *Hypothenemus hampei* la cepa Bb 18-2 fue muy superior a partir de la 72 horas de la inoculación al presentar un 21 % por encima de brocas muertas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alve, S. B. (1986): Métodos utilizados en patología e controle microbiano. Ed. Controle Microbiano de insectos. Sao Paulo (Brasil), Editor Manole, 237-277.
2. Arcia, A. M. (1995): Uso de antagonistas en el control de fitopatógenos del suelo. In Curso sobre Control Microbial de Insectos Plagas y Enfermedades en cultivos. Trabajo Mimeografiado, presentado en seminario en la Universidad Centro Occidental (UCLA) Barquisimeto- Venezuela. 20 p.
3. Benavides, M. P.; Arévalo, H. (2002): Manejo integrado, una estrategia para el control de la broca del café en Colombia. *Cenicafé* 53(1): 34-48.
4. Boucias, D.; Stokes, C.; Suazo, A.; Funderburk, J. (2000): AFLP análisis of the entomopathogen *Nomuraea rileyi*. *Mycologia* 92: 638-648.
5. Bustillo, A. E. (2002): Los hongos entomopatógenos en el control de insectos plagas. In. Curso Internacional

Teórico- Práctico sobre Entomopatógenos, Parasitoides y otros enemigos de la Broca del café. Sección I. Chinchina, Cenicafé, p. 15- 23.

6. González, M. T.; Posada F. F. J.; Bustillo P. A. E. (1993): Desarrollo de un biensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*, *Cenicafé*:44(3): 93- 102.

7. Jiménez, J. A. (1992): Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* la broca del café. *Cenicafé* 43(3): 84-98.

8. Lazo, A. R. R. (1990): Susceptibilidad de la broca del fruto del cafeto *Hypothenemus hampei* al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y su tolerancia al oxiclورو de cobre. Turrialba (Costa Rica), Centro Agrónomo. CATIE, 61 p.

9. Leal, B.; S. C. M.; Butt, T. M.; Peberdy, J. F.; Bertioli, D. J. (2000): Genetic exchange in *Metarhizium anisopliae* strains co- infecting *Phaedon cochleariae* is revealed by molecular markers. *Mycological Research*, 104: 409- 414.

10. Pino, T. C.; France, I. A.; Norambuena, A. R.; Mejias, B. P. (2007): Universidad Católica del Maule- INIA, 2004. UC del Maule estudia: El control biológico del Burrito de la Vid. On line Internet. Disponible en: [http:// www. Vendimia. CI/ veredicionanterior, php](http://www.Vendimia.CI/veredicionanterior.php) edición = 36& id= 106. (Consultado en Octubre 2007).

11. Tiganom, M. S.; Honeycutt, R. J.; Lacey, L. A.; Assis, R.; Mcclelland, M.; Sobral, B. W. S. (1995): Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates Revealed by molecular markers. *Journal of invertebrate Pathology* 65: 274- 282.

12. Wang, C. S.; LI, Z.; Butt, T. M. (2002): Molecular studies of coformulated Strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate . Pathology* 80: 29-34.

13. Wang, C. S.; Fan, M.; LI, Z.; Butt, M. (2004): Molecular monitoring and evaluation of the application of the insect- pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in Southeast China. *Journal of Applied Microbiology* 96: 861- 870.

Recibido: 22/09/2010

Aceptado: 12/06/2011