

Influencia de una cepa de *beauveria bassiana* (bals.) vuill. en poblaciones de *hypothenemus hampei* Ferrari.

Influence of a strain of *beauveria bassiana* (bals.) vuill. in populations of *hypothenemus hampei* Ferrari.

Autores: MSc. Amauri Díaz-Rodríguez, MSc. Irladis Urgellez-Cardosa, Lic. Noryaysis Abreu-Romero, Lic. Arleis Abreu-Romero.

Organismo: Centro de Desarrollo de la Montaña.

E-mail: amaury@cdm.gtmo.inf.cu

Resumen.

Beauveria bassiana (Bals.) Vuill es un hongo entomopatógeno utilizado en el control de plagas que afectan a cultivos de gran importancia económica. Este hongo causa epizootias de forma natural en poblaciones de *Hypothenemus hampei* Ferrari, una de las plagas más importantes que afectan al café. Este trabajo tuvo como objetivo aislar y caracterizar una cepa de *B. bassiana* causante de epizootias en poblaciones de *H. hampei* en Limonar, El Salvador, Guantánamo. Se estudió el efecto de tres medios de cultivos sobre el desarrollo de las colonias, la esporulación, la viabilidad y la patogenicidad del aislado. El mejor medio de cultivo para el desarrollo del aislado de *B. bassiana* fue el agar extracto de malta. La cepa presentó una buena esporulación a concentraciones de 10^8 ufc.mL⁻¹ a los diez días de incubación y con porcentajes de viabilidad y patogenicidad de más del 95%.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, *Hypothenemus Hampei*, Broca del café, caracterización de cepa.

Abstract.

Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. is an entomopathogenic fungus used in the control of pests that affect crops of great economic importance. This fungus causes natural epizootics in populations of *Hypothenemus hampei* Ferrari, one of the most important pests that affect coffee. The objective of this work was to isolate and characterize a strain of *B. bassiana* that causes epizootics in populations of *H. hampei* in Limonar, El Salvador, Guantánamo. The effect of three means of cultivation was studied on the growth of colonies, the sporulation, the viability and the pathogenicity of the isolated one of *B. bassiana*. The best means of cultivation for the development of the isolated of *B. bassiana* was the agar extract of malt. The strain presented a good sporulation with concentrations of 10^8 cfu.mL⁻¹ to the tenth day of incubation and with percentages of viability and pathogenicity of more than 95%.

Keywords: *Beauveria bassiana*, *Hypothenemus Hampei*, Coffee Berry borer, Characterization of strain

Introducción.

La broca del café, *Hypothenemus hampei* Ferrari, está considerada mundialmente como una de las más devastadoras plagas de este cultivo. Las pérdidas se cuantifican entre 10 a 80% de las producciones que equivalen a un valor aproximado de 500 millones de dólares anuales (Infante, 2018).

Desde la aparición de la broca del café (*H. hampei*) se incrementaron los estudios para generar estrategias de lucha más biorracionales, donde el control biológico es el de mayor nivel de investigación y aplicación en la actualidad (Peña *et al.*, 2006). Entre estos agentes biológicos, el hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin es uno de los más empleados en el control biológico de esta plaga en todo el mundo (Moura & Jaronski, 2016; Toledo *et al.*, 2018) y varios productos comerciales, cuyo ingrediente activo es este hongo entomopatógeno, se emplean en varias regiones para el control de la broca del café (Aristizábal *et al.*, 2017; Kawabata *et al.*, 2017). El mejor momento para aplicar en campo estos bioplaguicidas de *B. bassiana* es en el período mayo-julio que es cuando las hembras son más susceptibles (Mariño *et al.*, 2016; Gallardo & González, 2015).

Lo más importante en la selección de una cepa de un entomopatógeno para el control de *H. hampei* es considerar los criterios técnicos de patogenicidad, esporulación y germinación del aislamiento, ya que estas variables determinan finalmente su eficiencia en el control. Ahora bien, estas variables están influenciadas en primer lugar por la cepa en cuestión y en segundo lugar por el medio en el cual este se cultive.

Está demostrado que las cepas de una misma especie tienen sus particularidades en cuanto a la cinética de consumo de nutrientes para llegar a la esporulación. Además, la composición del medio de cultivo y la concentración de conidios producidos en el mismo pueden influir en la patogenicidad de la cepa.

Por las razones antes expuestas el presente trabajo tuvo como objetivo el aislamiento y la caracterización fisiológica de una cepa nativa de *Beauveria bassiana* que causa epizootias en poblaciones de *Hypothenemus hampei*.

Materiales y métodos.

El aislamiento del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin se realizó en áreas cafetaleras de la localidad de Limonar de Monte Ruz, El Salvador, Guantánamo, en las cuales no se habían realizado aplicaciones de bioplaguicidas con anterioridad.

Se colectaron en campo ejemplares adultos de *Hypothenemus hampei* infectados por *B. bassiana*, los cuales se desinfectaron en el laboratorio con hipoclorito de sodio al 0,5%, durante 1 minuto. Posteriormente se lavaron con agua destilada estéril y se colocaron en cámara húmeda por 24 horas.

El aislamiento se obtuvo a partir del método de dilución decimal seriada (cultivo monospórico) en placas de Petri con medio agar extracto de malta (AEM). Las placas se incubaron a 28 °C de 3 - 4 días hasta que inició el crecimiento de las colonias, las cuales se aislaron mediante transferencia de una asada a tubos con medio AEM.

Se realizaron preparaciones microscópicas del aislado y se efectuó la observación al microscopio óptico.

La cepa nativa aislada se conservó en la colección micológica del Centro de Desarrollo de la Montaña y se envió al Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV) para su certificación.

En la caracterización de la cepa se emplearon los medios de cultivo agar extracto de malta (AEM), papa dextrosa agar (PDA) y Sabouraud dextrosa agar (SDA), todos ajustados a pH 5,6. Para evaluar el crecimiento, se transfirieron discos de micelio de 3 mm de diámetro, de la cepa nativa aislada al centro de placas de Petri de 100 x 15 mm, que contenían 10 mL de los respectivos medios de cultivo. Las placas se incubaron a 28°C durante 12 días y cada 48 horas se midió en centímetros el diámetro de las colonias. Cada tratamiento se replicó tres veces.

La esporulación de la cepa en los tres medios se determinó con el empleo de cultivos previos, desarrollados en placas de Petri de 100 x 15 mm e incubados a 28 °C. Se emplearon tres placas por tratamiento y a cada una se le adicionó 10 mL de agua destilada estéril y una gota de Tween 80 al 0,01%. Las estructuras del hongo se desprendieron mediante raspado con un asa de siembra y se realizaron diluciones decimales seriadas. El conteo de conidios se realizó en cámara de Neubauer, a partir de los cuatro días de incubación y con una periodicidad de 48 horas.

Para determinar la viabilidad de los conidios del aislado de *B. bassiana* se tomó una asada del crecimiento del hongo sobre los medios de cultivos (AEM, PDA y SDA) y se transfirieron a tubos de ensayos que contenían 10 mL de agua destilada estéril con Tween 80 al 0,01%. Se agitó y 0,02 mL de la suspensión se inoculó sobre portaobjetos sobre los cuales se depositó previamente 0,5 mL del medio de cultivo correspondiente. Cada tratamiento se replicó tres veces. La incubación se realizó en cámara húmeda a temperatura de 24±2 °C. A las 24 horas y bajo un microscopio óptico se contó en cada portaobjeto 100 conidios por campo y de ellos los germinados. Los resultados se expresaron en porcentaje de conidios germinados.

La patogenicidad de la cepa de *B. bassiana* cultivada en los tres medios de cultivo (AEM, PDA y SDA) se evaluó sobre adultos de brocas del café. Se emplearon 10 adultos hembras de *H. hampei* por tratamiento, los que se replicaron cinco veces. Se comparó con un tratamiento control.

Los insectos se inocularon con el hongo por inmersión en una suspensión conidial, a razón de 10^8 ufc.mL⁻¹ en agua destilada estéril y Tween 80 al 0,01%. Posteriormente, los insectos se confinaron individualmente a tubos de ensayos que contenían una almendra de café y un disco de papel de filtro humedecido. Los tubos se sellaron con un tapón de gasa y algodón. Los insectos correspondientes al tratamiento control se asperjaron con agua destilada estéril.

Los insectos fueron evaluados cada 24 horas a partir del tercer día de iniciado el experimento y durante 10 días. La mortalidad se determinó por observación al microscopio estereoscópico. Los insectos muertos se desinfectaron con agua destilada estéril y alcohol al 70% durante un minuto en cada solución, se colocaron por separado en viales para realizar el reaislamiento de la cepa de *B. bassiana* y confirmar su patogenicidad.

El cálculo de la patogenicidad se realizó de acuerdo a la norma cubana (NC: 72-02, 1993) y se realizó sobre la base del total de insectos muertos en las cinco réplicas de los tratamientos y en el testigo. Los resultados se expresaron en porcentaje.

Todos los experimentos se desarrollaron bajo un diseño completamente aleatorizado. La información correspondiente a viabilidad y patogenicidad se procesó mediante análisis de varianza de clasificación simple. Para la variable esporulación se aplicó un análisis de varianza de clasificación doble; para tal efecto los datos se transformaron a $x^{1/2}$ ya que se comprobó que no cumplían las hipótesis de bases de los modelos lineales. Para todas las variables las medias se compararon mediante la prueba de Newman Keuls.

En todos los casos el procesamiento de los datos se realizó con el empleo del sistema estadístico STATGRAPHICS Plus para Windows, versión 5.1, 2001.

Resultados y discusión.

Se obtuvo, en cultivo puro, un aislado de la cepa nativa de *Beauveria bassiana* que causa epizootias de forma natural en poblaciones de *Hypothenemus hampei*, en la localidad de Limonar de Monte Ruz, El Salvador, Guantánamo.

En las placas de Petri se observó el micelio del hongo de color cremoso y con apariencia polvorienta. Se recuperó un gran número de esporas individuales de manera confiable, lo que facilitó el desarrollo de los tubos germinativos y sus ramificaciones y garantizó que las colonias se originaran a partir de una sola célula.

Se observaron conidióforos simples, agrupados irregularmente en un racimo verticilado y conidios esféricos a ovoides, hialinos, unicelulares y secos.

En la Figura 1 se observan las curvas de crecimiento de las colonias del aislado de *B. bassiana* en tres medios de cultivo. Los resultados reflejan diferencias en el crecimiento micelial del aislado bajo el efecto de los medios. El mayor crecimiento de las colonias se logró en el medio PDA y el más pobre en el medio SDA.

El aislamiento presentó la misma tendencia a través del tiempo en los tres medios de cultivo, por lo que se observó la curva típica de crecimiento. El crecimiento micelial fue continuo a partir de las 72 horas de incubación. El diámetro de las colonias osciló entre 1,7 y 3,2 cm a los doce días de incubación. Las colonias se presentaron aterciopeladas, de color crema, con bordes de forma regular y con su aspecto típico polvoriento. En el medio AEM el micelio se tornó más abundante con relación a los otros medios de cultivo.

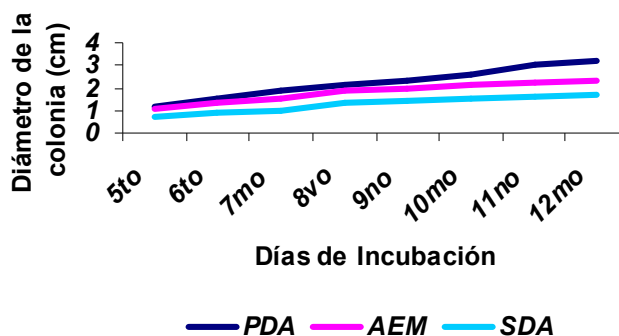


Figura 1. Crecimiento micelial acumulado del aislado en diferentes medios de cultivo

Elósegui *et al.* (2003) al evaluar el comportamiento de *B. bassiana*, cepa LBB-1, en medio SDA producido en Cuba, obtuvieron diámetros de las colonias que fluctuaron entre 3,1 y 3,7 cm después de 16 días de incubación.

Las variaciones observadas en el crecimiento de las colonias al emplear diferentes medios de cultivo pudieron deberse al balance entre los niveles de las fuentes carbonadas y nitrogenadas. Así, cuando las fuentes que aportan nitrógeno en el medio están dos o más veces concentradas con respecto a la fuente carbonada se estimula el crecimiento micelial (Jenkins y Prior, 1993).

Carr *et al.* (2003) señalaron que todas las fuentes de carbono estimulan el desarrollo de las colonias, aunque obtuvieron los mejores resultados con la glucosa y la lactosa, seguidos por el almidón, la fructuosa, la arabinosa y la sacarosa; sin embargo, los menores niveles de crecimiento micelial lo observaron al usar la maltosa y la galactosa.

Lo anterior pudiera explicar por qué en el medio AEM que tiene un 64% de maltosa el crecimiento fue inferior con relación al medio PDA, pero ello es solo una especulación, ya que no se pudo conocer los niveles de nitrógeno y carbono total de los medios.

El metabolismo primario de los hongos filamentosos se relaciona con los procesos de crecimiento y desarrollo, tales como la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno y la producción de enzimas. La producción cualitativa de las enzimas proteasas, lipasas y quitinasas están relacionadas con la patogenicidad de *B. bassiana* a la broca del café (Valdés *et al.*, 1999). Las enzimas liberadas al medio por parte del hongo determinan los nutrimentos que estos puedan utilizar y, por tanto, su tasa de crecimiento.

De manera general, el aislamiento mostró una respuesta esporulativa variable que dependió del medio de cultivo. Los mayores niveles de esporulación se alcanzaron a partir de los 10 días de incubación y a los catorce días se obtuvieron, en los tres medios de cultivos, títulos del orden de 10^8 ufc.mL⁻¹ (Tabla 1). Se observa que en el medio AEM se alcanzó la mayor concentración de conidios 2 y 4 días antes que en los medios SDA y PDA, respectivamente.

Suárez *et al.* (2017) al estudiar la epidemiología de *B. bassiana* como agente de biocontrol encontraron que el hongo requiere de alta humedad para esporular ($\geq 93\%$) y que el tiempo en el que germinan el 50% de los conidios es de 12,7 horas.

La mayor esporulación del hongo en el medio AEM podría explicarse por su mayor capacidad de asimilación de los compuestos presentes en este sustrato. Este resultado puede considerarse positivo si se tiene en consideración el costo de los medios de cultivo y la reducción del tiempo para lograr altas concentraciones de conidios durante la reproducción masiva de un hongo entomopatógeno.

Incubación (días)	Medios de cultivo		
	PDA	AEM	SDA
4	$2,0 \times 10^{-5}$ l	$1,3 \times 10^{-6}$ k	$2,5 \times 10^{-5}$ l
6	$1,2 \times 10^{-6}$ k	$5,2 \times 10^{-6}$ j	$1,3 \times 10^{-6}$ k
8	$1,5 \times 10^{-6}$ k	$8,9 \times 10^{-6}$ i	$1,8 \times 10^{-6}$ k
10	$2,3 \times 10^{-7}$ h	$1,0 \times 10^{-8}$ f	$1,0 \times 10^{-7}$ i
12	$9,0 \times 10^{-7}$ g	$1,8 \times 10^{-8}$ b	$1,4 \times 10^{-8}$ d

14	$1,1 \times 10^{-8} e$	$3,0 \times 10^{-8} a$	$1,6 \times 10^{-8} c$
ES (\pm)	0,07		

Tabla 1. Esporulaci3n del aislado de *B. bassiana* en diferentes medios de cultivo
Medias con letras diferentes difieren para $p \leq 0,05$ por la prueba de Newman Keuls.

En general, el nivel de conidiog3nesis de la cepa en los tres medios de cultivo fue satisfactorio de acuerdo a la norma cubana (NC: 72-05, 1993).

En el medio AEM se obtuvo el mayor nivel de esporas viables, seguido por los medios SDA y PDA (Tabla 2). No obstante, en los tres medios de cultivo se alcanzaron niveles de viabilidad superiores al 85%, por lo que en este aspecto cumple con el requisito de la norma cubana (NC: 72-05, 1993).

La cepa nativa aislada ejerci3 m3s de un 85% de mortalidad (patogenicidad) en los insectos inoculados en menos de 4 d3as, valor superior al testigo sin tratamiento en el cual no ocurrieron muertes, lo que demuestra la capacidad patog3nica del aislado sobre *H. hampei*, resultado que permite tener criterio acerca de la posibilidad de su empleo como biocontrol de esta plaga (Tabla 2).

Este resultado fue particularmente superior cuando se emple3 el medio AEM; no obstante, este indicador se comport3 satisfactoriamente independientemente del medio de cultivo empleado, aun cuando se encontraron diferencias significativas entre los mismos.

Belay y Tenkegna (2017) al evaluar la patogenicidad de aislados de *B. bassiana* en el control de adultos de la broca del caf3, obtuvieron 100% de mortalidad y una producci3n de esporas por cad3ver, muy pr3xima a la demanda de la concentraci3n requerida para una aplicaci3n en campo (1×10^{-7} ufc.mL⁻¹).

Medios de cultivos	Viabilidad (%)	Patogenicidad (%)
PDA	89,3 c	90 b
AEM	96,7 a	95 a
SDA	94,3 b	85 c
ES (\pm)	0,07	0,9

Tabla 2. Viabilidad y patogenicidad de *B. bassiana* en diferentes medios de cultivo
Medias con letras diferentes en una misma columna difieren para $p \leq 0,05$ por la prueba de Newman Keuls.

En general, los niveles de mortalidad observados se encuentran entre los valores planteados por la norma cubana (NC: 72-05, 1993).

Conclusiones.

El aislado de *B. bassiana* mostr3 buena esporulaci3n, viabilidad y patogenicidad bajo condiciones de laboratorio; en particular, el alto potencial de germinaci3n de las esporas y la rapidez con que estas invaden al hospedero y le ocasionan la muerte, son criterios de importancia que se3alan a esta cepa como un buen candidato a bioplaguicida microbiano para el control de la broca del caf3 (*Hypothenemus hampei*).

Referencias bibliogr3ficas.

Aristiz3bal, L., Johnson, M., Shriner, S., Hollingsworth, R., Manoukis, N., Myers, R., et al. (2017). Integrated Pest Management of Coffee Berry Borer in Hawaii and Puerto Rico: Current Status and Prospects. *Insects*, 8(4), 123.

- Aristizábal, L., Johnson, Melissa, Shriner, Suzanne, Hollingsworth, R., Manoukis, N., Myers, et al. (2017). Integrated Pest Management of Coffee Berry Borer in Hawaii and Puerto Rico: Current Status and Prospects. *Insects*, 8(4), 123.
- Belay, Y, Tenkegna, T. (2017). Bioassay and Pilot Mass Production of Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana* for the Control of Coffee Berry Borer (*Hypothenemus hampei*: Scolytidae), Ferrari. *J. Appl. Biosci.*, 117, 11669-11683.
- Carr, A., Elósegui, O., Bel, N. (2003). Aislamiento, caracterización morfológica y fisiológica del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) Broum & Smith. *Fitosanidad*, 7 (3), 27-32.
- Elósegui, O., Nieves, C., Díaz, R., Bel, N., Carr, A. (2003). Comportamiento del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Cepa LBB-1 en agar Sabouraud dextrosa producido en Cuba. *Fitosanidad*, 7 (2), 49-53.
- Gallardo, F., González, O. (2015). Manejo integrado de la broca del café en Puerto Rico. Guía Técnica. Departamento de Agricultura. San Juan, Puerto Rico. 12 pp.
- Infante, F. (2018). Pest Management Strategies Against the Coffee Berry Borer (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *J. Agric. Food Chem.*, 66 (21), 5275–5280.
- Jenkins, N. E., Prior, C. (1993). Growth and formation of true conidia by *Metarhizium flavoviride* in a simple liquid medium. *Mycol. Res.*, 97(12), 1489-1494.
- Kawabata, A.M., Nakamoto, S.T., Curtiss, R.T. (2017). Recommendations for Coffee Berry Borer Integrated Pest Management in Hawai'i 2016. *Insect Pests*, IP-41, 24p.
- Mariño, Y. A., Pérez, M. E., Gallardo, F., Trifilio, M., Cruz, M., Bayman, P. (2016). Sun vs. shade affects infestation, total population and sex ratio of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) in Puerto Rico. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 222, 258–266.
- Moura, G., Jaronski, S.T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World J Microbiol Biotechnol*, 32,177.
- NC 72-02. (1993). Norma Cubana Biopreparados de Entomopatógenos. Métodos de ensayos. Biotecnología Agrícola, Cuba.
- NC 72-05. (1993). Norma Cubana Biopreparado del Entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Especificaciones. Biotecnología Agrícola, Cuba.
- Peña, E., García, M., Blanco, E. y Barreras, J.F. (2006). Introducción de la avispa de – costa de Marfil *Cephalonomia Stephanoderis* Betrem (Hymenoptera: Bethyridae), parasitoide de la broca del fruto del cafeto *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae) en Cuba. *Fitosanidad*, 10(1), 33-36.
- Suárez, J., Cortez, H., García, A. M. (2017). Epidemiology of *Beauveria bassiana* in Controlled Populations of *Bactericera cockerelli*. *Southwestern Entomologist*, 42(4), 1041-1056.

Toledo, A., Franco, M., Medina, R., Marinode, A., Balatti, P. A. (2018). Assessment of the genetic diversity of Argentinean isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) using ISSR markers. [Versión electrónica]. *Journal of King Saud University - Science*. Disponible en <http://https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.02.006>. (Fecha de consulta: febrero del 2018).

Valdés, B. E., Vélez, P. E., Montoya, E. C. (1999). Caracterización enzimática y patogenicidad de aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. *Cenicafé*, 50(2), 106-118.