

493

Julio de 2018
Gerencia Técnica /
Programa de Investigación Científica
Fondo Nacional del Café



Respuesta a preguntas frecuentes sobre el hongo *Beauveria bassiana* y el control de la broca del café

¿Qué es el hongo *Beauveria bassiana*?

Es un microorganismo que se encuentra naturalmente en el ambiente y es patógeno de insectos, y ocasiona enfermedad y muerte de la broca del café.

Este hongo fue el primer controlador natural que se descubrió atacando la broca del café en Colombia (Vélez y Benavides, 1990) y se ha encontrado infectando al insecto en condiciones de campo (Figura 1), prácticamente en todos los países donde se ha establecido la broca.

El primer reporte de *B. bassiana* infectando a la broca del café en Colombia bajo condiciones de campo, se registró en 1990, en el departamento de Nariño, donde se recolectaron frutos infestados y brocas adultas muertas que presentaban signos del hongo sobre los insectos: momificación y cubrimiento por el micelio blanco algodonoso, que se observaba también en la corona del fruto (Figura 2).





Ciencia, tecnología
e innovación
para la caficultura
colombiana

Autores

Carmenza Esther Góngora Botero

Investigador Científico III
Disciplina de Entomología

Centro Nacional de Investigaciones de
Café - Cenicafé
Manizales, Caldas, Colombia

Edición

Sandra Milena Marín López

Fotografías

Archivo Cenicafé

Diagramación

Óscar Jaime Loaiza Echeverri

Imprenta

ISSN - 0120 - 0178

Los trabajos suscritos por el personal técnico del Centro Nacional de Investigaciones de Café son parte de las investigaciones realizadas por la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Sin embargo, tanto en este caso como en el de personas no pertenecientes a este Centro, las ideas emitidas por los autores son de su exclusiva responsabilidad y no expresan necesariamente las opiniones de la Entidad.

Manizales, Caldas, Colombia
Tel. (6) 8506550 Fax. (6) 8504723
A.A. 2427 Manizales
www.cenicafe.org



Figura 1. Frutos con alta infección de hongo.



Figura 2. a. Broca atacando un fruto infectada con el hongo;
b. Broca momificada atacando un fruto de café.

La identificación de las cepas de *B. bassiana* encontradas se realizó por medio de claves taxonómicas, basadas en características del cultivo, morfología y corroboración de los centros de referencia especializados, dando como resultado la identificación de las cepas de *B. bassiana*: Cenicafé 069 y Cenicafé 001.

El hongo hace parte de la estrategia de manejo integrado de la broca del café en Colombia y se recomienda su uso por parte de Cenicafé y Federación Nacional de Cafeteros.

► ¿Qué hace el hongo para matar a la broca del café?

Las estructuras reproductivas del hongo, llamadas esporas, se adhieren a la cutícula del insecto y germinan en presencia de agua; durante este proceso forman un tubo germinativo y producen enzimas que penetran la cutícula de la broca. Posteriormente, el hongo

invade la hemolinfa del insecto y allí cambia su estado y forma blastosporas o cuerpos hifales, similares a la estructura de una levadura. Las blastosporas se reproducen y cubren el interior del insecto (hemocele), dañando los órganos internos y atacando el sistema de defensas. Estas acciones combinadas finalmente causan la muerte de la broca (Butt *et al.*, 2016).

Bajo condiciones ambientales favorables (humedad relativa (HR) alta, mayor al 90%, y temperaturas óptimas de 20 a 30°C) el hongo crece fuera del cadáver del insecto, forma los conidióforos y posteriormente, produce nuevamente conidias que se diseminan en el ambiente (Figura 3).

En general, los hongos no requieren ser ingeridos por el insecto para causar la enfermedad, ya que pueden penetrar a través de su cutícula.



Figura 3. Broca infectada con conidias de *B. bassiana*.

► ¿Todas las cepas del hongo *B. bassiana* matan la broca?

Empleando la misma cantidad de conidias, no todas las cepas son patógenas o causan enfermedad, ni producen altos porcentajes de mortalidad en el insecto, es decir, no todas tienen alta virulencia (Shapiro-Ilan *et al.*, 2005). Existen cepas con alta virulencia y otras con baja virulencia.

“Las cepas utilizadas para controlar la broca deben ser patógenas y altamente virulentas.”

► ¿El hongo afecta otros insectos diferentes a la broca en el cafetal?

Algunas cepas de *B. bassiana* afectan otros insectos diferentes a la broca. En la Figura 4 se observa una infección de *B. bassiana* sobre la chinche de la chamusquina del café, *Monalonion velezangeli*; sin embargo, existe cierta especificidad entre los hongos entomopatógenos y el insecto atacado, de tal manera que no todos los insectos en el cafetal serán atacados luego de una aspersión con *B. bassiana* para controlar la broca del café. Se conocen varios mecanismos que previenen la adhesión y germinación de las conidias a la cutícula de los insectos. Adicionalmente, existen barreras químicas propias de la cutícula. Un ejemplo interesante se registra en los chinches, algunos como *Euschistus heros* tienen la habilidad de secretar volátiles (4-Oxo-(E)-2-hexenal y E)-2-Hexenal), con propiedades fungistáticas tanto en *Metarhizium anisopliae* (Borges y Aldrich, 1992) como en *B. bassiana* (Lopes *et al.*, 2015) e inhiben la germinación de conidias.

El grado de especificidad entre un hongo entomopatógeno y un insecto está determinado en parte por las características de la cutícula del insecto y sus interacciones con el tubo germinativo y el apresorio que forma el hongo entomopatógeno en el proceso de penetración (Butt *et al.*, 2016). Las fuerzas de adhesión entre las conidias y la cutícula dependen de la naturaleza hidrofílica de la cutícula y las barreras químicas que pueden hacer más fuerte o débiles las interacciones.



Figura 4. Hongo *B. bassiana* afectando la chinche de la chamusquina.

► ¿De qué depende la eficacia del hongo entomopatógeno?

Para que el hongo cause alta mortalidad y disminuya el daño económico que ocasiona la broca del café sobre el cultivo se requiere de aplicaciones inundativas. Es así como ha sido posible, con cepas altamente virulentas, causar mortalidades de broca hasta del 70%, similares a las ocasionadas por los insecticidas (Cárdenas *et al.*, 2007); sin embargo, para lograr estos niveles de control existe un mínimo de consideraciones a tener en cuenta:

1. Las cepas de *B. bassiana* que se usen para controlar la broca deben ser patogénicas (deben causar enfermedad en el insecto) y virulentas (causar altos porcentajes de mortalidad en el insecto).
2. Los productos de *B. bassiana* formulados para el control de la broca deben tener una concentración mínima de 1×10^9 conidias por gramo, a partir de cuantificaciones de Unidades Formadoras de Colonia (UFC).
3. El hongo debe aplicarse a una concentración de 2×10^{10} conidias por litro.
4. Para garantizar la eficacia del hongo que se emplee en el control de la broca del café, además de la concentración apropiada, debe cumplir con estándares de calidad: pureza de al menos 95% y una germinación mayor al 90% al cabo de 24 horas (ICA resolución 00375, Vélez *et al.*, 1997).

► ¿Cuántas conidias se requieren para causar la muerte de la broca?

Teóricamente unas pocas conidias de estos hongos entomopatógenos podrían ser capaces de causar la enfermedad en el insecto, pero les tomaría largo tiempo ocasionar su muerte; debido a esto, en ensayos de laboratorio de inmersión de brocas adultas en soluciones de conidias (Figura 5), las cepas o mezclas de hongos se consideran altamente patogénicas cuando estas causan una mortalidad de 100% de los insectos al evaluarlos a concentraciones de 1×10^7 conidias/mL al cabo de 4 días.

La Figura 6 muestra el comportamiento de una cepa con alta virulencia y la mortalidad que causa sobre la broca dependiendo de la concentración de conidias que se evalúan.



Figura 5. Pruebas de virulencia. **a.** Brocas en pruebas de inmersión en el laboratorio (inmersión en tul y beaker); **b.** Brocas en pruebas de pos-infestación (brocas infestando frutos en cajas eppendorf).

► ¿Qué concentración de hongo debe usarse para causar la muerte de la broca en el campo?

Cuando las concentraciones usadas en el laboratorio (1×10^7 conidias/mL) se llevaron a condiciones de campo, y considerando que, en un árbol de café con una edad entre 2 a 4 años, en las ramas con frutos para obtener un buen cubrimiento, debe asperjarse 1,0 mL de solución, se propuso usar 2×10^7 conidias/mL, y 50 mL por árbol de café, lo que corresponde a asperjar 1×10^9 conidias por árbol. Para asperjar esta cantidad de esporas por árbol de café se requiere preparar soluciones de 2×10^{10} conidias/L de agua, siendo esta, la concentración mínima recomendada para su uso en el campo. Para una hectárea con 5.000 árboles la dosis equivale a 5×10^{12} esporas.

Entre mayor concentración de conidias tenga el producto, menor cantidad se requerirá para obtener la concentración recomendada en el campo (Góngora *et al.*, 2009; Góngora, 2011) y podría cubrirse un mayor número de hectáreas.

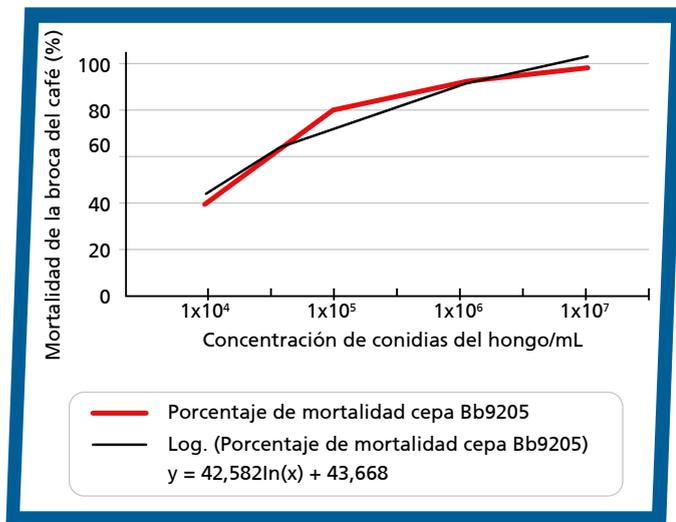


Figura 6. Mortalidad causada por una cepa de *B. bassiana* altamente virulenta sobre la broca del café.

“Las aspersiones del hongo se consideran inundativas, de tal manera que se requerirían al menos entre 2,0 y 20,0 g del hongo por litro de agua, cuando tienen una concentración entre 1×10^{10} y 1×10^9 conidias por gramo de producto, respectivamente.”

► **¿Por qué deben usarse conidias con pureza del 90%?**

La pureza en las formulaciones de hongos es un parámetro de calidad que se refiere a la presencia de otros microorganismos contaminantes; se espera que en las formulaciones no existan bacterias ni otro tipo de hongos (Figura 7), a menos que la formulación así lo indique. El problema que causan los contaminantes es que pueden interferir con la germinación de las conidias del hongo entomopatógeno, al ser antagonistas causan inhibición de la germinación y el crecimiento de las conidias del entomopatógeno, disminuyendo su eficacia.

► **¿Por qué se deben usar conidias del hongo que germinen a las 24 h, con germinación de 90%?**

La rápida germinación es otro atributo de las cepas virulentas, ya que facilita la infección cuando las condiciones climáticas son favorables. Inicialmente

las conidias comienzan el proceso de germinación (Figura 8) en presencia de agua (alta humedad). Si las conidias germinan uniformemente y en altos porcentajes, se producen múltiples sitios de penetración en la cutícula de los insectos y esto le permite al patógeno colonizar rápidamente el insecto, sobreponiéndose a sus defensas y previniendo a su vez la infección con otros microorganismos saprofitos oportunistas (Altre y Vandenberg, 2001). Por esta razón más del 90% de las conidias deben germinar a las 24 h y hacerlo cuando están sobre el insecto.

En el proceso de germinación se produce una estructura adhesiva o apresorio que genera un punto de penetración donde el hongo se fija a la cutícula del insecto causando presión. Como la presión (fuerza x área) y el tamaño de la broca es pequeño, la fuerza generada es relativamente alta, esto facilita la entrada del hongo (Butt *et al.*, 1995). Como consecuencia, este proceso ocasiona distorsión de la cutícula en el sitio de penetración; sin embargo, la presión debe



Figura 7. Pruebas de pureza del hongo *B. bassiana*. **a.** Caja de Petri con *Beauveria* sola; **b.** Caja de Petri con *Beauveria* y contaminada con otros hongos o bacterias.

presentarse en diferentes puntos de la cutícula para que sea efectiva y produzca su rompimiento. Por esto es deseable que varias conidias germinen al mismo tiempo. Adicionalmente, lípidos en el hongo son transportados al apresorio y son transformados en glicerol, que incrementa la presión hidrostática, favoreciendo la penetración mecánica (Wang y St. Leger, 2007). Además de la presión física, los hongos cuentan con múltiples copias de genes que se activan durante el proceso de infección y que corresponden a enzimas que degradan la cutícula; es así como se reportan Kinasas proteicas (PKA), además de grupos de enzimas hidrolíticas extracelulares tipo lipasas, proteasas, quitinasas, fosfolipasa C y catalasas que ayudan en el proceso de penetración (Schrank y Vainstein, 2010).

► ¿Cómo funciona el hongo *B. bassiana* en el campo?

Las aplicaciones de este hongo en el campo para el control de brocas sobre frutos en ramas han demostrado ser eficaces cuando se emplea la concentración de 2×10^{10} conidias/L, el volumen adecuado de 50 mL por árbol y se aplica en el momento oportuno, es decir, cuando el porcentaje de infestación supera el 2,0% en el campo, las brocas están volando y penetrando los frutos y estos tienen más de 120 días de edad.

Adicionalmente, cuando el hongo es asperjado sobre frutos caídos al suelo con presencia de brocas en su interior y estas brocas salen de los frutos, pueden infectarse con el hongo, de tal manera que solo el 50% son capaces de llegar a infestar los frutos del árbol. De las brocas que alcanzan los frutos del árbol, otro 50% muere en el canal de penetración y las brocas que no mueren durante la penetración

del fruto y alcanzan a llegar a la semilla, muestran una disminución hasta del 90% en el número de huevos que depositan (Vera *et al.*, 2007). Una broca infectada con el hongo que no muere penetrando el fruto, es una broca enferma que va a tener menos descendencia, por lo que el hongo disminuye las poblaciones futuras del insecto en el cafetal.

Sin embargo, en todas las evaluaciones que se han realizado bajo condiciones de campo y con formulaciones de *B. bassiana*, se ha comprobado que el hongo sólo es eficaz cuando las conidias entran en contacto con la broca adulta.

► ¿Qué es la producción artesanal del hongo?

Con base en aislamientos del hongo obtenidos de la broca desde 1990 en Cenicafé, entre los años 1995 y 2000 en Colombia se inició la producción artesanal del hongo por parte de los caficultores y las aplicaciones en gran parte de la zona cafetera colombiana (Posada y Bustillo, 1994).

La producción consistió en el crecimiento del hongo en sustrato de arroz usando bandejas, bolsas o botellas de vidrio (Figura 9). Después de producir conidias, el hongo era asperjado. La cuantificación de la cantidad de conidias que se producía y el cálculo de las dosis junto con el control de las condiciones asépticas y la contaminación causada por otros hongos era complicado, ya que no cumplía con los estándares de calidad: pureza y germinación del hongo.

Sin embargo, fue en parte debido a este programa de producción artesanal y aplicaciones, en una época en la que no se producían cepas comerciales, que hoy en día se registra un control natural de aproximadamente

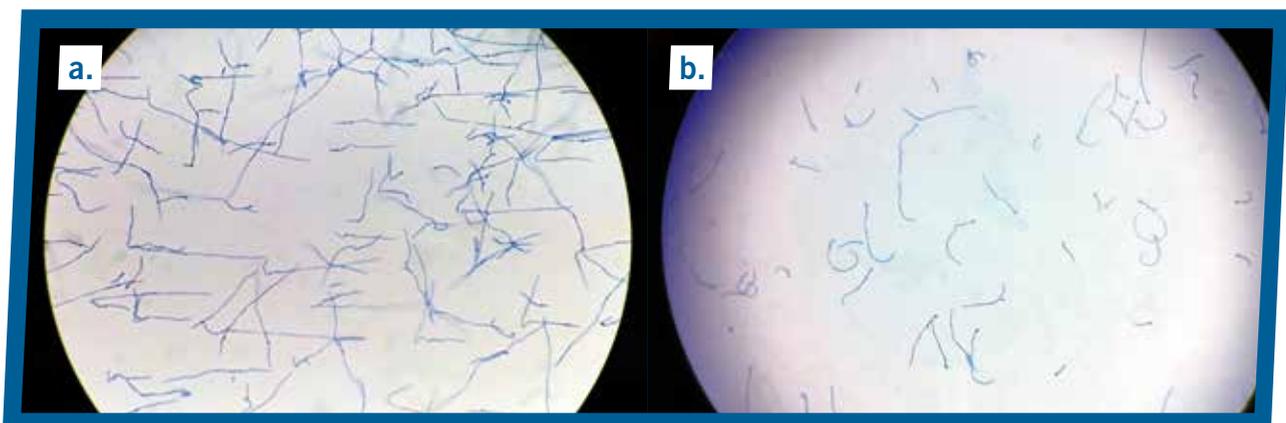


Figura 8. Conidias germinadas después de 24 horas. a. Alta germinación; b. Baja germinación.



Figura 9. Hongo producido artesanalmente en sustrato de arroz en bolsa y en bandeja.

un 10% en los experimentos realizados en Cenicafé, donde se evalúan nuevas cepas de *B. bassiana*. Por lo tanto, si el hongo no estuviera ejerciendo este efecto sobre las poblaciones de la plaga, las pérdidas ocasionadas en la caficultura colombiana serían mayores (Góngora *et al.*, 2009).

▶ ¿Qué es una formulación de hongo?

Las formulaciones consisten en una combinación de ingredientes, de tal forma que las conidias de los hongos se mantienen vivas, estables, efectivas y fáciles de aplicar. La mayoría de las formulaciones de hongos entomopatógenos se producen con materiales inertes como polvos y microtalcos, que deben ser resuspendidos en agua con coadyuvantes, como aceites emulsionables.

Las formulaciones deben indicar la cantidad de conidias por gramo de producto comercial, el grado de pureza y la fecha de vencimiento, que indica el tiempo en el que el hongo será efectivo para el control del insecto.

▶ ¿Cómo debe prepararse el hongo para hacer aplicaciones en el campo?

- a. Se requiere revisar la fecha de vencimiento del producto, mantenerlo en un lugar fresco y garantizar condiciones de humedad en el

ambiente durante las aspersiones, de tal manera que no se expongan las conidias a la radiación directa del sol.

- b. La preparación del hongo en el campo debe seguir las recomendaciones consignadas en las etiquetas del producto comercial, las cuales fueron aprobadas por el ICA e indican el modo de preparación y la necesidad de usar un aceite agrícola.
- c. La aplicación del hongo debe realizarse en el momento oportuno, cuando los frutos de la cosecha principal se encuentren en el período crítico para ser atacado por la broca (120 días después de la floración principal), la infestación supere el umbral de acción del 2,0% y la broca esté volando, es decir, el 50% de los adultos estén en posiciones A y B (Figura 2), penetrando los frutos.
- d. Para hacer la aspersión se requiere una calibración apropiada de los equipos de aspersión, que permita un buen cubrimiento de conidias sobre los frutos a proteger.

▶ ¿Cómo afectan las condiciones ambientales al hongo *B. bassiana*?

El crecimiento y desarrollo del hongo está limitado principalmente por condiciones medioambientales adversas, especialmente la radiación solar, la baja humedad y las altas temperaturas.

La eficacia de *B. bassiana* se ve afectada por la temperatura, la humedad, la radiación ultravioleta y por la actividad biológica de otros organismos, siendo deseable aplicarlo en temperaturas de 23 a 28°C y una humedad relativa mayor del 90% (Bustillo *et al.*, 1998). Las conidias permanecen sobre los frutos únicamente de 4 a 5 días, y deben entrar en contacto con el insecto en las primeras 24 horas, momento en que deben estar en presencia de agua para que puedan germinar y ocasionar el daño a la cutícula.

Lo que se busca después de cada aplicación es reducir los porcentajes de infestación por broca y el daño en los frutos de la cosecha que se está formando. Es por esto que, en la selección de cepas como posibles agentes biocontroladores de la broca, debe considerarse su virulencia, esporulación, dosis y forma de aspersión, ya que estas variables determinan la eficacia de *B. bassiana* en el control de la broca del café.



Señor caficultor:

El manejo de la broca con el hongo *Beauveria bassiana* debe realizarse cuando el porcentaje de infestación supere el 2% y más del 50% de los frutos perforados tengan broca en posiciones A y B. El hongo requiere condiciones de alta humedad relativa (mayor del 70%) y temperaturas óptimas para su efectividad en el control de la broca.

Literatura citada

- Altre, J.A. y Vandenberg, J.D. (2001). Penetration of cuticle and proliferation in hemolymph by *Paecilomyces fumosoroseus* isolates that differ in virulence against lepidopteran larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78(2), 81-86.
- Borges, M. y Aldrich, J.r. (1992). Instar-specific defensive secretions of stink bugs (Heteroptera, Pentatomidae). *Experientia*, 48, 893-896.
- Butt, T.m.; Coates, C.J.; Dubovskiy, I.M. y Ratcliffe, N.A. (2016). Entomopathogenic fungi: new insights into host-pathogen interactions. *Advances in Genetics*, 94, 307-364.
- Butt, T.M.; Ibrahim, L.; Clark, S.J. y Beckett, A. (1995). The germination behaviour of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles. *Mycological Research*, 99(8), 945-950.
- Cárdenas R., A.B.; Villalba G., D.A.; Bustillo P., A.E.; Montoya R., E.C. y Góngora B., C.E. (2007). Eficacia de mezclas de cepas del hongo *Beauveria bassiana* en el control de la broca del café. *Cenicafé*, 58(4), 293-303.
- Góngora B., C.E. (2011). *Cómo usar el hongo Beauveria bassiana para proteger su cosecha*. (Brocarta No. 42). Manizales: Cenicafé.
- Góngora B., C.E.; Marín M., P. y Benavides M., P. (2009). *Claves para el éxito del hongo Beauveria bassiana como controlador biológico de la broca del café*. (Avance Técnico No. 381). Manizales: Cenicafé.
- Lopes, R.B.; Laumann, R.A.; Blassoli-Moraes, M.C.; Borges, M. y Faria, M. (2015). The fungistatic and fungicidal effects of volatiles from metathoracic glands of soybean-attacking stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae) on the entomopathogen *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 77-85.
- Posada F., F.J. y Bustillo P., A.E. (1994). El hongo *Beauveria bassiana* y su impacto en la caficultura colombiana. *Agricultura Tropical*, 31(3), 97-106.
- Schrank, A. y Vainstein, M. H. (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56(7), 1267-1274.
- Shapiro-Ilan, D.I.; Fuxa, J.R.; Lacey, L.A.; Onstad, D.W. y Kaya, H.K. (2005). Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88(1), 1-7.
- Vélez A., P.E. y Benavides G, M. (1990). Registro e identificación de *Beauveria bassiana* en Ancuyá, Nariño, Colombia. *Cenicafé*, 41(2), 50-57.
- Vélez a., Pe.; Posada F., F.J.; Marín M., P.; González G., M.T.; Osorio V., E. y Bustillo P., A.E. (1997). *Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos*. (Boletín Técnico No. 17). Chinchiná: Cenicafé.
- Vera, L.Y.; Gil, Z.N. y Benavides M., P. (2007). Identificación de enemigos naturales de *Hypothenemus hampei* en la zona cafetera central colombiana. *Cenicafé*, 58(3), 185-195.
- Wang, C. y ST Leger, R.J. (2007). The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell*, 6(5), 808-816.

