

# REGISTRO E IDENTIFICACION DE *Beauveria bassiana* EN *Hypothenemus hampei* EN ANCUYA, DEPARTAMENTO DE NARIÑO, COLOMBIA.

Patricia Eugenia Vélez-Arango\*; Marcial Benavides-Gómez\*\*

---

## RESUMEN

VELEZ A., P.E.; BENAVIDES G., M. Registro e identificación de *Beauveria bassiana* en *Hypothenemus hampei* en Ancuya, departamento de Nariño, Colombia. Cenicafé (Colombia). 41(2):50-57 1990.

A partir de muestras de cerezas de café brocadas e insectos muertos de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867), procedentes de la zona de Ancuya, Departamento de Nariño, se aisló el hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, el cual fue caracterizado en laboratorio y campo, mediante pruebas culturales y de patogenicidad en *Araccerus fasciculatus* De Geer, insecto del orden Coleoptera y en *H. hampei*. El hongo *B. bassiana*, presente en el primer foco de broca registrado en Colombia, se muestra promisorio en el control biológico de esta plaga de importancia económica en café, con características particulares de adaptación a dicho medio ecológico.

**Palabras claves:** Colombia, broca del cafeto, *Hypothenemus hampei*, identificación y registro, control biológico.

---

## ABSTRACT

From samples of cherries showing berry borer attack, and from dead insects -*Hypothenemus hampei*- originating in the Ancuya zone, Department of Nariño, the fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, was isolated. This was characterised in the laboratory and field using laboratory cultures and pathogenicity against *Araccerus fasciculatus* De Geer (Order Coleoptera) and *H. hampei*. This fungus, *B. bassiana* present in the first focus of coffee berry borer recorded in Colombia, shows promise in biological control of this economically important pest of coffee, with characteristics particularly suited to this ecological zone.

**Keywords:** Colombia, coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, isolation and identification, *Beauveria bassiana*, biological control.

---

\* Investigador Científico I. Fitopatología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFE, Chinchiná, Caldas, Colombia.

\*\* Investigador Científico III. Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFE, Chinchiná, Caldas, Colombia.

Un aspecto importante en el control de insectos mediante el uso de organismos entomopatógenos, es el reconocimiento previo de los patógenos existentes bajo condiciones naturales en las poblaciones de insectos plagas. (13).

Las investigaciones en patología de insectos en varios países, se orientan hacia la utilización de los hongos pertenecientes a las clases Hyphomycetos, Zygomycetos y algunas especies de Chytridiomycetos. (10, 13).

Actualmente existen abundantes especies de Hyphomycetos patógenos de insectos, algunos multiplicados y producidos comercialmente como el Boverin, cuyo componente es *Beauveria bassiana*, usado en Rusia para el control de *Leptinotarsa decemlineata* Say y *Laspeyresia pommonella* L. (10). *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viégas es un parásito de muchas especies de insectos de los órdenes Homoptera, Coleoptera y Lepidoptera. Tiene una distribución cosmopolita y actualmente existen formulaciones comerciales de éste, para controlar áfidos y moscas blancas. En Colombia se han observado epizootias del hongo sobre *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) en cultivos de frijol en Rionegro (5). De igual manera, en La Florida (EE. UU.) se ha usado una preparación biológica del hongo *Hirsutella thompsonii* en el control del ácaro *Phyllocoptruta oleivora* y los estudios de campo han demostrado que la aspersión del hongo en los cultivos de cítricos, tiene posibilidades prácticas para el control biológico del ácaro. (10).

Las especies del género *Beauveria* son principalmente patógenas de insectos. Dos especies, *B. bassiana* y *B. tenella*, son las más importantes. *B. bassiana* es muy conocida por su amplio rango de hospedantes y distribución geográfica. Su patogenicidad se ha probado contra más especies de insectos que cualquier

otro hongo. En el trópico se ha encontrado a *B. bassiana* en *Leptinotarsa undecemlineata*, especie que afecta solanáceas, lo cual sugiere la posibilidad de utilizarla en el control de esta plaga. *B. bassiana* se ha encontrado atacando a la broca del fruto del café, *Hypothenemus hampei*, en Guatemala. (2).

Numerosos hongos entomopatógenos encontrados en Ecuador y Brasil durante los años 1974 a 1979, fueron identificados como especies del género *Beauveria* y alcanzaron proporciones epizooticas. Una especie fue registrada en larvas de Arctiidae y la otra especie, en adultos de Coleoptera. (14). Villacorta (15), registró la presencia de *Beauveria* sp. infectando la broca del café *H. hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) en el estado de Paraná, Brasil.

En Colombia se ha aislado el hongo *B. bassiana* de 22 especies de insectos pertenecientes en su mayoría a Lepidópteros y Coleópteros. Su presencia es más frecuente en cultivos de palma africana en donde ataca los Lepidópteros *Brassolis sophorae*, *Sibine* sp., *Opsiphanes* sp. y *Stenoma cecropia* Meyrick. En arroz se ha encontrado en la zona de Urabá atacando a *Spodoptera frugiperda* y en cacao sobre *Monalonium* sp. En maracuyá infecta ocasionalmente larvas de *Agraulis junio* Cramer, en lulo sobre adultos de *L. undecemlineata* Stal y en plátano sobre el picudo *Metamasius hemipterus* (Olivier). (5).

La categoría de patógenos facultativos incluye un número de especies, las cuales se desarrollan fácilmente en los cultivos debido a sus simples requerimientos nutricionales; y las especies de este grupo tienen un extenso rango de huéspedes. Tal es el caso de ciertos Hyphomycetes, como *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sor., el cual afecta más de 200 especies de insectos, y *B. bassiana* (Bals.) Vuill., para el que se conocen cerca de 500

especies hospedantes. Sin embargo, en *M. anisopliae* y *B. bassiana* se han demostrado numerosos patotipos, estrechamente ligados a sus hospedantes respectivos y los cuales no muestran ninguna patogenicidad hacia otras especies de insectos. (9).

Jiménez (11) en Inglaterra, probó varias cepas de *B. bassiana*, aisladas de diversos hospedantes, respecto a su patogenicidad a la broca del café, *H. hampei*. En su estudio encontró diferencias en patogenicidad de *B. bassiana* hacia *H. hampei* y seleccionó finalmente 16 cepas activas contra este insecto.

Por las razones planteadas en los dos párrafos anteriores, cobra mucha importancia el aislamiento de *B. bassiana* de diferentes insectos, con miras a una futura caracterización de las cepas de acuerdo a su rango de hospedantes.

El presente trabajo tiene como objetivos: contribuir al registro de hongos entomopatógenos existentes en el país, mediante la descripción de un aislamiento de *B. bassiana* que ataca un hospedante de importancia económica, como es el caso específico de la broca del café *Hypothenemus hampei*; caracterizar dicho aislamiento teniendo en cuenta algunos aspectos culturales, y realizar pruebas de patogenicidad en otros insectos del orden Coleoptera, *Araecerus fasciculatus* De Geer y en la broca del café, *H. hampei* (Ferrari).

## MATERIALES Y METODOS

El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología del Centro Nacional de Investigaciones de Café, Chinchiná, Caldas, Colombia.

Muestras de cerezas brocadas y adultos muertos de broca procedentes de Ancuya,

Nariño, se llevaron al laboratorio con la siguiente sintomatología:

- Insectos muertos: Momificación y cubrimiento de la superficie corporal del insecto por un micelio blanco algodonoso.
- Cerezas brocadas: Micelio blanco algodonoso en el disco o corona del fruto, lugar por el cual la hembra perfora con sus mandíbulas la cereza (3).

Para efectuar la correcta identificación del patógeno, fue indispensable aislarlo en medios de cultivo artificiales como Sabouraud-dextrosa agar (SDA) y Papa-dextrosa agar (PDA). Ambos medios se utilizaron con y sin adición de ácido láctico al 44%, con el objeto de aislar hongos y bacterias, respectivamente.

Para la preparación de las muestras para insectos muertos se siguió este procedimiento:

- Se sumergieron durante 5 minutos en agua destilada con el detergente "teepol" (nombre comercial).
- Se lavaron en el chorro de agua para remover el detergente.
- Se sumergieron durante 2 minutos en hipoclorito de sodio al 2%.
- Se eliminó el exceso de humedad, depositándolos en toallas de papel.
- Se sembraron en SDA y en PDA con y sin ácido láctico al 44%.
- Se incubaron a 22-25°C hasta obtener algún tipo de crecimiento.

Para cerezas brocadas, una vez cortada una parte representativa que albergue el hon-

go, se sometieron las cerezas al mismo procedimiento utilizado para los insectos muertos.

**Identificación de las cepas.** El proceso de identificación se hizo mediante el empleo de claves taxonómicas basadas en características culturales y morfológicas y envió a centros de referencia especializados.

**Pruebas de patogenicidad (Laboratorio y Campo).** Con suspensiones conidiales de cada una de las cepas se asperjaron gorgojos del café *Araecerus fasciculatus* (De Geer) (Coleoptera: Anthribidae), utilizando 25 especímenes por tratamiento, de la siguiente manera:

- $10^7$  conidias/ml : 25 adultos asperjados
- $10^6$  conidias/ml : 25 adultos asperjados
- Agua destilada estéril (Testigo): 25 adultos asperjados

Los insectos se distribuyeron en frascos de boca ancha con granos de café pergamino seco y se dejaron en oscuridad a 22-25°C. Se registró diariamente el número de insectos afectados. La aspersión se realizó con un aplicador manual.

Posteriormente se hizo aplicación de la cepa aislada de Ancuya, en el campo, específicamente en otro foco de broca registrado en el Departamento del Valle, Municipio de Ansermanuevo. La cepa fue cultivada en medios naturales (extracto de tallos tiernos de café). Para las aplicaciones se ajustó a 2 litros la suspensión de esporas en extracto de tallos tiernos (300 g/L en erlenmeyer de 1.000 ml más gorgojo muerto macerado), mediante adición de tritón X-45 al 0,05%, para una concentración final de  $3,8 \times 10^7$  conidias/ml.

Para la aplicación se utilizó el equipo Calimax Leo Cafetera, con una boquilla HC3, la cual tiene un flujo de 200 cm<sup>3</sup>/min a 40 PSI, para un volumen total de 200 cm<sup>3</sup> por árbol. Se hicieron evaluaciones quincenales del proceso de infección del hongo en los granos brocados, con el siguiente esquema de evaluación teniendo en cuenta aplicaciones dirigidas al árbol: se tomaron 5 árboles seleccionando al azar 6 ramas por árbol. En cada rama se consideró: número total de frutos, número de frutos brocados y frutos con síntoma de ataque por *B. bassiana*. Parte de las muestras con crecimiento fúngico se examinaron en el laboratorio de patología de insectos para la confirmación de su identificación (6).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Diez días después del procesamiento de las muestras se obtuvo un micelio blanco pulverulento, bordeando las colonias de otros hongos presentes en las muestras (*Trichoderma*, *Mucor*, y *Pestalotia*).

Mediante la técnica de microcultivo se llegó a la identificación de Género por las siguientes características que describen la clasificación taxonómica del hongo:

- Colonias de crecimiento lento que no exceden de 2 cm de diámetro en 10 días a 20°C, lanosas, al principio blancas que cambian luego a color amarillo o rosado.
- Células conidiógenas solas, en espirales de hifas vegetativas o más comúnmente en agrupaciones de células con tallos prominentes.
- Células conidiógenas diferenciadas en vientres subglobosos a elipsoidales o cilíndricos y un raquis filiforme, en zig zag, den-

go, se sometieron las cerezas al mismo procedimiento utilizado para los insectos muertos.

**Identificación de las cepas.** El proceso de identificación se hizo mediante el empleo de claves taxonómicas basadas en características culturales y morfológicas y envió a centros de referencia especializados.

**Pruebas de patogenicidad (Laboratorio y Campo).** Con suspensiones conidiales de cada una de las cepas se asperjaron gorgojos del café *Araecerus fasciculatus* (De Geer) (Coleoptera: Anthribidae), utilizando 25 especímenes por tratamiento, de la siguiente manera:

- $10^7$  conidias/ml : 25 adultos asperjados
- $10^6$  conidias/ml : 25 adultos asperjados
- Agua destilada estéril (Testigo): 25 adultos asperjados

Los insectos se distribuyeron en frascos de boca ancha con granos de café pergamino seco y se dejaron en oscuridad a 22-25°C. Se registró diariamente el número de insectos afectados. La aspersión se realizó con un aplicador manual.

Posteriormente se hizo aplicación de la cepa aislada de Ancuya, en el campo, específicamente en otro foco de broca registrado en el Departamento del Valle, Municipio de Ansermanuevo. La cepa fue cultivada en medios naturales (extracto de tallos tiernos de café). Para las aplicaciones se ajustó a 2 litros la suspensión de esporas en extracto de tallos tiernos (300 g/L en erlenmeyer de 1.000 ml más gorgojo muerto macerado), mediante adición de tritón X-45 al 0,05%, para una concentración final de  $3,8 \times 10^7$  conidias/ml.

Para la aplicación se utilizó el equipo Calimax Leo Cafetera, con una boquilla HC3, la cual tiene un flujo de  $200 \text{ cm}^3/\text{min}$  a 40 PSI, para un volumen total de  $200 \text{ cm}^3$  por árbol. Se hicieron evaluaciones quincenales del proceso de infección del hongo en los granos brocados, con el siguiente esquema de evaluación teniendo en cuenta aplicaciones dirigidas al árbol: se tomaron 5 árboles seleccionando al azar 6 ramas por árbol. En cada rama se consideró: número total de frutos, número de frutos brocados y frutos con síntoma de ataque por *B. bassiana*. Parte de las muestras con crecimiento fúngico se examinaron en el laboratorio de patología de insectos para la confirmación de su identificación (6).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Diez días después del procesamiento de las muestras se obtuvo un micelio blanco pulverulento, bordeando las colonias de otros hongos presentes en las muestras (*Trichoderma*, *Mucor*, y *Pestalotia*).

Mediante la técnica de microcultivo se llegó a la identificación de Género por las siguientes características que describen la clasificación taxonómica del hongo:

- Colonias de crecimiento lento que no exceden de 2 cm de diámetro en 10 días a 20°C, lanosas, al principio blancas que cambian luego a color amarillo o rosado.
- Células conidiógenas solas, en espirales de hifas vegetativas o más comúnmente en agrupaciones de células con tallos prominentes.
- Células conidiógenas diferenciadas en vientres subglobosos a elipsoidales o cilíndricos y un raquis filiforme, en zig zag, den-

ticulado, surgiendo por elongación simpodial.

- Conidias hialinas, globosas o elipsoidales, con una base redondeada o levemente puntual (7).

**Clave para especies.** Conidias globosas o subglobosas (raramente anchas, elipsoidales): *B. bassiana* (7).

Se hizo aislamiento de 2 cepas de *Beauveria*, una proveniente de adultos muertos y otra proveniente de cerezas de café brocadas. Las cepas se incluyeron en la codificación existente en la Disciplina de Fitopatología, con la denominación **Cenicafé 069** para la cepa aislada de adultos muertos y **Cenicafé 001** para la cepa aislada de cerezas brocadas.

Por las características culturales y morfológicas de las cepas, se identificó la especie *B. bassiana* en el laboratorio de CENICAFE; pero con el fin de obtener la identificación por parte de centros de referencia autorizados, se enviaron muestras de los cultivos puros en SDA inclinado al servicio de identificación del CAB International Mycological Institute, en Inglaterra, cuyos especialistas confirmaron que las dos cepas enviadas correspondían a *B. bassiana*. (Tabla 1).

En los aislamientos del hongo puro en SDA, se encontraron estructuras largas en forma de tallos o grupos de conidióforos unidos en la base y en parte de su recorrido hacia el extremo, el cual presentaba ramificaciones, con formación de conidias en las terminaciones de las ramas. Dichas estructuras presentaban un color amarillo pálido a naranja pálido. Un examen histológico de los cortes de la estructura completa confirmó la identificación de sinemas o coremios en este tipo de fructificación. En algunos sinemas el pie es largo en comparación con el extremo ramificado, de

TABLA 1. Informe de identificación de cepas de *B. bassiana*, presentado por el CAB International Mycological Institute, Inglaterra.

Código Cenicafé	Número Instituto Micológico	Identificación
(001)	337418	<i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuill. Identificación provisional confirmada
(069)	337419	<i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuill. Identificación provisional confirmada

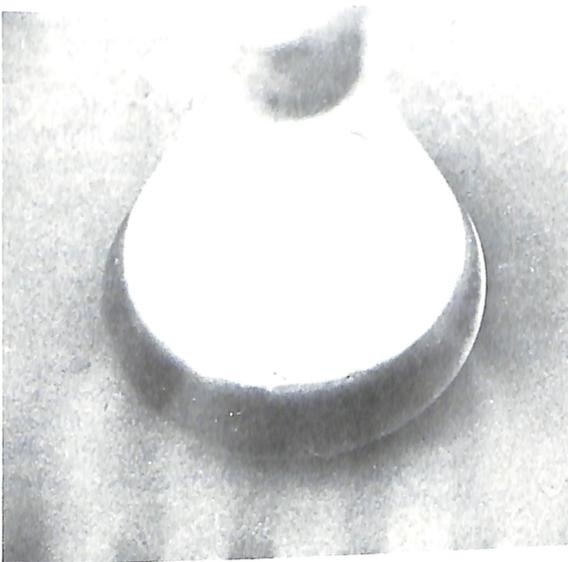
modo que el cuerpo fructífero parece un plumero con cabo largo; característica que presentan los sinemas registrados en las dos cepas de *B. bassiana* aisladas (1, 4, 8) (Figuras 1 y 2).

Samson y Evans (14), registran en *B. amorpha* la formación de sinemas como una característica esencial para una eficiente dispersión de esporas, pero no es consistente, puesto que este tipo de estructuras son raramente formadas en cultivo.

Para las cepas 069 y 001 se ha encontrado consistencia en el desarrollo de sinemas en medios de cultivo semisintéticos: Sabouraud-dextrosa-agar (SDA), caldo-papa-dextrosa (CPD) y naturales (arroz cocido), a través del tiempo, razón por la cual se atribuye como característica inherente de las cepas. Otras cepas de *B. bassiana* existentes en el laboratorio, provenientes de otros insectos hospedantes, no presentan los sinemas de las cepas aisladas de Ancyua.



**Figura 1.** Desarrollo de sinemas de *B. bassiana* (069 y 001) en medio de arroz cocido. Se observa pigmento amarillo pálido a naranja pálido en los grupos de conidióforos compactos y ramificaciones terminales.



**Figura 2.** Desarrollo incipiente de sinemas de *B. bassiana* en Caldo Papa Dextrosa (CPD).

Un pigmento rojo, bibenzoquinona, oosporéina, con propiedades antifúngicas y los pigmentos amarillos tenellin y bassianin, se han encontrado en *B. bassiana* (7). Ambas cepas (069 y 001) desarrollaron un pigmento amarillo claro en el reverso de la colonia, cuando se cultivaron en medios SDA y PDA; y un pigmento rojizo a púrpura, cuando fueron cultivadas en arroz. Tales pigmentos presentaron mayor intensidad cuando los cultivos se incubaron a 22-25° en luz constante y se eliminaron con pases sucesivos de las cepas en SDA. La variación en producción de pigmentos y en morfología del cultivo, indica la diversidad metabólica en hongos del género *Beauveria* (12).

Respecto a la prueba de patogenicidad realizada en laboratorio, asperjando suspensiones conidiales del hongo al gorgojo de café, se obtuvo al cabo de 7 días mortalidad total en los insectos sometidos a la acción del hongo, para las 2 concentraciones probadas, con relación al testigo en el cual permanecieron vivos los insectos.

En la prueba de campo se manifestó la infección causada por *B. bassiana* en todos los árboles y su incidencia en la población de granos brocados varió entre 28,2 y 47,1%, para un promedio del 36%.

Los resultados obtenidos permitieron concluir que bajo las condiciones en las cuales se aplicó el hongo, se puede llegar a desarrollar una epizootia. Reaislamientos de *B. bassiana* a partir de muestras traídas al laboratorio y procedentes de la zona del Municipio de Ansermanuevo, en la cual se realizaron las aspersiones, confirmaron las mismas características de la cepa Cenicafé 069 aplicada: formación de sinemas de color amarillo pálido y aspecto pulverulento de la colonia.

Con el aislamiento de *B. bassiana* de los insectos afectados (gorgojo y broca), se confirman los postulados de Koch, para demostrar la causalidad de un agente infeccioso.

Actualmente se tienen las cepas en forma liofilizada y en Nitrógeno líquido (-196°C); y para obviar la pérdida de patogenicidad registrada por pases sucesivos en medios sintéticos o semisintéticos (11) se están haciendo transferencias sucesivas a medios, con macerado de insectos muertos (gorgojo y broca) en agar-agua al 2%.

Aunque la codificación realizada para las cepas incluye dos denominaciones diferentes (069 y 001), de acuerdo a la fuente, se cree que puede tratarse de una misma cepa debido a la uniformidad en sus características culturales (tipo de crecimiento pulverulento y desarrollo de sinemas).

Las cepas aisladas constituyen cepas nativas que ya tienen probablemente una adaptación ecológica al ambiente en el cual se estableció por primera vez la broca en Colombia.

## AGRADECIMIENTOS

Al Microbiólogo Alvaro Gaitán B., de la Disciplina de Fitopatología, quien facilitó las labores de identificación, mediante la realización de los cortes histológicos.

## LITERATURA CITADA

1. ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. *Introductory Mycology*. 3 ed. New York (Estados Unidos) John Wiley & Sons. 1979. 632 p.
2. ANDREWS, K.L.; QUEZADA, J.R. Manejo integrado de plagas insectiles en la agricultura. *El Zamorano* (Honduras). Escuela Agrícola Panamericana, 1989. 623 p.
3. BENAVIDES G., M.; CARDENAS M., R. La broca del café (*Hypothenemus hampei*). Chinchiná (Colombia), Cenicafé, 1975. 4 p. (Avances Técnicos Cenicafé No. 41).
4. BENHAM, R.W.; MIRANDA, J.L. The Genus *Beauveria*, morphological and taxonomical studies of several species and of two strains isolated from wharf-piling borers. *Mycology* (Estados Unidos), 45:727-746. 1953.
5. BUSTILLO, A.E. Enfermedades en insectos y posibilidades de uso en programas de manejo integrado de plagas en Colombia. Medellín (Colombia) ICA. 1987. 7p. (Manuscrito no publicado).
6. CASTILLO S., H.A. Informe anual de Labores. Entomología. Chinchiná (Colombia), Cenicafé, 1990. 26 p. (Informe Interno).
7. DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; T.H. ANDERSON. *Compendium of soil fungi*. Londres (Inglaterra), Academic Press, 1980. 895 p.
8. EVANS, H.C. Entomogenous fungi in tropical forest ecosystems: an appraisal. *Ecological Entomology* (Inglaterra). 7:47-60. 1982.
9. FARGUES, J.; REMAUDIERE, G. Considerations on the specificity of entomopathogenic fungi. *Mycopathology* (Holanda) 62(1):31-37. 1977.
10. FERRON, P. Biological control of insects pests by entomogenous fungi. *Annual Review Entomology* (Estados Unidos) 23:409-442. 1978.
11. JIMENEZ G., J.A. Evaluación de la patogenicidad de razas de *Beauveria bassiana* a la broca del café *Hypothenemus hampei*. Chinchiná (Colombia), Cenicafé, 30p. 1989. (Informe de investigación. mecanografiado).
12. ROBERTS, D.W.; YENDOL, W.G. Use of fungi for microbial control of insects. In: BURGESS, H.D. and HUSSEY N.W. (eds) *Microbial control of insects and mites*. New York

(Estados Unidos), Academic Press, 1971, p. 125-149.

13. RODRIGUEZ S., D.A. Hongos entomopatógenos registrados en Colombia. Revista Colombiana de Entomología (Colombia) 10(1-2):57-64. 1984.

14. SAMSON, R.A.; EVANS, H.C. Two new *Beauveria* spp. from South America. Journal

of Invertebrate Pathology. (Estados Unidos) 39:93-97. 1982.

15. VILLACORTA, A. Ocorrência de *Beauveria* sp. infectando a broca do café - *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae) em lavouras no estado do Paraná. Anais da Sociedade Entomologica do Brasil (Brasil). 13 (1): 177-178. 1984.