

# Estructura fina de clamidosporas de *Beauveria bassiana* en medios suplementados con oxiclورو de cobre

Fine structure of *Beauveria bassiana* chlamydo spores in culture amended with copper oxychloride

Armando Rivera Malo<sup>1</sup>  
Alex E. Bustillo Pardey<sup>2</sup>

## Resumen

El hongo *Beauveria bassiana*, patógeno de la broca del café, *Hypothenemus hampei*, crece en SDA o arroz y raramente produce clamidosporas en dichos medios; sin embargo, cuando se suplementaron con 600, 3000 y 6000 ppm de oxiclورو de cobre, noventa y nueve aislamientos procedentes de diferentes órdenes de insectos produjeron una gran cantidad de clamidosporas. El citoplasma de la clamidospora de todos los aislamientos contiene una gran cantidad de cuerpos lipídicos y vacuolas, mitocondrias y retículo endoplásmico, todos típicos de células fúngicas. La inducción de clamidosporas en *B. bassiana* puede ser de interés para desarrollar formulaciones para el control de insectos terrestres debido a la persistencia de esta estructura. Es la primera vez que se registra en la literatura la producción de clamidosporas por *B. bassiana*.

**Palabras claves:** *Beauveria bassiana*, Clamidospora, Oxiclورو de cobre, Broca de la cereza del café, *Hypothenemus hampei*, Control biológico.

## Summary

The entomogenous fungus, *Beauveria bassiana*, pathogen of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, when growing on SDA or rice rarely produces chlamydo spore; however, when SDA and rice were amended with 600, 3000 & 6000 ppm of copper oxychloride, ninety-nine isolates from different insect orders produced a large number of chlamydo spores. The chlamydo spore cytoplasm of all isolates contain large lipid deposits and vacuoles, mitochondria and endoplasmic reticulum, all typical of fungal

cells. The induction of chlamydo spores in *B. bassiana* may be of interest in developing formulations for control of terrestrial insects due to the persistence of this structure. This is the first time that a chlamydo spore formation in *B. bassiana* is reported.

**Key words:** *Beauveria bassiana*, Chlamydo spore, Copper oxychloride, Coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, Biological control.

## Introducción

La broca de la cereza del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), es la plaga más severa del cultivo en Colombia y en la mayoría de países productores de café. El interés en emplear un control alternativo ha aumentado pues el control químico se ha vuelto económica y ambientalmente desfavorable. En Colombia, particular atención ha sido enfocada en el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, que es un patógeno natural de la plaga, además de ser ambientalmente seguro y fácil de producir en masa (Bustillo 1991).

La hembra de *H. hampei* hace galerías en el endospermo del fruto del café donde pone huevos, durante este evento el fruto puede caer al suelo permaneciendo como una fuente de reinfestación después de la cosecha (Baker *et al.* 1992). En tiempo seco, se ha encontrado que los frutos del suelo tienen más hembras que los infestados en el árbol. Los factores que influyen en la emergencia de adultos de broca a partir de frutos caídos son la temperatura y la lluvia, así mismo, evitan condiciones húmedas en el suelo y a hongos como *B. bassiana* (Baker 1984).

En *B. bassiana* ni clamidosporas, ni la fase sexual o telomorfo han sido observados (MacLeod 1954, De Hoog 1972, CMI Descriptions 1979). Hay evidencia en la literatura que sugiere que las clamidosporas son estructuras de resistencia que surgen en condiciones adversas, las cuales permiten viabilidad durante considerables períodos de tiempo, teniendo funciones primarias de

sobrevivencia; se ha establecido que éstas siempre surgen como una consecuencia de condensación citoplásmica, formándose a expensas de las células hifales vecinas (Langeron y Van Breuseghem 1965).

Carrión *et al.* (1990) mostraron que *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas cultivado en medios con triadimefon o cobre formaron estructuras resistentes como esclerocios; además, se observaron clamidosporas en *Fusarium oxysporum* (Schlecht) cuando crecía en una solución de potasio fosfato monobásico y sulfato de magnesio suplementado con glucosa (Qureshi y Page 1970).

Experimentos sobre compatibilidad de *B. bassiana* con agroquímicos *in vitro* (Rivera 1993) demostraron que el oxiclورو de cobre permite el desarrollo del hongo, aunque más lento y con una morfología macroscópica diferente. En este trabajo se registra por primera vez y se describe la clamidospora de *B. bassiana* formada en medios suplementados con oxiclورو de cobre.

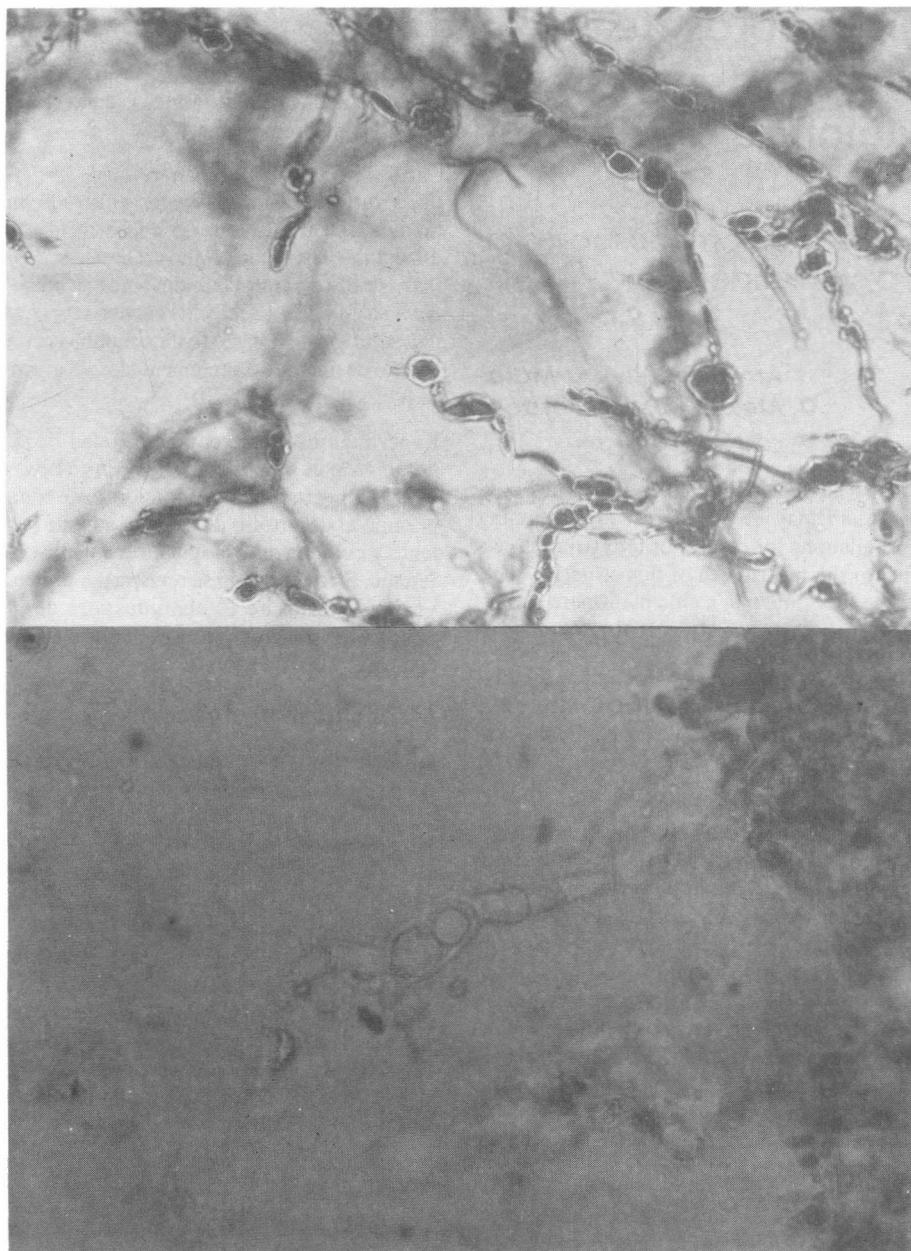
## Materiales y Métodos

Noventa y nueve aislamientos multiespóricos de *B. bassiana* de diferente origen geográfico, aislados a partir de diferentes insectos de los órdenes Coleoptera (61), Hemiptera (4), Himenoptera (3), Homoptera (6), Lepidoptera (17), Ortoptera (1) y de origen desconocido (7) pertenecientes a la micoteca de CENICAFE, crecieron en Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) acidificado con ácido láctico (0.37%) y arroz, esterilizado al baño María; después de la esterilización, se les adicionó a los dos medios oxiclورو de cobre, en concentraciones de 600 ppm (pH 4.5 y 6.1), 3000 ppm (pH 5.0 y 6.1) y 6000 ppm (pH 5.3 y 6.4), para después inocularlos con los diferentes aislamientos e incubarlos a 25°C por 30 días.

Después de 5-7 días, los cultivos procedentes de los platos de petri (Fig. 1a) o de botellas (Fig. 1b) se tiñeron con lactofenol y se observaron en el microscopio Zeiss Photo Microscope Axiophot. Pedazos pequeños de SDA con el hongo se examinaron bajo el microscopio electrónico de barrido (S.E.M.), usando técnicas estándar (Beckett y Read 1986) con pequeñas modificaciones, en el International Mycological Institute (IMI, Egham, U. K.). La cámara de criopreparación fue enfriada a -190°C y el SEM a -160°C empleando nitrógeno líquido. El espécimen fue montado y sumergido en nitrógeno. Cuando las burbujas cesaron, el espécimen se puso en el criostato, luego se cubrió con oro y se examinó a 8.6 y 12 KV, usando una distancia de trabajo de 8 mm. Para el microscopio electrónico de transmisión (TEM), pedazos de 3-5 mm de SDA se trataron y fijaron con una solución acuosa de permanganato de potasio al 1.5% (p/v);

<sup>1</sup> E-mail: fcario@cafedecolombia.com

<sup>2</sup> E-mail: fcabus@cafedecolombia.com



**Figura 1.** Clamidosporas de *Beauveria bassiana* formadas en SDA (a) y arroz (b) suplementados con oxiclورو de cobre (X 100).

glutaraldehído al 15% (v/v); acroleína al 2% (v/v) en buffer cacodilato de sodio 0.005 M, durante 25 minutos a 3°C, posteriormente con tetraóxido de osmio al 2% en 0.005 M cacodilato de sodio durante 50 minutos a 3°C. El material así fijado se lavó con 0.005 M de cacodilato de sodio, deshidratado en una serie creciente de alcohol (25 - 100%) (Griffiths 1973a) y embebido en resina spurr de baja viscosidad (Spurr 1969); luego se seccionó en un Ultramicrotomo Porter Blum 6000 con una cuchilla de diamante obteniéndose cortes de aproximadamente 600 nm de espesor. Las secciones se colectaron en rejillas de cobre (un mesh de diámetro y se tiñeron con

acetato de uranilo (2%) por cinco minutos (Mayor *et al.* 1961). Las secciones se examinaron por medio de un microscopio electrónico Jeol 100 SX.

## Resultados y Discusión

Todos los aislamientos presentaron gran número de clamidosporas intercalares. Las clamidosporas tienen un tamaño desde 12μ hasta 18μ (Fig. 2) y una pared gruesa y rugosa en comparación con el micelio. La condensación citoplásmica es una característica importante de la formación de clamidosporas, así como el engrosamiento de la

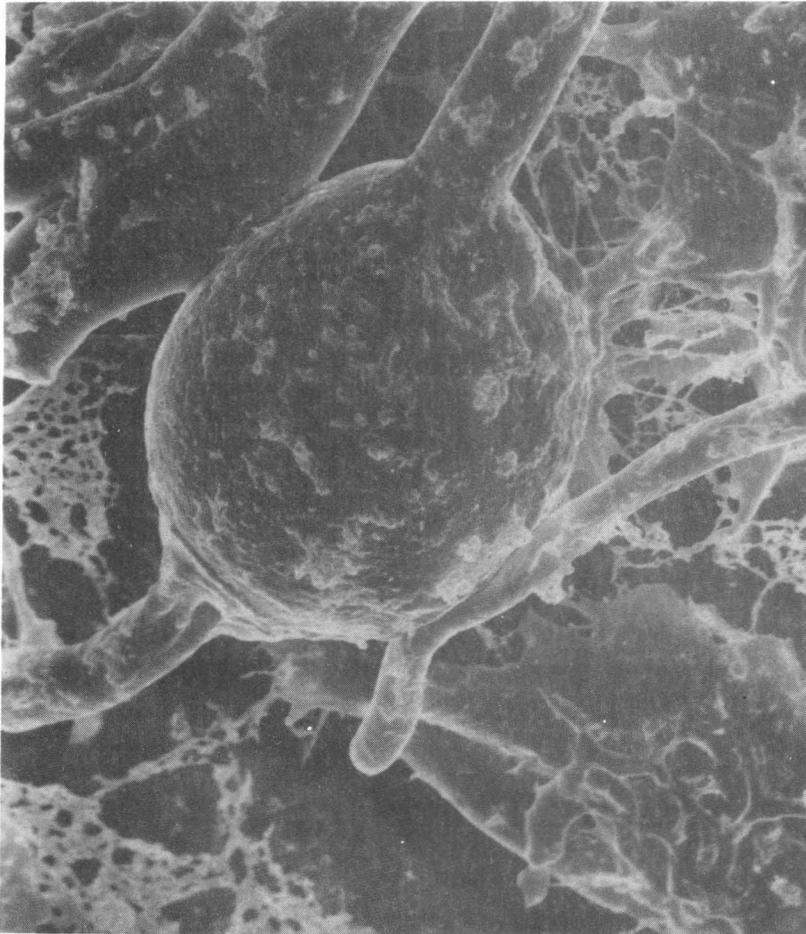
pared celular. También se observan grandes cuerpos lipídicos que varían de tamaño y número (Fig. 3).

A pesar de su pared gruesa, con la metodología utilizada, las clamidosporas de *B. bassiana* se pudieron fijar fácilmente para su observación al microscopio electrónico. La examinación de las micrografías revelan la presencia de muchos componentes típicos de células fúngicas vegetativas tales como: mitocondrias ubicuas, que varían en tamaño y densidad de cresta. Además, el citosol granular contiene una multiplicidad de ribosomas y retículo endoplásmico asociado a cuerpos lipídicos, lo que sugiere que, esta asociación podría estar implicada en la movilización de reservas de lípidos para componentes estructurales durante la síntesis *de novo* de nuevas membranas o componentes celulares y para la sobrevivencia de la espora en dormancia.

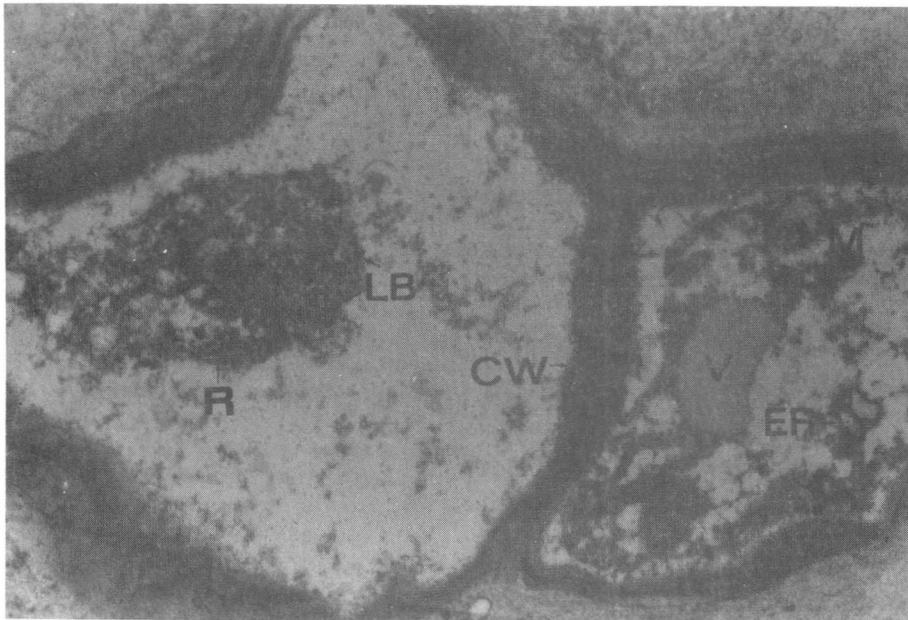
Tal vez la estructura más sobresaliente de las clamidosporas de *B. bassiana* es la naturaleza de sus paredes. Alguna controversia ha surgido con el número de capas que constituyen la pared de la clamidospora. En este trabajo se registra una pared con tres capas, compuesta de una cubierta exterior sobre dos capas relativamente gruesas depositadas entre aquella y la membrana plasmática. Algunos autores han propuesto que las capas gruesas internas son en realidad una sola capa. Griffiths (1973b) sugirió que esta capa es frecuentemente mal interpretada como dos capas por su apariencia estriada o lamelar causada por la fijación, sin embargo, con base en la presente evidencia (Fig. 3), se consideran como capas separadas.

La formación de clamidosporas, inducida por el oxiclورو de cobre, puede ser debida al metabolismo impuesto por el ion cobre. Los resultados sugieren que un compuesto como el cobre en baja concentración, es capaz de inducir formación de clamidosporas en *B. bassiana*, sin embargo a concentraciones supra óptimas, el cobre es un potente inhibidor del crecimiento fúngico y es un componente clave de varios fungicidas. Por otro lado, el cobre es un micro nutriente esencial por su papel como metal activador de varias enzimas fúngicas, particularmente oxidasas (Garraway y Evans 1984; Majchrowicz y Poprawski 1993).

La inducción de clamidosporas en *B. bassiana* podría ser de interés en desarrollar formulaciones para aplicaciones al suelo como un agente biocontrolador contra la broca del café (Prior 1994) por su probable persistencia. Estudios bioquímicos y de patogenicidad deben llevarse a cabo con las clamidosporas de *B. bassiana* para entender su desarrollo y germinación en el suelo, ade-



**Figura 2.** Clamidospora de *B. bassiana* formadas en SDA suplementado con oxiclورو de cobre (10 KV).



**Figura 3.** Clamidospora de *B. bassiana* mostrando la pared celular trilamellar (CW) y constituyentes protoplasmáticos como retículo endoplásmico (ER), mitocondria (M), ribosomas (R), cuerpos lipídicos (LB) y vacuola (V). (10 K).

más, este evento podría explicar la persistencia del hongo en el ambiente en ausencia de insectos.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. P. S. Baker por sus útiles e invaluable comentarios, a S. Rivas (Cenicafé-Colombia) por su asistencia al embeber las muestras y a G. Godwin (IMI-UK) por las fotografías en el microscopio electrónico.

### Bibliografía

- BAKER, P. S. 1984. Some aspects of the behavior of the coffee berry borer in relation to its control in southern Mexico (Coleoptera: Scolytidae). *Folia Entomológica Mexicana* 61 : 9-24.
- BAKER, P. S.; LEY C.; BALBUENA R.; BARRERA J.F. 1992. Factors affecting the emergence of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) from coffee berries. *Bulletin of Entomological Research* 82 : 145-150.
- BECKETT, A.; READ, N. D. 1986. Low-temperature scanning electron microscopy, pp. 45-85 in Aldrich H. C. & Todd W.J. (eds.), *Ultrastructure techniques for microorganism*. New York, Plenum Publishing Corporation.
- BUSTILLO, A. E. 1991. Uso potencial del entomopatógeno *Beauveria bassiana* en el control de la broca del café. *SOCOLEN Medellín (Colombia). Miscelánea* (18) : 91-105
- CARRION, G.; RUIZ, B. F.; ALARCON, M.R. 1990. Efecto del triadimefon y del oxiclورو de cobre en el crecimiento in vitro de *Verticillium lecanii*. *Revista Mexicana de Micología* 6 : 85-90.
- COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE. 1979. *CFI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. set 61* (602).
- DE HOOG, G.S. 1972. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. *Studies in Mycology* 1 : 1-41.
- GARRAWAY, M. O.; EVANS, R. C. 1984. *Fungal nutrition and physiology*. John Wiley and Sons, New York.
- GRIFFITHS D. A. 1973a. Fine structure of the chlamydospore wall in *Fusarium oxysporum*. *Transactions of the British Mycological Society* 61 : 1-6.
- GRIFFITHS D. A. 1973b. Fine structure of the chlamydospore germination in *Fusarium oxysporum*. *Transactions of the British Mycological Society* 61 : 7-12.
- LANGERON, M.; VAN BREUSEGHEM. 1965. *Outline of mycology* (Trans. by J. Wilkinson). Sir Isaac Pitman and Sons, Ltd., London.
- Mac LEOD, D. M. 1954. Investigations on the genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium* Limber. *Canadian Journal of Botany* 32 : 818-890.

- MAJCHROWICZ, I.; POPRAWSKI, T. J. 1993. Effects *in vitro* of nine fungicides on growth of entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology* 3 : 321-326.
- MAYOR, H. D.; HAMPTON, J. C.; ROSARIO, B. 1961. A simple method for removing the resin from epoxy-embedded material. *Journal of Cell Biology* 9 : 909.
- PRIOR, C. 1994. Reporte sin publicar
- QURESHI, A. A.; PAGE, O. T. 1970. Observations on chlamydospore production by *Fusarium* in a two-salt solution. *Canadian Journal of Microbiology* 16 : 29-32.
- RIVERA, M. A. 1993. Estudio de compatibilidad del hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin con formulaciones comerciales de fungicidas e insecticidas. *Revista Colombiana de Entomología* 19 : 151-158.
- SPURR, A. R. 1969. A low viscosity epoxy-resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* 26 : 31-43.