

EFECTO DE LA LUZ ULTRAVIOLETA SOBRE *Beauveria bassiana* Y SU VIRULENCIA A LA BROCA

Sandra Patricia Valdés-Gutiérrez*; Luz María Escobar-López*; Luz América Córdoba-Castro*;
Carmenza Esther Góngora-Botero**

RESUMEN

VALDÉS G., S.P.; ESCOBAR L., L.M.; CÓRDOBA C., L.A.; GÓNGORA B., C.E. Efecto de la luz ultravioleta sobre *Beauveria bassiana* y su virulencia a la broca. Revista Cenicafé 62(2): 58-68. 2011

Beauveria bassiana presenta un gran potencial como controlador biológico de la broca del café, sin embargo, la eficacia de este microorganismo depende de su persistencia en el campo, la cual se ve afectada por la radiación solar. En estudios en el laboratorio y en el campo se ha observado mayor mortalidad del insecto con una mezcla de cepas que individualmente se consideran de baja virulencia, mezcla Cenicafé (Bb9001, Bb9024 y Bb9119), comparada con la cepa Bb9205 de alta virulencia. Con el fin de determinar si estos resultados están correlacionados con el grado de resistencia de las cepas a luz UV, se realizó una evaluación de resistencia a luz UV de tres cepas de *B. bassiana*, ARSEF (Bb718, Bb1053 y Bb2997), cada una de las cepas que conforman la mezcla (Bb9001, Bb9024 y Bb9119), la mezcla de éstas y la cepa Bb9205. Todas fueron sometidas a luz UV-B, UV-A y luz visible, por 15 min., bajo dosis de irradiancia de 4,38W/m², para la luz UV-B (longitud principal 312 nm) y de 0,009 W.m² para la luz UV-A (longitud principal 365 nm). La luz visible fue suministrada por una lámpara de luz blanca (longitud de onda de >400nm.), encontrándose un mayor porcentaje de resistencia a luz UV en las cepas Bb9205 y Bb9119, en comparación con la mezcla Cenicafé. La eficacia de la mezcla Cenicafé sobre la broca del café en el campo se debe a la expresión de factores relacionados con virulencia en estos hongos combinada con una mediana resistencia a condiciones ambientales.

Palabras clave: Irradiación, Luz UV-A, Luz UV-B, mezcla Cenicafé.

ABSTRACT

Beauveria bassiana has great potential as biological controller of coffee berry borer. However, the effectiveness of this microorganism depends on its field persistence, which is affected by solar radiation. In laboratory and field studies the insect exhibited higher mortality with a mixture of strains that are individually considered to have low virulence, Cenicafé (Bb9001, Bb9024 and Bb9119) mixture, compared with the highly virulent strain Bb9205. In order to determine whether these results correlate with the resistance degree of the strains to UV light, a resistance evaluation was performed to UV light of three strains of *B. bassiana* ARSEF (Bb718, Bb1053 and Bb2997), each of the strains that comprise the mixture (Bb9001, Bb9024 and Bb9119), the mixture thereof and the Bb9205 strain. All were subjected to UV-B, UV-A and visible light for 15 min., under low doses of irradiance of 4.38 W/m² for the UV-B light (main length 312 nm) and of 0.009 Wm² for the UV-A (main length 365 nm) light. A white light lamp (wavelength > 400nm) provided the visible light, and a higher UV resistance percentage was found in strains Bb9205 and Bb9119 compared with Cenicafé mixture. The effectiveness of Cenicafé mixture over the coffee berry borer in the field is due to the expression of virulence factors associated with these fungi combined with medium resistance to environmental conditions.

Keywords: Radiation, UV-A light, UV-B light, Cenicafé mixture.

* Investigadores Asociados. Entomología.

** Investigador Científico III. Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia.

El hongo *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, ha sido registrado como entomopatógeno de diversas especies de insectos, entre ellas, la broca del café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae), la principal plaga del café en Colombia (3).

El hongo hace parte de la estrategia de Manejo Integrado de la Broca, propuesta por Cenicafé (7), ya que además de ser un controlador natural de ésta, se encuentra infectando naturalmente el insecto en casi todas las regiones de Colombia. Experimentos llevados a cabo en Cenicafé, han demostrado que el control de la broca en el campo es posible empleando la mezcla Cenicafé, conformada por tres cepas (Bb9001, Bb9024, Bb9119), a dosis desde 1×10^9 esporas/árbol, las cuales pueden causar hasta 67% de mortalidad en los insectos (8).

La mezcla Cenicafé está constituida por cepas que individualmente presentan una baja virulencia, y además difieren genéticamente entre sí, pero que al combinarse, presentan una interacción de sinergia (10), incrementando sus mecanismos de infección e invasión, de tal manera que complementan y reducen la competencia que puede darse entre ellas y superan las defensas del insecto. Vera *et al.* (26) demostraron que la aplicación de esta mezcla a una concentración de 2×10^{10} esporas/L, con una dosis de 50 mL por plato del árbol, sobre frutos infestados dejados en el suelo, disminuye entre 30% y 50% la infestación de brocas en el árbol comparado con el testigo, y causa mortalidades de los adultos al interior de los frutos cercanas al 40%. El efecto real de las aplicaciones del hongo al suelo sobre la infestación en los árboles de café se evaluó en el campo, en la Estación Experimental Paraguaicito (Quindío), donde el hongo causó una disminución de 35% en el número de individuos de la siguiente generación, mientras que en la Estación

Central Naranjal (Caldas) la disminución fue de 84%, con el mayor efecto de la mezcla Cenicafé en ambas localidades, en comparación con otras cepas de *B. bassiana*.

Sin embargo, el desarrollo de *B. bassiana* como micoinsecticida ha sido limitado, debido en gran parte a su alto costo de producción, en comparación con el costo de los plaguicidas químicos, y a que la eficiencia de dicho entomopatógeno depende de su viabilidad y virulencia después de la aplicación en el campo, siendo la radiación solar, particularmente las longitudes de ondas UV-A y UV-B, la principal causa de una baja efectividad del hongo (2, 5, 12). Previamente, en Cenicafé se habían realizado trabajos de selección de cepas por resistencia a Luz UV, evaluando en el campo (23) un aislamiento de *B. bassiana* seleccionado por resistencia a Luz UV en el laboratorio (24), no obstante, éste causó bajas mortalidades sobre la broca del café.

El efecto de la luz UV se debe a que estas longitudes de onda corta retardan o suprimen la germinación de las esporas de los entomopatógenos, debido a daños directos o indirectos en el ADN. El daño directo, resulta de la formación de fotoproductos tales como dímeros de pirimidinas, hidratos de pirimidina y entrecruzamientos entre ADN y proteínas. El daño indirecto se debe principalmente a la aparición de moléculas de oxígeno reactivo (peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete y radicales hidroxilos), que oxidan la pentosa presente en el ADN y rompen la hebra de la molécula (11). Ambos tipos de daño interfieren en la replicación normal del ADN, y finalmente producen mutaciones o la muerte de la célula, dependiendo de la cantidad de energía recibida (9).

En algunos Hyphomycetes, la resistencia a la irradiación está dada por un complejo

de genes y es determinado por diferentes factores. Algunos de estos factores son bien conocidos y conservados (16), entre éstos se encuentran: 1. Pigmentos localizados sobre la superficie celular, los cuales permiten bloquear la radiación, tales como melanina y carotenoides estudiados en diferentes especies de hongos (4, 6, 17, 18); 2. Enzimas detoxificantes que pueden inactivar sustancias tóxicas y mutagénicas tales como radicales libres (20); y 3. Enzimas y proteínas involucradas en la protección y reparación de ácidos nucleicos (15, 27). Algunos de estos factores actúan por prevención o reducción del daño a componentes intracelulares como es el caso de los pigmentos, mientras otros sistemas actúan sobre la reparación del daño causado por radiación (5).

Estudios realizados con el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* y su resistencia a la radiación de luz UV-A y UV-B, indican que la pigmentación verde es importante para la resistencia a luz UV (5), así mismo, en *Aspergillus*, *Ustilago* y *Cryptococcus* se ha demostrado una variabilidad en la resistencia a irradiación de luz UV de acuerdo a la pigmentación de las conidias (1, 28, 29), lo que implicaría la modificación de esta pigmentación en la generación de inóculo más resistente para su uso en el campo (5).

Otro factor responsable de la variabilidad en la resistencia a la irradiación de luz UV-B es el origen geográfico de los aislamientos. Aislamientos obtenidos en sitios de latitudes bajas tienden a ser más resistentes a la radiación de luz UV-B que aislamientos obtenidos en latitudes altas (5). En estudios realizados por Fernandes *et al.* (13) con aislamientos de *Beauveria* spp., se encontró una alta variabilidad entre diferentes aislamientos, con respecto a la resistencia a irradiación UV-B,

en un rango del 0% al 80% de resistencia, y una mayor resistencia en aquellos aislamientos obtenidos en latitudes bajas.

Cárdenas *et al.* (8), encontraron que cepas con baja virulencia sobre la broca del café, como la cepa Bb9024, a una concentración de 1×10^6 esporas/mL, causó mortalidades de 53% en condiciones de laboratorio y del 55% en el campo, mientras que la cepa de alta virulencia Bb9205 en el laboratorio causó mortalidades del 88% y en el campo del 59%, siendo mayor la diferencia en el laboratorio que las observadas en el campo, lo que permite determinar que las condiciones medioambientales tienen un efecto marcado en el desempeño y comportamiento de la cepa en el campo.

Con el propósito de determinar si la mezcla Cenicafé, que causa 100% de mortalidad en el laboratorio y 67% en el campo (8), mostraba alta mortalidad en el campo debido en parte, a una mayor resistencia a condiciones medioambientales, se diseñó el presente experimento que tuvo como objetivo evaluar la resistencia de estas cepas individuales y la mezcla, además de la cepa Bb9205, ampliamente usada para el control de la broca del café en Colombia, y las cepas ARSEF (*Agricultural Research Service Collection of Entomopathogenic Fungi*) localizadas en U.S. Plant, Soil, and Nutrition Laboratory. Cornell University. Ithaca USA, que han sido reportadas por presentar un alto porcentaje de supervivencia a irradiaciones con luz UV (12), en el laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de microorganismos de Entomología del Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé, en las instalaciones de Planalto, a una temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

Cepas de *B. bassiana* evaluadas. Para evaluar el efecto de la luz UV se seleccionaron siete aislamientos de *B. bassiana*, correspondientes a: tres cepas codificadas como ARSEF: Bb718, Bb1053 y Bb2997. Estas cepas hacen parte de la colección de hongos entomopatógenos, del servicio de investigación agrícola (ARS) localizada en Ithaca, Nueva York (USA). La literatura reporta que estas cepas presentan un alto porcentaje de supervivencia a irradiaciones con luz UV (11), y además, causan porcentajes de mortalidad (datos no reportados) sobre la broca del café del 68% (cepa Bb718) y del 95% (cepas Bb1053 y Bb2997) bajo condiciones de laboratorio. También se seleccionaron otros cuatro aislamientos provenientes de la colección de hongos entomopatógenos de Cenicafé correspondientes a la cepa Bb9205, reportada con alta virulencia en el laboratorio (8, 10), las cepas Bb9001, Bb9024 y Bb9119, reportadas individualmente con baja virulencia en el laboratorio (8, 10), y la mezcla de las cepas que individualmente son de baja virulencia identificada como mezcla Cenicafé con la cual se ha observado un 100% de mortalidad en el laboratorio y de 67% en el campo (8, 10, 26).

Las cepas estaban criopreservadas en la colección de hongos entomopatógenos de Cenicafé a -80°C en viales con LB y glicerol a 15% y fueron sembradas en cajas petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) e incubadas a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 15 a 20 días hasta esporulación.

Evaluación de inhibición de crecimiento de esporas de *B. bassiana* causado por ácido láctico. Con el fin de identificar las condiciones adecuadas para la evaluación de colonias resistentes a luz UV, se evaluaron diferentes concentraciones de ácido láctico, el cual se utiliza para el control de contaminantes. El propósito fue conocer cuál de estas

concentraciones no causaba muerte de las esporas y reducción en el número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC).

La cepa Bb9205.L1 se sembró en cajas de Petri de 90 x 15 mm, en medio de cultivo PDA, y se incubó a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 15 días, en oscuridad. Una vez esporulada se realizaron pruebas de germinación en las esporas (19). Con los cultivos con germinaciones de esporas superiores al 95%, se preparó una suspensión de esporas a una concentración de 3×10^3 esporas/mL, de esta dilución se sembraron 100 μL , esparciendo el inóculo sobre la caja con rastrillo bacteriológico, en medio PDA (control), y medio PDA más ácido láctico al 0,50%, 0,25%, 0,10% y 0,05%. Por cada tratamiento se sembraron cinco cajas de Petri. Todos los tratamientos se incubaron durante cinco días a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, período en el cual diariamente se registró el número de colonias crecidas sobre cada caja sembrada.

La variable de respuesta fue el número de unidades formadoras de colonia (UFC). Se estimaron los promedios de UFC y el error estándar por tratamiento, en las cinco repeticiones, tanto de los testigos como de los tratamientos. Se compararon los promedios de las UFC mediante un análisis de varianza.

Evaluación del efecto de luz UV, a diferentes tiempos, sobre la supervivencia de esporas de *B. bassiana*. Con el fin de conocer el tiempo de exposición a luz UV con el que se obtenía un 50% de supervivencia de esporas en la cepa Bb9205.L1, obtenidas de un cultivo en medio PDA, crecido bajo las condiciones anteriormente descritas, fueron resuspendidas en solución de agua y tween al 0,01%, y se llevaron a una concentración de 3×10^2 esporas/ml, y de esta concentración se sembraron 100 ml, esparciendo el inóculo

sobre la caja con rastrillo bacteriológico, en cajas de Petri con medio PDA no acidificado, con el fin de obtener 30 UFC.

Las cajas de Petri conteniendo las esporas fueron expuestas a luz UV-B, luz UV-A y luz visible durante: 0, 10, 15 y 20 minutos. Por cada tiempo se expusieron diez cajas correspondientes a diez repeticiones por tratamiento.

Los cuatro tratamientos evaluados fueron:

1. Irradiación de diez cajas con esporas, durante 10 min. con cada uno de los tres tipos de luz
2. Irradiación de diez cajas con esporas durante 15 min. con cada uno de los tres tipos de luz
3. Irradiación de diez cajas con esporas durante 20 min. con cada uno de los tres tipos de luz
4. Diez cajas con esporas no irradiadas

Como fuente de luz ultravioleta se utilizó la lámpara spectroline modelo XX-15NB (*Spectronics Corporation*), con una irradiancia de $4,38 \text{ W.m}^{-2}$ para la luz UV-B (longitud principal 312 nm) y de $0,009 \text{ W.m}^{-2}$ para la luz UV-A (longitud principal 365 nm). La luz visible fue suministrada por una lámpara de luz blanca, con una longitud de onda mayor a 400 nm. Las mediciones se hicieron con el espectrómetro USB2000, usando la ecuación de Quate *et al.* (21). Posteriormente, se incubaron los cultivos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 8 días.

La variable de respuesta fue el número de unidades formadoras de colonia (UFC) en cada caja Petri, y se realizó una estimación de promedios de UFC y error estándar por tratamiento, en las diez repeticiones, tanto de los testigos como de los tratamientos en cada réplica biológica. Se compararon los

promedios de las UFC en las tres réplicas biológicas, tanto en los testigos como en los tratamientos, mediante un análisis de varianza.

Evaluación del efecto de luz UV, luego de 15 min. sobre la supervivencia de esporas de *B. bassiana*. Una vez se determinó el tiempo de exposición a Luz UV con el que se obtenía un 50% de supervivencia de esporas en la cepa Bb9205.L1, se realizaron diluciones de esporas a una concentración de 3×10^2 esporas/mL, de las cepas: ARSEF Bb718, ARSEF Bb1053, ARSEF Bb2997, Bb9205, Bb9001, Bb9024, Bb9119 y la mezcla Cenicafé. Para el caso de la mezcla se tomaron 3,3 mL de cada una de las diluciones de las cepas Bb9001, Bb9024, Bb9119 a 3×10^2 esporas/mL, homogeneizando la mezcla en un mismo tubo.

De estas diluciones se sembraron 100 μL en medio PDA y por cada cepa se hicieron 20 cultivos. De cada cepa se incubaron diez cultivos, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (testigos), y los otros diez cultivos de cada cepa se irradiaron consecutivamente con los tres tipos de luz, por un período de 15 min. para cada tipo de luz, en el siguiente orden: Luz UV-B, luz UV-A y luz visible, con una dosis final de $3,94 \text{ kJ.m}^{-2}$ para luz UV-B (longitud principal 312 nm), de $0,008 \text{ kJ.m}^{-2}$ para luz UV-A (longitud principal 365 nm) y para la luz blanca longitud de onda mayor a 400 nm. Finalmente, todos los cultivos se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 5 días, y diariamente se registró el número de UFC. El experimento se repitió tres veces.

La variable de respuesta fue el número de unidades formadoras de colonia (UFC) en cada caja Petri. Para el análisis estadístico se estimó el promedio de UFC y el error estándar por tratamiento, en las diez repeticiones, tanto de los testigos como de los tratamientos en cada réplica biológica. Se compararon los

promedios de las UFC en las tres réplicas biológicas, tanto en los testigos como en los tratamientos mediante un análisis de varianza. Se determinó el radio de supervivencia de cada cepa en cada réplica biológica, determinando que a mayor radio mayor porcentaje de supervivencia. El radio (R) se definió como: $R = \text{Promedio de UFC germinadas en la cepa irradiada} / \text{Promedio de UFC en el testigo no irradiado}$. Finalmente, se obtuvo el promedio de la media de los radios de las tres réplicas por cepa, y se establecieron diferencias entre éstas a través de pruebas de rangos múltiples de Duncan, a un nivel de significancia del 5%, mediante el programa S.A.S.

Los resultados de radios de sobrevivencia de esporas de las diferentes cepas fueron correlacionados con pruebas de virulencia de estas mismas cepas, en el laboratorio y en el campo, previamente reportados por Cárdenas *et al.* (8).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de inhibición de crecimiento de esporas de *B. bassiana* causado por ácido láctico. La cepa Bb9205 cultivada en medio PDA sin ácido láctico mostró alrededor de 30 UFC, sin embargo, en las cajas que contenían PDA y ácido láctico se observó mortalidad de las esporas, reflejada en una disminución del número de UFC (datos no mostrados). El menor porcentaje de supervivencia se obtuvo con la concentración de 0,50% donde se encontró una supervivencia de 6,5%, mientras

que el control (sin ácido láctico) presentó una supervivencia de 98,4%. De acuerdo con estos resultados se tomó la decisión de realizar la evaluación de irradiación con luz UV sin la aplicación de ácido láctico, en condiciones de asepsia, para evitar la presencia de contaminantes.

Evaluación del efecto de luz UV, a diferentes tiempos, sobre la supervivencia de esporas de *B. bassiana*. La Tabla 1 muestra, el número promedio de UFC de la cepa Bb9205.L1, después de irradiar las esporas por 10, 15 y 20 min., con luz UV-B, luz UV-A y luz visible. El objetivo de esta prueba fue determinar el tiempo de exposición con el que se obtenía una supervivencia de la población de esporas del hongo cercana al 50%, la cual se obtuvo luego de 15 min. de exposición con los tres tipos de luz (54,3%). Por lo tanto, se escogió este intervalo de tiempo para la evaluación de la resistencia a luz UV del resto de las cepas.

Evaluación del efecto de la luz UV, luego de 15 min., sobre la supervivencia de esporas de *B. bassiana*. Los promedios de UFC que representa el número de esporas germinadas de las distintas cepas, después de someterlas durante 15 min. a la irradiación con luz UV-B, UV-A y luz visible se muestran en la Tabla 2. Se observa variación en la respuesta a la radiación entre las diferentes cepas evaluadas, evidenciándose que existen cepas con mayor resistencia.

Tabla 1. Promedio de UFC de *B. bassiana* cepa Bb9205.L1 crecidas en medio PDA, luego de irradiar las esporas con luz UV-B, luz UV-A y luz visible, en diferentes intervalos de tiempo.

Tratamiento	Promedio UFC	D.E	Supervivencia (%)
Testigo (sin irradiación)	41,0	2,50	100
10 minutos de irradiación	25,8	5,24	62,9
15 minutos de irradiación	22,3	5,29	54,3
20 minutos de irradiación	14,4	4,15	35,1

Tabla 2. Promedios y desviación estandar (E.E.) de UFC por réplica de cada cepa irradiada, por 15 min., con luz UV-B, UV-A y luz visible y UFC de cepas sin irradiar.

Réplicas	Cepa	Irradiadas		Sin irradiar	
		Promedio	D.E.	Promedio	D.E.
1	ARSEF 1053	6,0	4,55	29,4	5,19
1	ARSEF 2997	4,4	3,17	29,4	3,03
1	ARSEF 718	10,7	4,32	25,9	3,73
1	Bb9001	12,2	2,82	29,8	2,86
1	Bb9024	12,6	2,91	23,1	3,03
1	Bb9119	19,0	1,05	37,3	2,75
1	Mezcla	13,2	2,66	31,2	2,62
1	Bb9205	13,9	2,81	24,8	1,64
2	ARSEF 1053	9,1	1,20	25,2	3,56
2	ARSEF 2997	8,8	0,79	36,6	1,52
2	ARSEF 718	19,0	3,97	40,4	0,55
2	Bb9001	13,3	1,89	28,8	1,30
2	Bb9024	10,3	1,06	23,0	2,00
2	Bb9119	17,5	2,95	32,8	1,48
2	Mezcla	13,5	2,80	30,6	0,55
2	Bb9205	16,9	3,54	28,4	2,79
3	ARSEF 1053	10,3	3,53	26,2	2,17
3	ARSEF 2997	8,8	0,79	32,6	1,14
3	ARSEF 718	15,8	2,97	38,8	2,77
3	Bb9001	10,2	0,63	23,4	2,61
3	Bb9024	11,7	3,62	24,0	1,22
3	Bb9119	13,6	2,59	24,6	1,52
3	Mezcla	11,1	3,75	25,4	2,61
3	Bb9205	13,4	3,57	25,4	4,04

La literatura reporta gran variación de los entomopatógenos a la luz UV. Aún cuando existen aislamientos muy sensibles a dosis altas de radiación, las cuales provocan la mortalidad total de las esporas, todos los aislamientos responden de manera distinta a este efecto. Lo anterior ha permitido clasificarlos en tres grupos: de alta resistencia, resistencia intermedia y sensibles. Una mayor resistencia a la radiación ultravioleta sería una ventaja comparativa para el hongo en el campo, debido a la mayor supervivencia que mostraría y a la mayor eficacia de su acción sobre el insecto al cual iría dirigido el control (25).

Evaluación del efecto de Luz UV, luego de 15 min., sobre la supervivencia de esporas de *B. bassiana*. Las cuantificaciones de los radios de supervivencia de esporas para cada cepa, luego de 15 min. de irradiación con cada tipo de luz (Tabla 3), permitieron diferenciar cuatro grupos de cepas, que difieren estadísticamente entre sí, con respecto a su resistencia a la luz UV.

El primer grupo está conformado por la cepa ARSEF2997, éste presenta el menor número de esporas germinadas y puede considerarse altamente sensible a la radiación UV. Sigue el grupo conformado por la cepa

Tabla 3. Efecto de la radiación de luz UV sobre la supervivencia de cepas de *B. bassiana* y virulencia de éstas en la broca del café.

Cepa	Supervivencia (R) de esporas sometidas a luz UV	Mortalidad (%) de <i>H. hampei</i> en el campo*	Mortalidad (%) de <i>H. hampei</i> en el laboratorio*
ARSEF2997	0,22 A		95,00
ARSEF1053	0,32 B		95,00
ARSEF 718	0,43 C		68,00
Mezcla	0,43 C	66,63	100
Bb9001	0,44 C	54,13	76,67
Bb9024	0,49 CD	55,10	53,33
Bb9119	0,53 D	58,28	73,33
Bb9205	0,56 D	59,60	88,33

-(R) Radio de supervivencia= Promedio de UFC germinadas en la cepa irradiada/ Promedio de UFC germinadas en el testigo no irradiado. (Promedio de tres réplicas). Duncan Alfa:=0,05. Error: 0,0023, gl: 20. Letras no comunes indican diferencias estadísticas significativas. * Datos Cárdenas et al (8). Concentración de esporas 1×10^6 esporas/mL.

ARSEF1053; estas dos cepas ocasionan altos porcentajes de mortalidad (95%) sobre la broca en el laboratorio, sin embargo, con la baja resistencia a la irradiación de luz-UV, es posible inferir que estas cepas no tendrían un buen comportamiento en el campo; no obstante, es necesario evaluarlas en el campo para corroborar los datos obtenidos en este estudio.

Existe un tercer grupo, de resistencia intermedia, en el que se encuentran las cepas ARSEF718, la mezcla Cenicafé, las cepas Bb9001 y la cepa Bb9024. De este grupo se destaca la mezcla Cenicafé, y aunque su porcentaje de resistencia a la luz UV no es el mayor, sí ocasiona, como lo demostraron Cárdenas *et al.* (8), los más altos porcentajes de mortalidad en la broca del café, tanto en el campo (67%) como en el laboratorio 100%. Estos resultados demuestran el alto potencial que tiene esta mezcla para el control del insecto, ya que en el campo, la luz UV causa mortalidad sobre algunas de las esporas del hongo que se asperjan, lo que implica que un menor número de esporas del total aplicado permanecen vivas, sin embargo, aun con un número menor de

esporas se obtuvieron altas mortalidades de la broca. Al comparar esta mezcla con la cepa Bb9295, que mostró mayor resistencia a la luz UV, la cepa Bb9205 al ser asperjada en el campo mantendría más esporas viables que la mezcla, sin embargo ocasiona menores mortalidades (59%) sobre la broca del café, a las obtenidas con la mezcla. De igual forma, queda demostrado que la virulencia de la mezcla Cenicafé está dada por factores intrínsecos, como puede ser el tipo de genes que las tres cepas que conforman la mezcla, expresan en los procesos de infección de la broca, o sus niveles de expresión o las interacciones que se presentan entre ellos, y no por una mayor persistencia o resistencia a condiciones ambientales.

El cuarto grupo está conformado por las cepas Bb9119 y Bb9205, que mostraron la mayor resistencia a la luz UV. Lo que les puede conferir una mayor persistencia y mayor tiempo de acción sobre la broca del café, de aquí su relativo desempeño en el campo.

Aunque se ha mencionado que uno de los factores más importantes que confieren resistencia a la irradiación de luz UV es

la pigmentación de las conidias, Fargues *et al.* (12), al realizar un estudio sobre variabilidad en la resistencia de hongos hyphomycetes a la luz UV, encontraron a *Metarhizium flavoviride*, uno de los hongos con conidias pigmentadas, como aquel que presentó la mayor resistencia a irradiación solar, sin embargo, conidias de *B. bassiana*, las cuales no son pigmentadas, fueron más resistentes a la irradiación que aislamientos de *M. anisopliae* y *Paecilomyces fumosoroseus*, los cuales son altamente pigmentados, resultados que sugieren que en algunas especies, la pigmentación puede no ser importante en la protección de las conidias contra los efectos detrimentales de la irradiación.

Si se tiene en cuenta que uno de los mayores obstáculos para el uso de hyphomycetes como bioinsecticidas es la alta susceptibilidad de estos hongos a la radiación de luz UV, la cual causa una drástica reducción en la viabilidad del inóculo después de un corto período de exposición directa (14, 22, 25), y que dicha reducción incrementa los costos de producción, debido a la necesidad de realizar frecuentes aplicaciones, se puede identificar la mezcla Cenicafé como un promisorio controlador biológico, no solo por su alto porcentaje de virulencia sino por su resistencia a irradiación de luz UV, que muestra todavía un potencial de mejora.

Con este experimento se demuestra que la acción de un entomopatógeno en condiciones de campo, va a depender de la interacción entre el entomopatógeno, el insecto y el medio ambiente, y el mejoramiento de la eficacia consiste en la selección de cepas, las cuales deben ser altamente virulentas y el tipo de formulación que permita realmente incrementar la persistencia del

organismo sin desmejorar su virulencia. Finalmente, el éxito del biocontrolador dependerá de una adecuada combinación de estos dos factores.

Puede concluirse que se logró comprender el comportamiento de la mezcla Cenicafé, la cual muestra una resistencia intermedia a la luz UV, que no interfiere con los altos porcentajes de mortalidad que causa sobre la broca en el campo. El efecto sobre la broca se debe a la expresión de factores relacionados con virulencia y no a una mayor persistencia en el campo, lo cual sugiere el alto potencial de la mezcla, ya que en el campo un menor número de esporas (al compararla con cepas que han mostrado mayor resistencia a la luz UV) estaría ocasionando las mayores mortalidades del insecto, abriendo la posibilidad de mejorar aún más el efecto de este hongo sobre la broca del café, con una adecuada formulación de esta mezcla que incremente la resistencia a la luz UV y persistencia en el campo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido cofinanciado por el Convenio de Cooperación Técnica y Científica celebrado entre el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia.

LITERATURA CITADA

1. AL R., K.; SEIFERT, A.M. Polysaccharide and protein degradation, germination and virulence against mosquitoes in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Journal of invertebrate pathology 36:29-34. 1980.
2. ALVES, R.T.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C.; LEATHER, S.R. Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. Crop protection 17:675-679. 1998.

3. BENAVIDES, P.; GÓNGORA, C.; BUSTILLO, A.E. IPM program to control coffee berry borer *Hypothenemus hampei*, with emphasis on highly pathogenic mixed strains of *Beauveria bassiana*, to overcome insecticide resistance in Colombia. p. 511-540. [En línea]. Manhattan : InTech, 2012. Disponible en internet: <http://www.intechopen.com/books/show/title/insecticides-advances-in-integrated-pest-management>. Consultado el 6 de Diciembre de 2012
4. BARTLEY, G.E.; SCHMIDHAUSER, T.J.; YANOFSKY, C.; SCOLNIK, P.A. Carotenoid desaturases from *Rhodobacter capsulatus* and *Neurospora crassa* are structurally and functionally conserved and contain domains homologous to flavoprotein disulfite oxidoreductases. *Journal of biological chemical* 265:16020-16024. 1990.
5. BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; RANGEL, D.E.N.; MILLER, C.D.; FREIMOSER, F.; ST LEGER, R.J.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Damage to fungi from solar/UV exposure and genetic and molecular-biology approaches to mitigation. p. 241-245. En: *Proceedings of the International colloquium on insect pathology and microbial control*. Brasil : Embrapa, 2002. 312 p.
6. BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MESSIAS, C.L.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Effects of UV-B irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: A study of reciprocity and recovery. *Journal of photochemistry and photobiology* 73(2):140-146. 2001.
7. BUSTILLO, A.; CÁRDENAS, R.; VILLALBA, D.; BENAVIDES, P.; OROZCO, J.; POSADA. Manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. *Chinchiná : CENICAFÉ*, 1998. 134 p.
8. CÁRDENAS, R.A.; VILLALBA, G.D.; BUSTILLO, A.; MONTAÑA, E.; GÓNGORA, C. Eficacia de las mezclas de cepas del hongo *Beauveria bassiana* en el control de la broca del café. *Cenicafé* 58(4):293-303. 2007.
9. CERDA O., E.; ROJAS, M.; CUBERO, B. Causes of cell death following ultraviolet B and C exposures and the role of carotenes. *Journal of photochemistry and photobiology* 64:547-551. 1996.
10. CRUZ, L.P.; GAITÁN, A.L.; GÓNGORA, C. Exploiting the genetic diversity of *Beauveria bassiana* for improving the biological control of the coffee berry borer through the use of strain mixtures. *Applied microbiology and biotechnology* 71(6):918-926. 2006.
11. DIFFEY, B.L. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Physics in medicine and biology* 36:299-328. 1991.
12. FARGUES, J.; GOETTEL, M.S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; VIDAL, C.; LACEY, L.A.; LOMER, C.J.; ROUGIER, M. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. *Mycopathologia* 135(3):171-181. 1996.
13. FERNANDES, E.K.K.; RANGEL, D.E.N.; BITTENCOURT, V.E.P.; MORAES, A.M.L.; ROBERTS, D.W. Variations in UV-B-irradiation tolerance for *Beauveria* spp. isolates from different latitudes, hosts and substrates. *Journal of invertebrate pathology* 96(3):237-243. 2007.
14. GARDNER, W.A.; SUTTON, R.M.; NOBLET, R. Persistence of *Beauveria bassiana*, *Nomuraea rileyi*, and *Nosema necatrix* on soybean foliage. *Environmental entomology* 6:616-618. 1977.
15. GOLDMAN, G.H.; KAUFER, E. *Aspergillus nidulans* as a model system to characterize the DNA damage response in eukaryotes. *Fungal genetic biology* 41:428-442. 2004.
16. GRIFFITHS, H.R.; MISTRY, P.; HERBERT, K.E.; LUNEC, J. Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. *Critical reviews clinical laboratory sciences* 35:189-237. 1998.
17. IGNOFFO, C.M. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. *Florida entomologist* 75(4):516-525. 1992.
18. LANGFELDER, K.M.; STREIBEL, M.; JAHN, B.; HAASE, G.; BRAKHAGE, A.A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal genetic biology* 38:143-158. 2003.
19. MARÍN, P.; BUSTILLO, A.E. Pruebas microbiológicas y físico químicas para el control de calidad de hongos entomopatógenos: Curso internacional teórico práctico sobre entomopatógenos, parasitoides y otros enemigos de la broca del café. *Chinchiná : CENICAFÉ*, 2002. 207 p.
20. MILLER, C.D.; RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; KWON, S.I.; MESSIAS, C.L.; ROBERTS, D.W.; ANDERSON, A.J. Enzyme

- activities associated with oxidative stress in *Metarhizium anisopliae* during germination, mycelia growth, and conidiation and in response to near-UV irradiation. Canadian journal of microbiology 50:41-49. 2004.
21. QUAITE, F.E.; SUTHERLAND, B.M.; SUTHERLAND, J.C. Action spectrum for DNA damage in alfalfa lowers predicted impact of ozone depletion. Nature 358:576-578. 1992.
 22. ROBERTS, D.W.; CAMPBELL, A.A. Stability of entomopathogenic fungi. p. 19-76. En: HOSTETTER, D.L.; IGNOFFO, C.M. Environmental stability of microbial insecticides. Maryland : Entomological society of America, 1977. 119 p.
 23. TOBAR, S.P.; VÉLEZ, P.E.; MONTOYA, E. Evaluación en campo de un aislamiento de *Beauveria bassiana* seleccionado por resistencia a luz ultravioleta. Cenicafé 50(3):195-204. 1999.
 24. TOBAR, S.P.; VÉLEZ, P.E.; MONTOYA, E. Selección en laboratorio de aislamiento de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* por resistencia a la luz ultravioleta. Cenicafé 50(4):327-337. 1999.
 25. VARELA, A.; MORALES, E. Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence towards the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. Journal of invertebrate pathology 67:147-152. 1996.
 26. VERA, J.T.; MONTOYA, E.; BENAVIDES, P.; GÓNGORA, C. Evaluation of *Beauveria bassiana* Ascomycota : Hypocreales as a control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* Coleoptera : Curculionidae : Scolytinae emerging from fallen, infested coffee berries on the ground. Biocontrol science and technology 21(1):1-14. 2011.
 27. VERMA, N.C.; SINGH, R.K. Stress-inducible DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. Environment pathology toxicology and oncology 20:1-7. 2001.
 28. WANG, Y.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. Apply environment microbiology 60:3864-3866. 1994.
 29. WILL III, O.H.; DIXON, D.; BIRNEY, A.; THOMAS, P.L. Effects of far UV and visible light on germination of wild type and albino teliospores of *Ustilago nuda*. Canadian journal of plant pathology 9:225-229. 1987.