

CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA Y PATOGENICIDAD DE AISLAMIENTOS DE *Beauveria bassiana* SOBRE LA BROCA DEL CAFÉ¹

Beatriz Elena Valdés-D*; Patricia Eugenia Vélez-Arango**; Esther Cecilia Montoya-Restrepo**

RESUMEN

VALDÉS D., B.E.; VÉLEZ A., P.E; MONTOYA R., E.C. Caracterización enzimática y patogenicidad de aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. Cenicafe 50(2): 106-118. 1999.

La infección que causa el hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin en la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) ocurre a través del integumento y es mediada por enzimas extracelulares del hongo que intervienen en la penetración e infección del hospedante. Con el fin de caracterizar aislamientos de *B. bassiana* desde el punto de vista enzimático, se estandarizó una metodología confiable y de fácil utilización en el laboratorio. Se modificó la técnica cualitativa descrita por Paterson y Bridge en 1994. La producción enzimática se evaluó también mediante el uso del sistema comercial API-ZYM, con el cual se establecieron dos tiempos de lectura. No se encontró relación directa entre la actividad enzimática y la patogenicidad a la broca del café. Bb 9205 y Bb 9027, mostraron porcentajes de patogenicidad del 90 y 97,5% respectivamente y la mejor actividad enzimática. Con el sistema API-ZYM, el aislamiento Bb 9205 presentó una respuesta positiva para 6 de las 19 enzimas evaluadas. Dentro del grupo de aislamientos con patogenicidad menor del 80%, cabe destacar a Bb 9011, Bb 9019, Bb 9029 y Bb 9213, que presentaron actividad para 7 de las 19 enzimas evaluadas. Se presentan 31 aislamientos liofilizados del hongo *B. bassiana*, de diferentes hospedantes y regiones geográficas, caracterizados desde el punto de vista enzimático cualitativo, como base para futuros trabajos en cuantificación de enzimas a partir de sustratos más específicos.

Palabras claves: Control biológico, plagas, patogenicidad, producción de enzimas, *Beauveria bassiana*, entomopatógenos.

ABSTRACT

Beauveria bassiana is one of the most studied entomopathogenic fungi for biological control of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Infection caused in insects occurs through the integument and is mediated by extracellular enzymes of the fungus participating in host penetration and infection. With the purpose of characterizing isolates enzymatically, an easy and reliable laboratory methodology was standardized. The qualitative technique described by Paterson and Bridge in 1994 was modified. Enzymatic production was also evaluated by the commercial system API-ZYM, with which two reading times were established. No direct relationship between enzymatic activity and pathogenicity on coffee berry borer was found. Isolates Bb 9205 and Bb 9027 showed pathogenicity percentages of 90 and 97.5%, respectively, and the best enzymatic activity. With the API-ZYM system, isolate Bb 9205 showed a positive response for 6 of the 19 enzymes evaluated. Within the group of isolates with pathogenicity below 80%, it is worth noting isolates Bb 9011, Bb 9019, Bb 9029 and Bb 9213, which presented activity for 7 of the 19 enzymes evaluated. Thirty-one freeze-dried isolates of *B. bassiana* from different hosts and geographical regions, with qualitative enzymatic characterization, are presented as a base for future studies in enzyme quantification with more specific substrates. Such isolates are a valuable genetic resource for future research in selection for industrial and domestic formulation and for basic research purposes.

Keywords: biological control, pests, pathogenicity, enzyme production, *Beauveria bassiana*, entomopathogens.

1 Fragmento de la tesis "Utilización de fuentes de carbono y nitrógeno y evaluación enzimática de aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin patógenos a la broca del café y con patogenicidad menor del 80%" presentada a la Universidad Católica de Manizales para optar al título de Bacterióloga y Laboratorista Clínica. Manizales, Caldas, Colombia.

* Bacterióloga y Laboratorista Clínica. Becaria de Colciencias en la Disciplina de Entomología de Cenicafe.

** Investigador Científico I. Disciplinas Entomología y Biometría, respectivamente. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafe. Chinchiná, Caldas, Colombia.

La broca del fruto del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), es en la actualidad el insecto plaga que causa mayor daño al cultivo porque su ataque se dirige a la almendra, en la cual puede reproducirse (3). En este momento, se encuentra ampliamente distribuida en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Caldas, Cauca, Cundinamarca, Huila, Magdalena, Nariño, Quindío, Risaralda, Santander, Tolima y Valle, en los cuales infesta más de 650.000 hectáreas¹

Desde su aparición, Cenicafé ha optado por el uso de agentes biológicos como parte de un programa de manejo integrado de dicha plaga. Dentro de estos agentes biológicos el hongo *B. bassiana* ha mostrado ser eficaz en el control de la broca en las condiciones del ecosistema cafetero colombiano (2). La infección causada en insectos por este hongo ocurre en forma primaria a través del integumento, donde el hongo produce varias enzimas extracelulares que se encuentran implicadas en la penetración y su posterior infección (8).

El mecanismo de infección del hongo se inicia cuando la conidia se adhiere a la cutícula del hospedante susceptible. El proceso de penetración es mediado por una acción mecánica, de forma que la conidia germina en la superficie del insecto e inicia la penetración del integumento a través del tubo germinativo. Además, produce enzimas extracelulares relacionadas con la patogénesis tales como: proteasas, lipasas, ureasas, quitinasas y otras, que hidrolizan sus componentes cuticulares (14).

Las proteasas y las lipasas son enzimas constitutivas del hongo *B. bassiana*, que actúan degradando la cutícula del hospedante (12). La quitinasa puede actuar como una enzima cons-

titutiva o adaptativa, dependiendo de la especificidad de la cepa (9). El integumento del insecto está compuesto de proteínas y quitinas con lípidos asociados y compuestos fenólicos los cuales actúan como una barrera contra microorganismos invasores. Los hongos filamentosos son capaces de penetrar esta barrera a través de la acción combinada de enzimas hidrolíticas como quitinasas, proteasas y lipasas. La presencia de enzimas hidrolíticas suele facilitar cada etapa de infección del hongo y adicionalmente, puede ser importante en la invasión del hemocelo del insecto (8).

Existen métodos cuantitativos para determinar la producción de enzimas extracelulares; ésta se realiza teniendo en cuenta la cantidad de enzima liberada en medios de cultivo, mediante lecturas del diámetro de la actividad de la enzima y determinando el peso seco del hongo (4, 9, 11). Otros métodos son cualitativos, para los cuales se han desarrollado diferentes técnicas, entre ellas: electroforesis, cromatografía, sustratos enzimáticos comerciales como "API-ZYM", uso de medios de cultivo con un sustrato y un indicador de pH.

Los hongos filamentosos tienen períodos metabólicos primarios y secundarios. El metabolismo primario se relaciona con los procesos de crecimiento y desarrollo, tales como la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno y la producción de enzimas. La asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno se realiza comúnmente mediante el empleo de medios básicos definidos químicamente, incorporando la fuente de interés (11). Las enzimas liberadas al medio externo por parte de los hongos determinan los nutrimentos que éstos puedan utilizar y por tanto, su hábitat de crecimiento (6).

El sistema comercial API-ZYM es similar a otros sistemas y se usa para detectar enzimas específicas o para identificar bacterias y hongos. Mediante el uso de este sistema se ha

¹ Herrón O., A. Reunión Directores Técnicos de Comités de Cafeteros y Cenicafé. Chinchiná, Febrero 1997 (Comunicación personal).

determinado la actividad enzimática de los hongos entomopatógenos durante la germinación (5). El sistema API-ZYM permite la determinación de 19 actividades enzimáticas extracelulares diferentes. De otra parte, los glucósidos del 4-methylumbelliferyl han sido empleado para evaluar enzimas fúngicas extracelulares en medios de cultivo y se han comparado los resultados con aquellos obtenidos con el sistema API-ZYM (1).

El laboratorio de patología de insectos de Cenicafe cuenta con 107 aislamientos del hongo *B. bassiana* previamente caracterizados en cuanto a patogenicidad a la broca del café. Dichos aislamientos aún no se han caracterizado desde el punto de vista enzimático, razón por la cual se planteó esta investigación la cual tuvo como objetivos principales estandarizar una metodología confiable de evaluación cualitativa de enzimas producidas por el hongo *B. bassiana* mediante el uso de medios de cultivo con un sustrato y un indicador de pH, caracterizar con dicha técnica 31 aislamientos de este hongo con diferentes niveles de patogenicidad a la broca del café y evaluar la producción enzimática de estos aislamientos utilizando el sistema comercial API-ZYM.

De esta manera se buscó desarrollar un procedimiento para la determinación enzimática cualitativa de hongos entomopatógenos y su posterior selección para aplicación en programas de Manejo Integrado de Broca en el campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 31 cultivos multiespóricos de *B. bassiana*, 10 de ellos patógenos a la broca del café (con patogenicidad mayor del 80%) y 21 con patogenicidad menor del 80%. Los aislamientos patógenos se reactivaron previamente en broca con el fin de activar su

patogenicidad (13) mediante la técnica estandarizada en Cenicafe (7). Todos los aislamientos, incluyendo los menos patógenos se cultivaron en Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), durante 30 días. Posteriormente se realizaron pases en Agar-Agua con la finalidad de evitar la transferencia de nutrientes a los sustratos utilizados como prueba, que pudieran inducir a resultados falsamente positivos.

Se almacenaron alícuotas de 1ml de cada aislamiento con una concentración de 2×10^6 esporas/ml, con el propósito de proveer suficiente material y asegurar un inóculo homogéneo para cada una de las pruebas. Estas suspensiones se conservaron a una temperatura de -25°C en viales criogénicos de polipropileno esterilizados (Figura 1).

Para la estandarización de la metodología de evaluación enzimática cualitativa se partió de la técnica descrita por Paterson y Bridge (11) con algunas modificaciones. En ésta se contempla la utilización de medios básicos definidos químicamente, incorporando la fuente de interés.

En cada uno de los procedimientos se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos: adición de cloranfenicol al 0,016% a cada medio de cultivo con el fin de obviar contaminación; utilización de una concentración homogénea de inóculo del hongo para cada una de las pruebas; ajuste del pH de los sustratos y tiempo de lectura de cada una de las reacciones. El único tiempo de reacción para la enzima proteasa G fue de 10 días debido a que era necesario asegurar un buen crecimiento del hongo antes de realizar el proceso de refrigeración para la evaluación de la prueba. Con relación al sistema comercial API-ZYM se establecieron dos tiempos de evaluación, 30 minutos y 16 horas después de iniciada la reacción.

La siembra se realizó depositando 5µl de cada una de las suspensiones almacenadas a -25°C en el centro de las cajas y tubos empleados

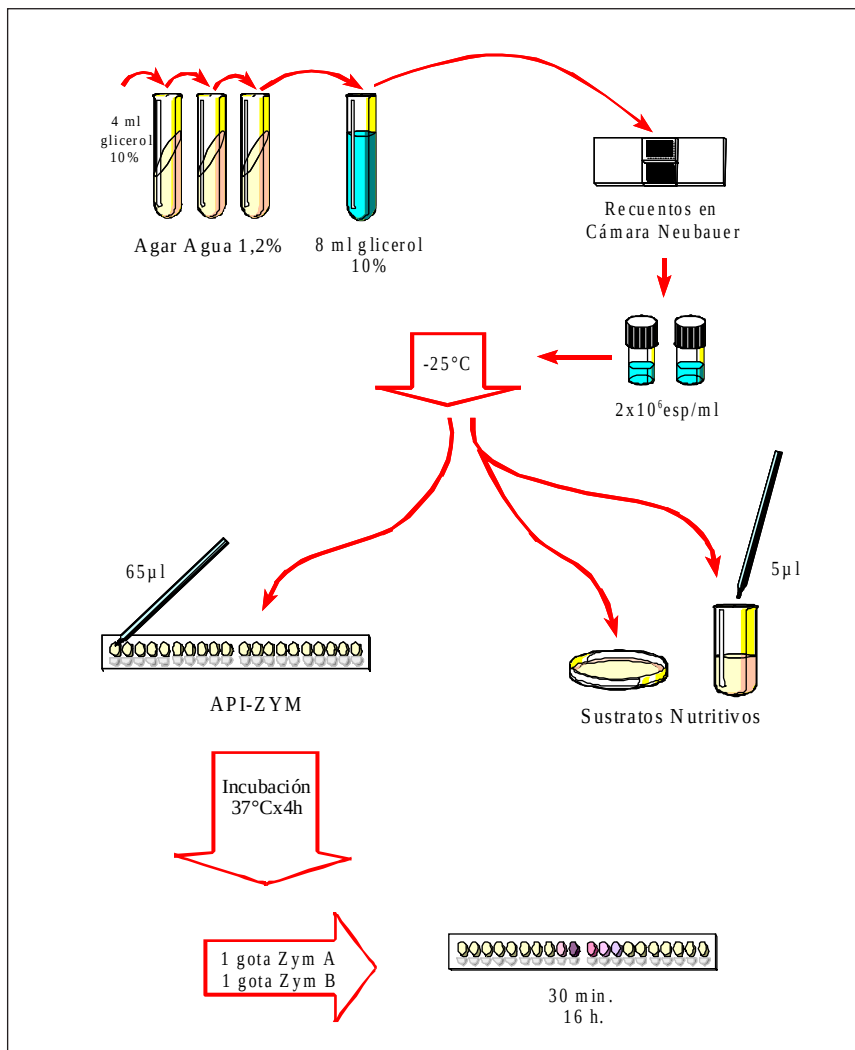


Figura 1. Metodología de conservación de aislamientos de *B. bassiana* para la siembra en sustratos nutritivos y en el sistema comercial Api-zym.

para las determinaciones. Se utilizó una concentración de 1×10^4 esporas/ $5 \mu\text{l}$, con un porcentaje de germinación mayor del 80%. Para esta evaluación se utilizaron los sustratos citrato de sodio, N-acetil glucosamina, lactosa, quitina, almidón, glucosamina y lanolina como únicas fuentes de carbono. La úrea fue el único sustrato evaluado como fuente de nitrógeno. La producción de proteasas se evaluó en los sustratos caseína y gelatina, lipasas en tributirina y esterases en tween 80.

Para evaluar el efecto de las pruebas en cada uno de los aislamientos, se tomaron las unidades experimentales conformadas por dos unidades de observación (caja de petri), que mostraron el 100% de producción de la enzima en las tres repeticiones. Se utilizó un modelo de análisis para el diseño de una vía. En el caso en el cual el estadístico de prueba F fue significativo, según el análisis de varianza bajo el diseño propuesto, se procedió a comparar el promedio del tiempo medio de reac-

ción de las pruebas, mediante la prueba de Tukey al 5%.

Para la siembra del sistema API-ZYM se utilizaron 65µl de muestra (suspensión del hongo) por pozo; posteriormente se incubaron las galerías durante 4 horas a 37°C. Pasado este tiempo, se adicionó una gota del reactivo ZYM A y una gota de reactivo ZYM B en cada pozo; las evaluaciones se realizaron en una escala de reacción de 0 a 5 por intensidad de color, en donde 0=reacción negativa, 1=reacción débil; 2, 3 y 4=reacción moderada y 5=reacción fuertemente positiva. Para cada aislamiento se realizaron dos evaluaciones, la primera a los 30 minutos de iniciada la reacción y la segunda a las 16 horas. Para esta evaluación solamente se realizó una prueba por muestra, teniendo en cuenta la baja variabilidad observada en las pruebas preliminares.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los aislamientos probados mostraron una reacción positiva a la utilización del citrato y N-acetil glucosamina como únicas fuentes de carbono, independientemente de su patogenicidad a la broca del café (Figura 2). Por el

contrario, no utilizaron almidón, lactosa, lanolina y glucosamina. La utilización de quitina mostró respuestas variables para algunos aislamientos, es decir, en las diferentes repeticiones del mismo aislamiento se encontró que el hongo utilizaba o no, el sustrato; estas variaciones pueden atribuirse a la naturaleza multiespórica de los aislamientos (Tabla 1).

La utilización de la úrea como única fuente de nitrógeno mostró también respuesta positiva por parte de todos los aislamientos evaluados (Tabla 1) (Figura 3).

De igual manera todos los aislamientos produjeron esterases (Figura 4). La producción de lipasas en el sustrato basado en tributirina, sólo se evidenció en 20 de los aislamientos; los demás presentaron respuestas variables y negativas (Tabla 1).

La producción de proteasas en el sustrato de caseína presentó también reacciones positivas para todos los aislamientos, mientras que la producción de proteasas en el sustrato basado en gelatina, sólo mostró respuesta positiva para 6 de los 31 aislamientos evaluados (Figura 5) (Tabla 1). Este comportamiento puede explicarse puesto que se trata de dos sustratos proteínicos diferentes.

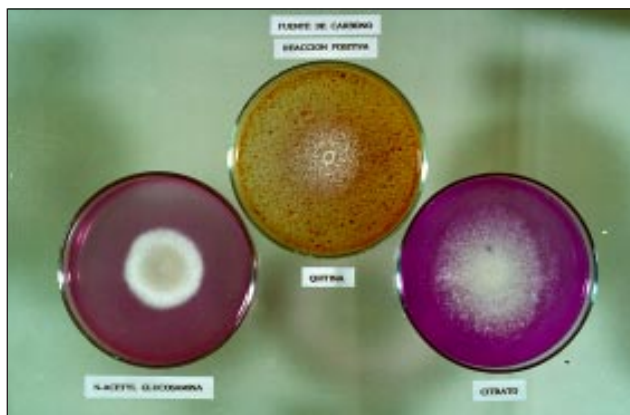


Figura 2. Reacción positiva de *B. bassiana* a la utilización de Citrato, N-acetil glucosamina y Quitina como únicas fuentes de Carbono.

TABLA 1. Caracterización enzimática de aislamientos de *Beauveria bassiana*.

Aislamiento Cod CEN	FUENTES DE												ORIGEN	HOSPEDANTE
	Carbono							Nitrógeno	ENZIMAS					
	Cit	Alm	Lac	Lan	Quit	N-aglu	Gluc	Urea	Lip	Est	ProC	ProG		
9002	+	-	-	-	+	+	-	+	d	+	+	-	Colombia.a	Coleoptera
9011	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	Colombia.b	Hemiptera
9012	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	Colombia.c	Coleoptera
9013	+	-	-	-	+	+	-	+	d	+	+	-	Filipinas	
9014	+	-	-	-	+	+	-	+	d	+	+	-	Brasil	Coleoptera
9015	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	China	Homoptera
9019	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	China	Lepidóptera
9021	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	Ecuador	Coleoptera
9022	+	-	-	-	d	+	-	+	+	+	+	-	China	Homoptera
9023	+	-	-	-	d	+	-	+	+	+	+	-	Filipinas	Hemiptera
9027	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	China	Homoptera
9028	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	Colombia	Coleoptera
9101	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	Colombia.d	Coleoptera
9102	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	Colombia.e	Coleoptera
9114	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	Colombia.f	Coleoptera
9115	+	-	-	-	d	+	-	+	d	+	+	-	Colombia.e	Coleoptera
9116	+	-	-	-	d	+	-	+	+	+	+	-	Colombia.g	Coleoptera
9117	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	Colombia.h	Coleoptera
9118	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	Colombia.i	Coleoptera
9119	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	Colombia.j	Coleoptera
9120	+	-	-	-	+	+	-	+	d	+	+	+	Colombia.j	Coleoptera
9201	+	-	-	-	+	+	-	+	d	+	+	-	Colombia.k	Coleoptera
9204	+	-	-	-	d	+	-	+	-	+	+	-	Colombia.l	Lepidoptera
9205	+	-	-	-	+	+	-	+	d	+	+	+	Colombia.m	Lepidoptera
9207	+	-	-	-	+	+	-	+	d	+	+	-	Colombia.n	Coleoptera
9212	+	-	-	-	d	+	-	+	+	+	+	-	Colombia.o	Coleoptera
9213	+	-	-	-	d	+	-	+	d	+	+	-	Colombia.p	Coleoptera
9218	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-		Coleoptera
9301	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	Colombia.q	Coleoptera
9307	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	Colombia.r	Coleoptera
9315	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	Colombia.j	Orthoptera

+ = resultado positivo, - = resultado negativo, d = dudoso

Cit = Citrato, Alm = Almidón, Lac = Lactosa, Lan = Lanolina, Quit = Quitina, N-agl = N-acetil glucosamina, Glu = Glucosamina, Li = Lipasa, Est = Esterasa, Pr C = Proteasa (Caseína), Pr G = Proteasa (Gelatina).

a = Ancuya-Nariño, b = Garzón-Huila, c = San José del Nus-Antioquia, d = Sandoná-Nariño, e = Yalí-Antioquia, f = Guadalupe-Huila, g = La Virginia-Risaralda, h = Ansermanuevo-Valle, i = Circasia-Quindío, j = Pereira-Risaralda, k = Chinchiná-Caldas, l = Puerto Wilches-Santander, m = Candelaria-Valle, n = Cerritos-Risaralda, o = Balboa-Risaralda, p = Rio Frío-Valle, q = Supia-Caldas, r = Amalfi-Antioquia.

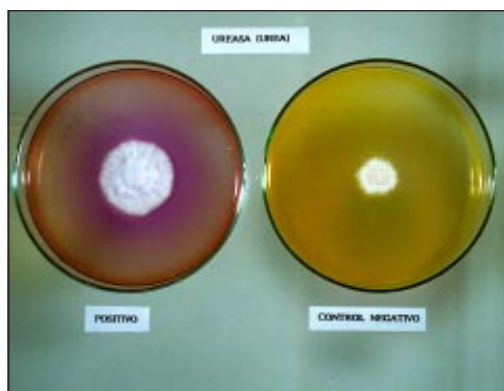


Figura 3. Reacción positiva a la utilización de úrea como única fuente de Nitrógeno (izquierda) y Control negativo (derecha).

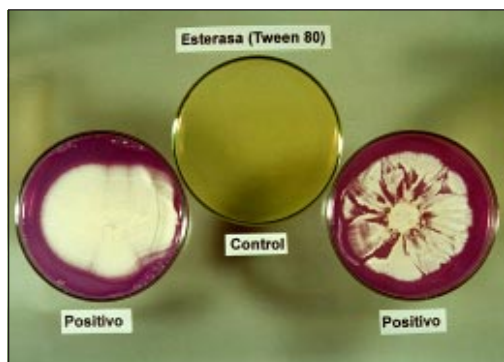


Figura 4. Producción de Esterasa en cultivos de *B. bassiana* (a los lados) y Control sin inóculo (centro, superior).

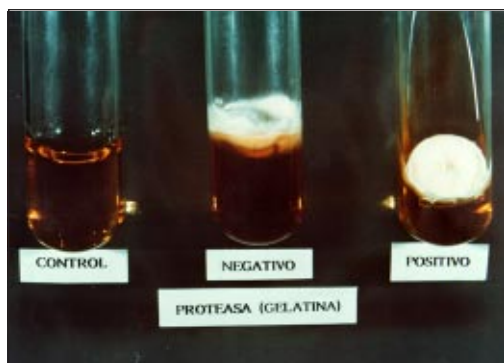


Figura 5. Producción de proteasa (gelatina) (derecha), reacción negativa y Control sin inóculo (izquierda).

La única prueba que fue positiva para todos los aislamientos y que presentó un 100% de producción en el total de las unidades experimentales fue la N-acetil glucosamina. Aquellos aislamientos que no presentaron un porcentaje de producción del 100% y los que mostraron en algunos casos reacciones variables (positivas y negativas) y en otros casos presentaron contaminación, no fueron incluidos en el grupo objeto de análisis, aún cuando mostraron porcentajes de producción que fluctuaron entre 67 y 92% (Tablas 2 y 3).

El aislamiento *Bb* 9119 fue el único que presentó un porcentaje de producción del 100% para todas las pruebas; sin embargo, presenta una patogenicidad del 26%. Dicho factor no permite su selección, tal como lo sugieren Moore y Prior (10) quienes sostienen que un aislamiento de un patógeno debe ser virulento, específico, de fácil cultivo y capaz de permanecer estable en el ambiente en que se aplica. Por el contrario, los aislamientos *Bb* 9115, *Bb* 9201 y *Bb* 9213 presentaron la menor actividad enzimática (Tabla 3).

De los aislamientos con patogenicidad mayor del 80% sobresalen *Bb* 9205 y *Bb* 9027, que presentaron porcentajes de patogenicidad de 90 y 97,5%, respectivamente. Ambos aislamientos mostraron reacciones positivas para 7 de las pruebas evaluadas. El aislamiento *Bb* 9205 mostró los menores tiempos de reacción dentro de este grupo (Tabla 2).

Con respecto a la evaluación enzimática con el sistema Api-zym (Figura 6), no se observó ningún tipo de actividad para las enzimas: fosfatasa alcalina, lipasa C14, cistina arilamidasa, tripsina, a quimotripsina, a galactosidasa, b galactosidasa, b glucoronidasa, N-acetil b glucosidasa, a manosidasa y a fucosidasa. El aislamiento *Bb* 9205 del grupo de aislamientos patogénicos sobresale por presentar las mayores intensidades de color para 6 de las 19 enzimas evaluadas en la técnica

TABLA 2. Tiempo medio (días) de reacción enzimática de los aislamientos de *B. bassiana* con patogenicidad a *Hypothenemus hampei* mayor del 80 %.

PRUEBA AISLAMIENTO	UREA		ESTERASA		N-ACETIL		LIPASA		QUITINA		PROTE (G)		PROTE (C)		CITRATO	
	MEDIA	CV %	MEDIA	CV %	MEDIA	CV %	MEDIA	CV %	MEDIA	CV %	MEDIA	CV %	MEDIA	CV %	MEDIA	CV %
9002	3,0aB	0,0	*	*	4,0b	0,0	*	*	10,5a	51,7	*	*	*	*	9,0ab	11,1
9012	*	*	4,7B	12,4	4,0b	0,0	3,0c	0,0	*	*	*	*	*	*	11,7a	2,5
9021	*	*	4,0A	0,0	4,0a	0,0	3,0b	0,0	*	*	*	*	3,0b	0,0	*	*
9027	5,0B	20,0	4,7B	12,4	4,3bc	13,3	3,0c	0,0	*	*	*	*	5,3b	9,5	16,5a	3,0
9204	3,0B	0,0	*	*	4,0b	0,0	*	*	*	*	*	*	3,7b	31,5	13,2a	29,0
9205	3,0D	0,0	3,3D	17,3	3,0d	0,0	*	*	7,8b	11,3	10,0a	0,0	*	*	6,2c	4,7
9207	3,0B	0,0	*	*	4,0b	0,0	*	*	9,2a	27,9	*	*	4,9b	4,6	8,7a	13,3
9212	4,7B	12,4	3,5Bc	20,2	4,3bc	13,3	3,0c	0,0	*	*	*	*	*	*	8,7a	6,7
9218	3,0B	0,0	3,7B	15,7	4,0b	0,0	5,0ab	0,0	10,7a	54,5	*	*	*	*	10,8a	17,5
9301	3,3Ab	17,3	4,0A	0,0	4,0a	0,0	3,0b	0,0	*	*	*	*	*	*	*	*

Los datos seguidos por diferente letra en la misma fila difieren estadísticamente, según prueba de Tukey a 0,05
 * = Estas pruebas no cumplieron con el requisito de 100% de producción, por tanto, no se incluyeron en el análisis.

TABLA 3. Tiempos medios (días) de reacción enzimática de los aislamientos de *B. bassiana* con patogenicidad a *Hypothenemus hampei* menor del 80%.

PRUEBA AISLAM	UREA		ESTERASA		N-ACETIL		LIPASA		QUITINA		PROTE (G)		PROTE (C)		CITRATO	
	MEDIA	CV %	MEDIA	CV %	MEDIA	CV %	MEDIA	CV %	MEDIA	CV %	MEDIA	CV %	MEDIA	CV %	MEDIA	CV %
9011	3,5E	28,6	4,3Ce	11,8	4,9bcde	12,9	5,3bcde	21,6	6,1b	11,3	10,0a	0,0	*	*	*	*
9013	3,7B	31,5	4,0B	0,0	3,7b	15,7	*	*	12,5a	50,0	*	*	3,2b	12,9	4,8b	5,9
9014	3,3B	17,3	4,3B	13,3	4,8b	21,5	*	*	*	*	*	*	*	*	13,8a	9,1
9015	3,0C	0,0	4,0C	0,0	4,0c	0,0	3,3c	17,3	14,00a	8,2	*	*	4,0c	27,4	7,8b	3,7
9019	3,7B	31,5	5,0B	0,0	4,0b	0,0	3,0b	0,0	11,7a	27,5	*	*	*	*	15,3a	16,2
9022	3,0B	0,0	3,0B	0,0	4,0b	0,0	3,0b	0,0,0	*	*	*	*	3,0b	0,0	11,7a	13,1
9023	3,0c	0,0	3,0C	0,0	4,0b	0,0	3,0c	0,0	*	*	*	*	3,0c	0,0	9,8a	7,7
9028	3,0c	0,0	4,0c	0,0	4,0c	0,0	3,0c	0,0	8,0ab	19,4	10,0a	0,0	*	*	6,7b	18,9
9101	5,8b	30,1	*	*	4,3bc	13,3	3,0c	0,0	*	*	*	*	*	*	12,7a	4,5
9102	7,5ab	20,0	*	*	3,7cb	15,7	6,2ab	20,4	9,8a	37,7	*	*	*	*	12,3a	4,7
9114	3,2b	9,1	4,0b	0,0	4,0b	0,0	*	*	10,0a	0,0	*	*	3,6b	24,8	18,5a	12,4
9115	4,5b	47,1	*	*	4,7b	12,4	*	*	*	*	*	*	*	*	9,3a	6,2
9116	3,3b	17,3	4,0b	0,0	3,7b	15,7	3,0b	0,0	*	*	*	*	3,5b	23,9	12,3a	16,4
9117	3,8bc	37,6	5,7b	10,2	4,7bc	12,4	3,0c	0,0	8,8a	10,5	10,0a	0,0	*	*	9,8a	2,9
9118	4,3b	26,6	*	*	4,2bca	6,9	3,0c	0,0	10,8a	53,9	*	*	*	*	9,7ab	11,9
9119	3,5c	14,3	4,2c	6,9	3,8c	7,5	3,0c	0,0	7,7b	10,6	10,0a	0,0	4,5c	18,6	6,3b	16,4
9120	3,0bcde	0,0	3,0bcde	0,0	3,3ae	17,3	*	*	10,2a	57,8	10,0 0ac	0,0	3,0bdee	0,0	7,3ad	20,8
9201	*	*	4,3 a	13,3	3,7a	15,7	*	*	11,8a	53,5	*	*	*	*	*	*
9213	5,8b	30,1	*	*	3,8b	7,5	*	*	*	*	*	*	*	*	12,3a	4,7
9307	3,3b	17,3	*	*	4,0b	0,0	4,5b	57,7	*	*	*	*	*	*	13,7a	15,2
9315	*	*	*	*	4,0b	0,0	3,2b	9,1	8,2a	20,0	*	*	4,0b	0,0	8,0a	0,0

Los datos seguidos por diferente letra en la misma fila difieren estadísticamente, Tukey (P = 0,05)
* = Estas pruebas no cumplieron con el requisito de 100% de producción, por tanto, no se incluyeron en el análisis.

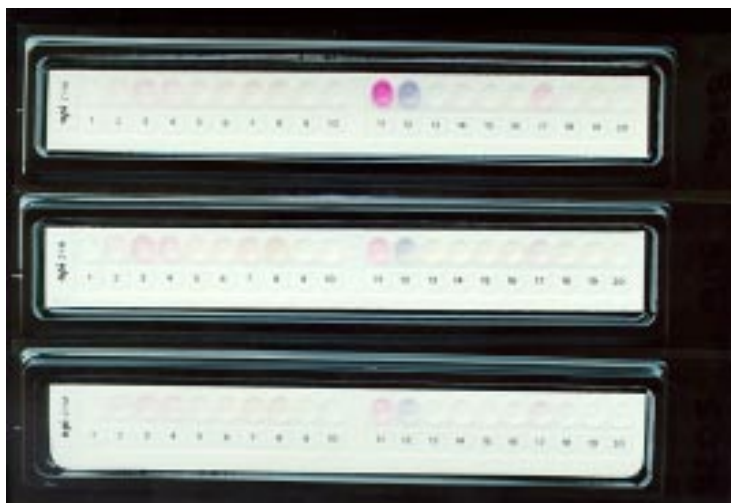


Figura 6. Sistema comercial API-ZYM. Los números asignados corresponden al grado de intensidad de la reacción colorimétrica.

enzimática y los menores tiempos de reacción (Tabla 4). De los aislamientos con patogenicidad menor del 80% cabe resaltar *Bb* 9011, *Bb* 9019, *Bb* 9023 y *Bb* 9213, los cuales presentaron actividad para 7 de las 19 enzimas evaluadas (Tabla 5). Los aislamientos de este grupo tampoco presentaron ningún grado de actividad para la enzima a glucosidasa.

Esta investigación permitió proponer una metodología de trabajo sencilla y confiable para la evaluación cualitativa de aislamientos de *B. bassiana*, la cual puede hacerse extensiva a la caracterización de agentes de control biológico, hongos y bacterias fitopatógenas o de importancia industrial. La técnica estandarizada permite realizar una selección de aislamientos para ser utilizados en programas de manejo integrado de plagas.

En cuanto a la producción cualitativa de enzimas y asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno y el porcentaje de patogenicidad a la broca del café no se presentó una relación directa. Teniendo en cuenta la producción cualitativa de las enzimas proteasas, lipasas y quitinasas relacionadas con la patogenicidad a la broca del café, se recomienda utilizar los aislamientos *Bb*

9027 y *Bb* 9205 en futuros estudios para la selección de aislamientos que se puedan utilizar en programas de control de la broca.

Se caracterizaron 31 aislamientos liofilizados del hongo *B. bassiana*, en la colección del laboratorio de patología de insectos de Cenicafé, desde el punto de vista enzimático cualitativo como base para futuros trabajos en cuantificación de enzimas a partir de sustratos más específicos. Los aislamientos caracterizados constituyen un valioso recurso genético, con miras a su selección en procesos de formulación industrial y artesanal para aplicaciones en campo y con propósitos de investigación básica.

El análisis enzimático cualitativo en los diferentes medios de cultivo permitió observar la esporulación registrada por los aislamientos evaluados. Se observó que el mejor sustrato para el desarrollo del hongo fue el medio basal que incluía el Tween 80 como fuente de carbono. En este sustrato los aislamientos presentaron una buena esporulación a partir de los 6 días de incubación (Figura 7). Lo anterior puede ser de gran importancia para propósitos de producción masiva de este entomopatógeno.

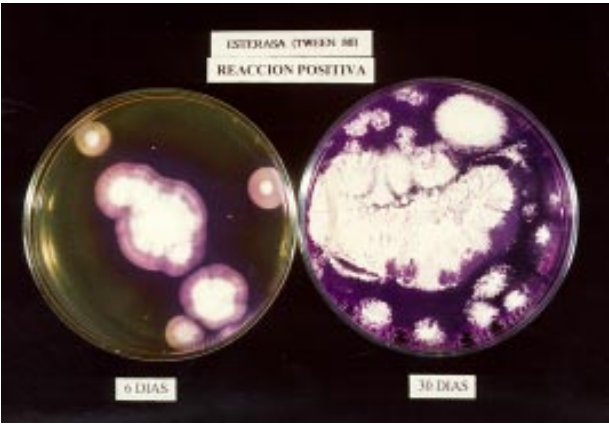


Figura 7. Esporulaci3n profusa del hongo *B. bassiana* en Tween 80, al cabo de 6 y 30 d3as de cultivo.

TABLA 4. Caracterizaci3n enzimática de aislamientos patogénicos de *B.bassiana* usando el sistema comercial API-ZYM*

Enzima	Lipasas				Proteasas				Fosfatasas				Glucosidasa	
	Esterasa C1		Esterasa lipasa		Leucina Arilamidasa		Valina Arilamidasa		Fosfatasa ácida		Naftol.-A-S-BI fosfohidrolasa		β glucosidasa	
	30'	16h	30'	16h	30'	16h	30'	16h	30'	16h	30'	16h	30'	16h
Aislamiento														
9002	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
9012	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1
9021	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
9027	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
9204	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0
9205	1	1	1	1	0	0	0	1	2	2	2	2	1	1
9207	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
9212	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
9218	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
9301	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1

* 30 minutos y 16 horas = Tiempos de lectura despu3s de iniciada la reacci3n.
La escala de reacci3n por intensidad de color fue: 0 = reacci3n negativa, 1 = reacci3n debil, 2, 3 y 4 = reacci3n moderada, 5 = reacci3n fuertemente positiva.

TABLA 5. Caracterización enzimática de los aislamientos de *B. bassiana* con patogenicidad menor del 80% usando el sistema comercial API-ZYM*

Enzima	Lipasas				Proteasas				Fosfatasa				Glucosidasa	
	Esterasa		Esterasa		Leucina		Valina		Fosfatasa		Naftol.-A-S-BI		β	
	C1		lipasa		arilamidasa		arilamidasa		ácida		Fosfohidrolasa		glucosidasa	
Aislamiento	30'	16h	30'	16h	30'	16h	30'	16h	30'	16h	30'	16h	30'	16h
9011	1	1	1	1	0	1	0	1	3	3	3	3	3	2
9013	2	2	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
9014	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
9015	0	1	0	1	0	1	0	2	1	1	1	1	0	0
9019	0	1	0	1	0	1	0	1	2	2	2	2	2	2
9022	0	1	3	3	0	0	0	1	5	4	5	5	3	3
9023	3	3	1	2	0	1	0	1	3	3	3	3	2	3
9028	1	1	0	1	0	0	0	1	3	4	3	4	2	2
9101	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
9102	0	0	0	1	0	1	0	1	2	3	2	2	2	2
9114	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
9115	1	1	1	1	0	0	0	1	3	3	3	3	1	1
9116	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
9117	1	1	1	1	0	0	0	1	2	2	2	2	1	1
9118	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0
9119	1	1	1	1	0	0	0	1	4	4	4	4	2	2
9120	2	2	2	2	0	0	0	1	5	5	5	5	4	3
9201	1	1	1	1	0	0	0	1	3	3	3	3	2	1
9213	0	1	1	1	0	1	0	1	2	2	2	2	1	1
9307	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1
9315	0	1	0	1	0	0	0	1	2	2	1	1	1	1

* 30 minutos y 16 horas = Tiempos de lectura después de iniciada la reacción.
La escala de reacción por intensidad de color fue: 0 = reacción negativa, 1 = reacción debil, 2, 3 y 4 = reacción moderada, 5 = reacción fuertemente positiva.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al doctor Alex Enrique Bustillo P., por su valiosa contribución a la revisión del presente documento y al auxiliar Carlos Alberto Quintero A. por su colaboración en el desarrollo del estudio. Este trabajo se realizó gracias al apoyo financiero de Colciencias y la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia.

LITERATURA CITADA

1. BARTH, M.G.M.; BRIDGE, P.D. 4 Methy-lumbelliferyl substituted compounds as fluorogenic substrates for fungal extracellular enzymes. Letters in Applied Microbiology 9: 177-179. 1989.

2. BUSTILLO P., A.E.; POSADA, F.J. El desarrollo y uso de entomopatógenos en el control de la broca del café. In: Congreso de Socolen, 23. Cartagena de Indias, Julio 17-19, 1996. Memorias. Cartagena, Socolen, 1996, p. 232.

3. CARDENAS M., R. La broca del café *Hypothenemus hampei* en Colombia. In: Seminario sobre la broca del café. Medellín, Mayo 21 de 1990. Medellín, Socolen, 1991. p. 1-13 (miscelánea N° 18).
4. CHANG, T.T.; YANG, X.Y.; KO, W.H. A sensitive method for detecting production of extracellular enzymes by fungi on solid media. *Mycologia* 84(6): 923-926. 1992.
5. EL-SAYED, G.N.; IGNOFFO, C.M. ; LEATHERS, T.D. ; GUPTA, S.C. Use of a colorimetric system to detect enzymes expressed by germinating conidia of entomopathogenic fungi. *Mycopathologia* 118: 29-36. 1992.
6. GARRAY, M.O.; EVANS, R.C. Fungal nutrition and physiology. John Wiley and Sons. p. 231-263. Citado por: VARELA R., A. Diferenciación de aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Santafé de Bogotá, Universidad de los Andes. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología, 1993. 113p. (Tesis: Magister en Microbiología).
7. GONZALEZ G., M.T. ; POSADA F., F.J. ; BUSTILLO P., A.E. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauverria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. *Cenicafé* 44(3): 93-102. 1993.
8. HEGEDUS, D.D. ; KHACHATOURIANS, G.G. Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*. *Biotechnology Letters* 10(9): 637-642. 1988.
9. LEOPOLD, J.; SAMSINAKOVA, A. Quantitative estimation of chitinase and several other enzymes in the fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 15: 34-42. 1970.
10. MOORE, D.; PRIOR, C. The potential of mycoinsecticides. *Biocontrol News and Information* 14(2): 31N-40N. 1993.
11. PATERSON R, R.M.; BRIDGE, P.D. Biochemical techniques for filamentous fungi. Wallinford, CAB International, 1994. 125p. (IMI Technical Handbooks N° 1).
12. ROBERTS, D.W.; YENDOL, W.G. Use of fungi for microbial control of insects. In BURGESS, H.D.; HUSSEY, Eds. *Microbial Control of Insects and Mites*. London, Academic Press, 1971. p. 125-149.
13. SAMSINAKOVA, A. ; KALALOVA, S. The influence of a single spore isolated and repeated subculturing on the pathogenicity of conidia of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 42: 156-161. 1982.
14. SMITH, R.J. ; GRULA, E.A. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 37: 222-230. 1981.