EVALUACIÓN EN CAMPO DE UN AISLAMIENTO DE *Beauveria bassiana* SELECCIONADO POR RESISTENCIA A LA LUZ ULTRAVIOLETA

Sandra Patricia Tobar-H*. Patricia Eugenia Vélez-Arango**; Esther Cecilia Montoya-Restrepo**.

RESUMEN

TOBAR H., S.P.; VÉLEZ A., P. E.; MONTOYA R., E.C. Evaluación en campo de un aislamiento de *Beauveria bassiana* seleccionado por resistencia a la luz ultravioleta. Cenicafé 50(3): 195-204. 1999.

Se seleccionó el aislamiento *B. bassiana* 9218 resistente a todos los períodos de exposición a la luz ultravioleta, LUV para evaluar en el campo el porcentaje de mortalidad de broca por acción del hongo, viabilidad del hongo (UFC/ml) y tasa de reducción de la viabilidad del hongo al cabo de 30 días, en una zoca de café de la variedad Colombia. Se realizó un seguimiento de las variables exógenas humedad relativa, temperatura y radiación solar global. El análisis estadístico mostró efecto de tratamientos, a favor de *B. bassiana* 9218 RLUV, la formulación comercial presentó la más baja mortalidad y el testigo absoluto mostró promedios bajos en la mayoría de los tiempos. El mayor efecto del hongo se evidenció a los 30 días, con porcentajes de mortalidad de broca del 20,6%. El análisis mostró efecto de tratamientos para la variable viabilidad, siendo el mejor *B. bassiana* 9218 RLUV con una menor reducción de UFC/ml al final de la evaluación (30 días). Los resultados muestran el efecto de regulación de poblaciones de la broca (21%) ejercido por un aislamiento seleccionado por resistencia a la LUV.

Palabras claves: Resistencia, luz ultravioleta, mortalidad, viabilidad, cafetales, *Beauveria bassiana*.

ABSTRACT

Beauveria bassiana isolate 9218, which is resistant to all exposure periods to ultraviolet light, was selected to perform a field evaluation of coffee berry borer mortality, fungus viability (cfu/ml), and fungus rate of viability reduction after 30 days in a Colombia cultivar coffee prunned. Relative humidity, temperature and global solar radiation were monitored. Statistical analysis indicated differences among treatments, with a good performance of *B. bassiana* 9218 RLUV. The commercial formulation showed the lowest mortality and the absolute control showed low averages most of the time. The highest fungus effect was observed after 30 days, with coffee berry borer mortalities of 20.6%. There were also differences among treatments in viability, and the best treatment was *B. bassiana* 9218 RLUV with the lowest reduction of cfu/ml at the end of the evaluation (30 days). Results indicate a certain degree of regulation of coffee berry borer populations with the isolate selected by UV light resistance.

Keywords: Resistance, ultraviolet light, mortality, viability, field, *Beauveria bassiana*

* Universidad Católica de Manizales. Apartado aéreo 357. sptobar@ucatolicamz.edu.co

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

La broca del café *Hypothenemus hampei* es considerada la plaga más importante de la caficultura en el mundo (12) ya que su ataque se dirige a la almendra, en la cual puede reproducirse. Los daños causados por la broca están representados en la pérdida de peso de las almendras, la caída de frutos y la alteración en la calidad de la bebida (4).

Entre las formas de control de plagas, se cita el control natural que se define como el mantenimiento de una densidad de población dentro de ciertos límites, como consecuencia de la acción conjunta de todo el ecosistema en el que actúan factores bióticos que involucran otros organismos como parásitos, predadores, entomopatógenos. Además, factores abióticos tales como el clima, la temperatura, el agua, la humedad, la radiación solar, el suelo, los vientos y las sustancias químicas, que determinan el éxito o el fracaso de un agente de control biológico en el campo (6, 8).

Debido a la necesidad de obtener patógenos más eficaces para el control de insectos en el campo, se ha utilizado la inducción de mutaciones de hongos por acción de la luz ultravioleta, como una técnica para el mejoramiento genético de estos microorganismos (19). Aún cuando existen aislamientos 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: alta resistencia, resistencia intermedia y sensibilidad. 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 (16).

Teniendo en cuenta que la exposición del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* al efecto de la luz ultravioleta modifica su virulencia, esporulación y viabilidad, se buscó en la presente investigación evaluar en condiciones de campo la viabilidad y la virulencia sobre la broca del café, de un aislamiento del hongo seleccionado previamente por resistencia a la luz ultravioleta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Etapa de laboratorio. Se realizó una selección inicial, partiendo de 9 aislamientos de *B. bassiana,* los cuales mostraban su acción sobre la broca del café, causando mortalidades superiores al 80% (Tabla 1). Para tal propósito se utilizó el método descrito por Vilas Boas *et al*. (19), con algunas modificaciones. De esta manera, se prepararon suspensiones de 1ml con una concentración de $1x10^6$esporas/ml, que se sometieron a exposición a la luz ultravioleta durante 10, 30 y 60 minutos, en una cámara de flujo laminar con longitud de onda de 254nm y a una distancia de 25 cm. Luego de la irradiación de cada uno de los aislamientos y en el testigo no irradiado, se evaluaron las variables: unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) o propágulos viables del hongo, crecimiento diario del diámetro de la colonia durante 29 días, actividad enzimática en el sistema comercial Api Zym y porcentaje de mortalidad sobre la broca del café.

El aislamiento seleccionado para el estudio de campo se comparó con un testigo conformado por este mismo aislamiento no expuesto al efecto de la luz ultravioleta, y con la formulación comercial Conidia^R WG de Agrevo[2], que posee filtros de luz ultravioleta (1). Con el fin de evaluar la resistencia a la luz ultravioleta del hongo presente en la formulación comercial, se realizaron pruebas de resistencia con el método de UFC/ml (17), en el medio selectivo para el desarrollo de *B. bassiana* (14). Para esta evaluación, se tomaron tres muestras de la formulación, correspondientes a los períodos de marzo (lote # 0301110), abril (lote # 0301104) y

TABLA 1. Relación de aislamientos de *Beauveria bassiana* seleccionados para el estudio, con porcentajes de patogenicidad sobre la broca del café superiores al 80%. Cenicafé, subestación experimental " La Catalina". Pereira, Risaralda.

AISLAMIENTO	% Patogenicidad	HOSPEDANTE			
		Género	Especie	Orden	Familia
Bb 9301	93,3	*Rhynchophorus*	*palmarum*	COLEOPTERA	CURCULIONIDAE
Bb 9012	91,7	*Hypothenemus*	*hampei*	COLEOPTERA	SCOLITYDAE
Bb 9021	91,7	*Hypothenemus*	*hampei*	COLEOPTERA	SCOLITYDAE
Bb 9205	90,0	*Diatraea*	*saccharalis*	LEPIDOPTERA	PYRALIDAE
Bb 9027	90,0	*Nilaparvata*	*lugens*	HOMOPTERA	DELPHACIDAE
Bb 9204	90,0	*Antaeotricha*	*sp*	LEPIDOPTERA	STENOMIDAE
Bb 9212	86,7	*Hypothenemus*	*hampei*	COLEOPTERA	SCOLITYDAE
Bb 9002	83,3	*Hypothenemus*	*hampei*	COLEOPTERA	SCOLITYDAE
Bb 9218	81,7	*Cosmopolites*	*sordidus*	COLEOPTERA	CURCULIONIDAE

mayo (lote # 0301105) de 1996 y de cada uno de ellos, se aisló el hongo *B. bassiana* para someterlo al efecto de la LUV. Paralelamente, el lote # 0301110, correspondiente a mayo/96, se preparó según las indicaciones de la casa productora del insumo biológico y se tomaron alícuotas de 1ml de la formulación en recipientes de 50ml, según el método descrito previamente, con el propósito de ser sometidas a irradiación en una cámara de flujo láminar con una longitud de onda de 240nm (15).

Etapa de campo. Se llevó a cabo en la Subestación Experimental de Cenicafé "La Catalina", localizada en la vereda El Retiro, en el municipio de Pereira, ubicada a 1350 msnm., en un lote de café sembrado con la variedad Colombia en etapa de zoca, conformado por 1200 árboles de 30 meses de edad, sembrados a 2x1m y con sombrío de plátano.

Los tratamientos evaluados fueron: *B. bassiana* 9218 no expuesto a la luz ultravioleta, *B. bassiana* 9218 resistente a 60 minutos de exposición a la LUV, formulación comercial "Conidia^{R} WG" de Agrevo (1), y un Testigo absoluto, el cual correspondia al hongo encontrado en forma natural.

Infestación artificial. La parcela experimental estuvo constituída por 16 árboles y la unidad experimental por un árbol del cual se seleccionó 1 rama al azar de uno de los cuatro árboles centrales como parcela efectiva; de este árbol se tomó al azar una rama de la zona productiva en la cual se dejaron 50 frutos sanos y de apariencia uniforme; luego se colocó una manga entomológica, construida con alambre #10 de 40cm de largo y 20cm de diámetro y cubierta con tela de muselina blanca, que se sujetó a la rama con hilo de polipropileno (18).

Una vez instaladas las mangas entomológicas se hizo la infestación con aproximadamente 150 brocas hembras recién emergidas, suministradas por la Unidad de Cría de Parasitoides de Cenicafé. Las brocas habían sido transportadas en recipientes plásticos de fotografía, con trocitos de papel en su interior para evitar el canibalismo. En el momento de realizar la infestación se utilizó un colador con el fin de separar las brocas de los trocitos de papel.

Equipo de aspersión. La aspersión se realizó 48 horas después de la infestación artificial. Para ello se retiró la manga entomológica de

cada rama y se descartaron en un balde con insecticida los adultos de broca que no habían perforado los frutos y se encontraban aún en la manga. Se partió de un porcentaje de infestación de broca superior al 50% en las ramas seleccionadas. Para la aspersión se utilizó un equipo de presión neumática, Calimax 10 cafetera, con recipientes intercambiables de un litro de capacidad, utilizando una boquilla HC3, con un flujo de 190cc/min, a una presión de 40lbs/pulg^2.

Se estableció el tiempo de aplicación en 18 segundos, para un volumen total de 57cc por árbol, de la preparación del hongo, es decir, se aplicó una concentración de $5x10^8$ esporas/árbol para cada uno de los tratamientos, a excepción del tratamiento conformado por la formulación comercial el cual se preparó según las indicaciones de la etiqueta. Una vez realizada la aspersión en el árbol se procedió a cubrir nuevamente la rama con la manga y se retiró en cada tiempo de evaluación (8, 15 y 30 días).

En cada uno de los tratamientos en los que se incluyó el aislamiento de *B. bassiana* 9218 se utilizó el hongo cultivado en arroz en forma artesanal (2) y para la preparación final del hongo en el tanque de aspersión, se agregó aceite emulsivo de uso agrícola "Carrier" al 0,7% v/v, para promover un mejor desprendimiento de las esporas. El volumen se ajustó con agua a 10 litros.

Evaluación. Se hizo la evaluación de mortalidad de la broca durante un mes, realizando lecturas semanales a los 8, 15 y 30 días después de la aspersión.

Al momento de la evaluación se retiró del árbol la rama infestada (unidad experimental), se tomaron todos los frutos afectados por la broca, se disecaron y se evaluó en éstos la mortalidad. Todas las brocas que en el momento de la evaluación se encontraban muertas, pero no presentaban signos del hongo, se sometieron a un proceso de desinfestación con hipoclorito de sodio comercial, durante dos minutos y se removió el exceso de éste con toallas de papel. Posteriormente se depositaron las brocas en cajas de petri con agar agua acidificado (ácido láctico al 44%) y se hizo la incubación a 21°C durante 8 días. Al cabo de este período se evaluó macroscópica y estereoscópicamente la esporulación del hongo. De esta forma se determinó la etiología de la infección al insecto (Figura 1). El porcentaje de eficacia se determinó según la fórmula de Schneider-Orelli (5), la cual se aplica sólo cuando la infestación es uniforme al comienzo del ensayo.

Viabilidad. Para evaluar la viabilidad del hongo en el campo, es decir, su capacidad de sobrevivencia a través del tiempo, se tomaron al azar de cada árbol asperjado 60 frutos verdes no perforados por broca y se depositaron en botellas con 50 ml de glicerol al 10%, método sugerido por Vélez y Montoya (17). En cada uno de los tiempos de evaluación se realizaron 9 repeticiones por tratamiento.

Diseño experimental. La acción del hongo se evaluó bajo un modelo de análisis para clasificación simple en las variables porcentaje de mortalidad de la broca y viabilidad del hongo; para la comparación de promedios se utilizó la prueba de Tukey al 5%. Se evaluaron en total 4 tratamientos, cada uno con 9 repeticiones, en

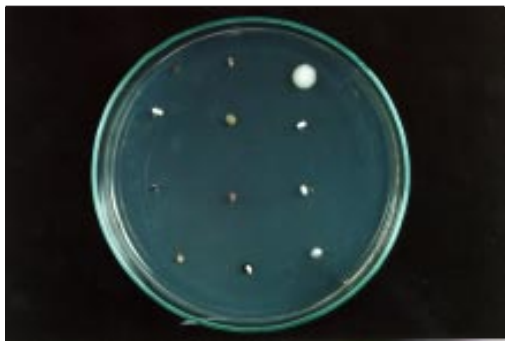

Figura 1. Esporulación del hongo *B. bassiana* sobre adultos de broca en el medio de cultivo agar-agua acidificado.

cada uno en los tiempos: 8, 15 y 30 días, para la variable mortalidad de la broca y 1 hora, 8, 15 y 30 días, para la viabilidad. Así mismo, se realizó un análisis de varianza de la variable tasa de reducción de la viabilidad del hongo al cabo de 30 días, con respecto al tiempo inicial de evaluación (1 hora) y se llevó un registro de las variables exógenas: temperatura, humedad relativa y radiación solar global durante el tiempo del estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa de laboratorio. Luego del proceso de irradiación sólo se seleccionaron los aislamientos que presentaron resistencia a todos los períodos de exposición a la luz ultravioleta evaluados, correspondientes a *B. bassiana* 9218 y 9002. Sin embargo, luego de la irradiación, el aislamiento *B. bassiana* 9218 mostró una mayor actividad enzimática y una mayor virulencia sobre la broca del café (60%), que el aislamiento 9002, por lo cual fue seleccionado para la prueba de campo.

Etapa de campo. Mortalidad de broca en campo por *B. bassiana.* El análisis estadístico de la variable mortalidad mostró efecto de tratamientos a favor de *B. bassiana* 9218 RLUV 60 min, que presentó el mejor comportamiento durante todo el tiempo de evaluación, mostrando diferencias significativas (Tukey al 5%), con los demás tratamientos en todas las evaluaciones, a excepción de la última (30 días), en la cual fue estadísticamente igual al tratamiento *B. bassiana* 9218 no irradiado.

La formulación comercial presentó los porcentajes más bajos de mortalidad en todos los tiempos evaluados. Los promedios de los valores de mortalidad en el testigo absoluto fueron bajos en la mayoría de los tiempos de evaluación, a excepción de los 15 días, cuando se presentaron diferencias significativas a favor de éste, debido quizás a la presencia de focos del hongo en el lote experimental posiblemente debido a aspersiones pasadas. En la última evaluación no se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos *B. bassiana* 9218 no irradiado y *B. bassiana* 9218 RLUV 60 min, pero sí de éstos con los tratamientos compuestos por la formulación comercial y el testigo absoluto.

El porcentaje de mortalidad total de broca durante todo el tiempo de evaluación fluctuó entre 6,5 y 36 % y el de mortalidad por acción del hongo *B. bassiana* estuvo en un rango entre 1,3 y 20,6% (Tabla 2). El efecto real del hongo en el control de poblaciones de la broca del café pudo evidenciarse en el último tiempo de evaluación (30 días), en el cual el tratamiento *B. bassiana* 9218 testigo presentó un porcentaje de brocas muertas del 27,5%, de donde un 20,6% correspondió a muerte por efecto de *B. bassiana,* equivalente a un 74,9% de mortalidad causada por el hongo. Con el tratamiento *B. bassiana* 9218 RLUV 60 min. ocurrió un porcentaje de mortalidad de broca del 29,5%, del cual el 19,8% ocurrió por efecto del hongo y equivale a un 67,1% de mortalidad de broca causada por *B. bassiana.* La formulación comercial presentó un 17,9 de mortalidad, del cual el 9% se debió a la acción del hongo; porcentaje que equivale a un 50,2% de mortalidad causada por éste. El tratamiento testigo absoluto presentó una mortalidad del 24,1%, con un 12,5% por efecto del hongo, que equivale al 51,8% de mortalidad causada por *B. bassiana.*

La evaluación del porcentaje de eficacia para cada uno de los tratamientos en todos los tiempos se presenta en la Tabla 3, en la cual se incluyen los promedios y la variación. Los valores promedio fluctuaron entre 1,1 y 22,7, con el máximo porcentaje de eficacia para el tratamiento *B. bassiana* 9218 resistente a la luz ultravioleta, en la ultima evaluación. Cabe anotar que para el análisis de varianza de la variable porcentaje de eficacia se hizo la transformación a: (% eficacia + 1) $^{1/2.}$

TABLA 2. Número total de brocas (TB), total de brocas muertas (TBM) y brocas muertas por el hongo (BMH) *Beauveria bassiana* en cada uno de los tratamientos durante el tiempo de evaluación de la acción del hongo en condiciones de campo. Cenicafé, subestación experimental " La Catalina". Pereira, Risaralda.

TRATAMIENTOS	TIEMPOS DE EVALUACIÓN								
	8 Días			15 Días			30 Días		
	TB	TBM %	BMH%	TB	TBM%	BMH %	TB	TBM%	BMH %
Bb 9218 no irradiado	822	9,3	1,9 ab	801	18,3	8,1 c	711	27,5	20,6 a
Bb 9218 RLUV	903	8,9	2,6 ab	860	27,3	14,3 b	807	29,5	19,8 a
F. comercial Conidia® WG de Agrevo	881	6,5	1,3 b	933	19,7	6,2 c	698	17,9	9,0 c
Testigo absoluto	1316	6,5	2,1 a	1301	36,0	20,3 a	740	24,1	12,5 b

* Promedios seguidos por letras diferentes en la misma columna, difieren estadísticamente según prueba de Tukey al 5%.
TB: Total de brocas. **TBM:** Total de brocas muertas. **BMH:** Brocas muertas por *Beauveria bassiana*

TABLA 3. Porcentaje medio de eficacia sobre la broca del café, de los tratamientos a base del hongo *Beauveria bassiana*. Cenicafé, subestación experimental " La Catalina". Pereira, Risaralda.

TRATAMIENTO	EVALUACIÓN	% EFICACIA	
	(Días)	$\overline{X}$	CV
Bb 9218 no irradiado	8	1,67	46,89
	15	10,75	50,99
	30	21,04	56,46
Bb 9218 Rluv	8	3,32	72,89
	15	17,69	53,68
	30	22,70	81,22
F. Comercial Conidia® de Agrevo	8	1,12	64,44
	15	7,29	79,28
	30	6,69	52,90

Teniendo en cuenta que estos resultados son producto de una sola aspersión, en general, se evidenció un control de la broca por parte de los diferentes aislamientos *B. bassiana*, tanto del seleccionado previamente en condiciones de laboratorio, por su resistencia a 60 minutos de exposición a la luz ultravioleta (67,1%), como del no irradiado (74,9%). Estos aislamientos producidos en sustrato de arroz (1), mostraron mejores resultados que la formulación comercial, la cual presentó siempre promedios de mortalidad por el hongo más bajos que el testigo absoluto.

Estudios de establecimiento de *B. bassiana* que se realizaron en fincas donde se detectó la broca inicialmente en el país, han mostrado porcentajes de infección del 48,1% y del 69%, con lo cual se plantea que se puede inducir una infección por este hongo en las condiciones del ecosistema cafetero colombiano, puesto que sus niveles se incrementan a medida que se realiza un mayor número de aspersiones (3).

En trabajos posteriores se realizó un seguimiento acerca de la epizootiología de *B. bassiana*, con dosis de $1x10^8$ esporas/árbol, se encon-

tró que en la medida que se dispersó la broca espacial y temporalmente, se diseminó el hongo, obteniéndose al cabo de ocho meses de evaluación niveles de infección superiores al 75% (3).

Viabilidad del hongo durante el tiempo de evaluación. El análisis de varianza mostró efecto entre tratamientos para la variable viabilidad, expresada en UFC/ml. El mejor tratamiento estuvo constituido por *B. bassiana* 9218 RLUV a los 60 min. En la primera evaluación (1 hora), todos los tratamientos presentaron diferencias estadísticas significativas, a favor de *B. bassiana* 9218 RLUV 60 min. En la segunda y tercera evaluación (8 y 15 días) no se presentaron diferencias estadísticas entre *B. bassiana* 9218 no irradiado y *B. bassiana* 9218 RLUV 60 min, al igual que entre la formulación comercial y el testigo absoluto, pero sí de éstos últimos con los tratamientos *B. bassiana* 9218 no irradiado y *B. bassiana* 9218 RLUV 60 min. En la última evaluación (30 días) no hubo diferencia entre tratamientos; sin embargo, los mayores promedios de UFC/ml se presentaron con *B. bassiana* 9218 RLUV 60 min (Tabla 4).

Con relación a la variable tasa de reducción de la viabilidad a los 30 días de evaluación, todos los tratamientos presentaron tasas brutas de reducción de UFC/ml superiores al 90% y el comportamiento fue estadísticamente igual. Cabe resaltar que el tratamiento *B. bassiana* 9218 RLUV 60 min, mostró la menor reducción de las UFC/ml al final de la evaluación (Figura 2).

En cuanto a la prueba de resistencia a la luz ultravioleta del hongo presente en la formulación comercial, a los siete días de incubación, se observó resistencia en todos los tiempos de exposición evaluados sin embargo, ocurrió esporulación incipiente del hongo en el medio selectivo.

La Tabla 5 ilustra el promedio de las siguientes variables exógenas: temperatura, que fluctuó entre 19,95°C y 20,69°C de modo que fue relativamente constante; humedad relativa, con fluctuaciones entre 79,53% y 86,12%; y la radiación solar global, con un acumulado de 139176, 80 horas luz, durante el estudio. Estos rangos de temperatura y humedad relativa corresponden a los registrados para el óptimo desarrollo de este hongo en condiciones de campo (10) y explican posiblemente su respuesta favorable en el control de la broca en las condiciones climáticas prevalentes. El número reducido de puntos de muestreo no permitió evaluar la asociación de estas variables exógenas con las variables viabilidad del hongo y mortalidad de broca.

TABLA 4. Tasa de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) del hongo *Beauveria bassiana* a través del tiempo de evaluación, bajo condiciones de campo.

TIEMPO DE EVALUACIÓN	TIEMPO DE EVALUACIÓN							
	1 HORA		8 DIAS		15 DIAS		30 DIAS	
	$\bar{X}$	CV	$\bar{X}$	CV	$\bar{X}$	CV	$\bar{X}$	CV
Bb 9218 no irradiado	14794 b	63,2	5254 a	38,5	2868 a	51,3	37	103,7
Bb 9218 RLUV	35346 a	48,0	11844 a	70,6	5188 a	166,6	1095	64,6
F. comercial Conidia® WG de Agrevo	4334 c	140,5	1427 b	71,0	280 b	129,9	100	-
Testigo absoluto	735 d	112,5	1030 b	194,6	95 b	126,5	20	-

* Promedios seguidos por letras diferentes, difieren estadísticamente según prueba de Tukey al 5%.

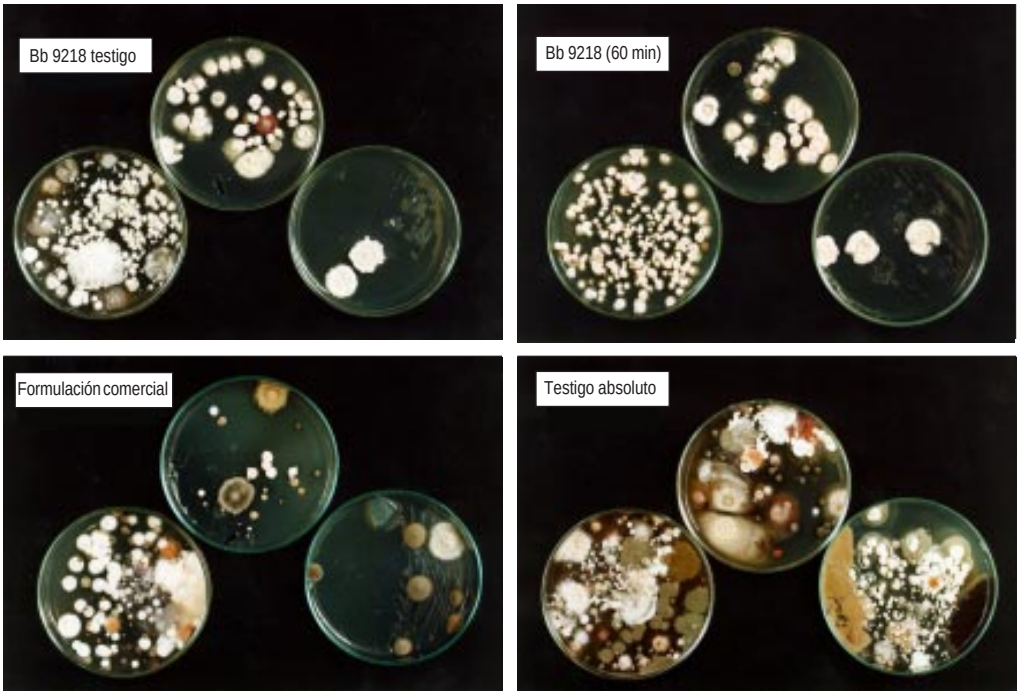

Figura 2. Unidades formadoras de colonia por mililitro de los tratamientos *B. bassiana* 9218 no irradiado, *B. bassiana* 9218 RLUV, formulación comercial Conidia de Agrevo y Testigo (hongo encontrado en forma natural), al cabo de 8 días de la aspersión en campo.

En general, se observó un aumento de poblaciones de broca atacada por el hongo *B. bassiana* a través del tiempo de evaluación; sin embargo, el número medio de UFC/ml del hongo en cada uno de los tratamientos se redujo en los tiempos evaluados. El incremento de la población se explica, probablemente, por el efecto del potencial de inóculo del hongo presente en los insectos afectados y su distribución a otras poblaciones del insecto, es decir, la broca en sí misma, constituye la mejor fuente de inóculo para la dispersión de este agente biológico. Esto coincide con los estudios de González *et al.* (11), en los cuales se afirma que el inóculo de una broca infectada con *B. bassiana* es equivalente al aplicado por árbol en las aspersiones con las formulaciones comerciales. Lo anterior asevera el carácter autodiseminativo del hongo una vez se establece en un cafetal. Así mismo, Vélez y Montoya (17), en estudios tendientes a evaluar la supervivencia de los hongos *B. bassiana* y *Metarhizium*

TABLA 5. Registro de las variables exógenas: temperatura (°C), humedad relativa (%) y radiación solar global (Wh/m^2) a través del tiempo de evaluación de la acción de los diferentes tratamientos de *B. bassiana*. Cenicafé, subestación experimental "La Catalina". Pereira, Risaralda.

	TIEMPO DE EVALUACIÓN			
VARIABLES EXÓGENAS	**1 hora**	**8 días**	**15 días**	**30 días**
Temperatura (°C)	21	20	20	21
Humedad relativa (%)	85	86	80	83
Radiación solar global (Wh/m^2)	13673	45618	80136	139177

anisopliae en agua más aceite Carrier, según la tecnología recomendada por Cenicafé y en aceite, en dos épocas del año y en dos localidades cafeteras, registraron una reducción de las UFC/ml de estos hongos en frutos sanos a través del tiempo de evaluación; pero dicha reducción no se presentó en forma regular en los frutos brocados, con valores de UFC/ml de estos hongos en el último período de evaluación, incluso mayores a los registrados en el tiempo inicial. Esta respuesta confirma lo expresado anteriormente, en el sentido de que la broca contribuye a la supervivencia y dispersión del hongo en el ecosistema cafetero.

Moore y Prior (13) afirman que la utilización de un agente biológico en el campo debe obedecer a procesos de selección previos en laboratorio en los cuales se estudien características relevantes para la aplicación y uso eficiente en el campo. En el presente estudio se seleccionó el aislamiento *B. bassiana* 9218 por su resistencia durante 10, 30 y 60 minutos de exposición a la luz ultravioleta, su actividad enzimática y su virulencia a la broca y posteriormente, se asperjó en el campo con el fin de evaluar su eficacia en el control de poblaciones de la broca del café.

Teniendo en cuenta que el proceso de selección en laboratorio fue drástico, puesto que en condiciones naturales no se presentan los registros de luz ultravioleta a los cuales fue sometido el aislamiento, y que dicho efecto implica alteraciones al nivel de ADN, con posibles modificaciones en la respuesta de virulencia y viabilidad de estos hongos, se debe destacar la mejor respuesta de viabilidad y virulencia de este aislamiento a través del estudio. Lo anterior, permite concluir que la exposición al agente mutagénico no causó alteraciones en dicha respuesta y puede asumirse que quizás este agente biológico haya desarrollado mecanismos de reparación al efecto letal de la radiación (9), conservando su resistencia a la luz ultravioleta e incrementando su potencial patogénico al ponerse en contacto con el hospedante en condiciones de campo.

La radiación ultravioleta ha sido utilizada ampliamente en la investigación de las mutaciones ya que es de fácil manipulación y es un agente cuantificable que lesiona directamente el ADN, sin embargo, probablemente ninguna de las lesiones primarias inducidas por la LUV en el ADN, incluyendo los dímeros, es mutagénica, esto se manifiesta en bacterias a través de la inactivación del gen recA que impide la mutagénesis causada por la LUV. Cuando el producto de este gen está ausente las células mueren porque no puede producirse reparación del ADN. Este resultado indica que el efecto mutacional producido por la LUV tiene lugar durante la reparación del ADN y no como primera consecuencia de la radiación (7).

En el contexto de la Biotecnología, el hombre modifica la actividad de los microorganismos para ser usados eficientemente en cualquier aplicación; en este caso particular, en el control de plagas en cultivos de importancia económica, como la broca del café. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran regulación de poblaciones de la broca del café (21%), por efecto de un aislamiento del hongo *B. bassiana*, previamente seleccionado en laboratorio por resistencia a la luz ultravioleta, como una medida de control en programas de manejo integrado de la broca. Cabe anotar que en el proceso de manipulación adecuada de un microorganismo para su uso eficiente en la regulación de poblaciones insectiles en el campo, deben incorporarse otras características tales como una alta capacidad esporulativa, germinativa, tolerancia a altas temperaturas y compatibilidad con productos químicos, entre otros.

Esta respuesta corresponde a una sola aspersión del hongo en dicha localidad, en la cual se observó mortalidad de la broca por efecto del hongo y sobrevivencia de éste en el campo, al cabo de 30 días de la aplicación. Es posible que

aspersiones frecuentes de este agente biológico y mayores dosis de inóculo contribuyan a un control más eficiente de la broca en las condiciones del ecosistema cafetero Colombiano.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Instituto Colombiano para la Ciencia y Tecnología "Francisco José de Caldas" COLCIENCIAS, al personal de apoyo de la subestación experimental de Cenicafé "La Catalina". A la Disciplina de Agroclimatología de Cenicafé y a los auxiliares Silvio Marín, Eduardo Osorio, Jesús María Morales y Octavio Ríos (q.e.p.d.) por su valiosa colaboración en el desarrollo del estudio. A los investigadores Diógenes Villalba G, Alex E. Bustillo P, Pablo Benavides M. y a Beatriz Elena Valdés D. por su valiosa colaboración en el desarrollo del estudio y en la corrección del documento.

LITERATURA CITADA

1. AGREVO. Manual Técnico. CONIDIA^{R} WG, fórmula biológica eficaz contra la broca. Protección natural para el café. Santafé de Bogotá. s.f., s.p.
2. ANTIA L., O.P.; POSADA F., F.J.; BUSTILLO P., A.E.; GONZALEZ G., M.T. Producción en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. Chinchiná, Cenicafé. 1992. 8p. (Avances técnicos Cenicafé N° 182).
3. BUSTILLO P., A.E.; CASTILLO, H.; VILLALBA, D.A.; MORALES, E.C.; VELEZ, P.E. Evaluaciones de campo con el hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café, *Hypothenemus hampei* en Colombia. *In*: Colloque Scientifique International sur le Café, 14. San Francisco, Juillet 14-19, 1991. Paris, ASIC, 1991. p. 679-686.
4. CARDENAS, M.R. La broca del café *Hypothenemus hampei* en Colombia. *In*: Seminario sobre la broca del café. Medellín, mayo 21, 1990. Medellín, SOCOLEN, 1990. p 1-13.
5. CIBA-GEIGY. Manual para ensayos de campo en protección vegetal. 2 ed. Suiza Werner Funtener, 1981. 205 p.
6. COUCH, T.L.; IGNOFFO, C.M. Formulation of insect pathogens.*In*: BURGES, H.D. Ed. Microbial control of pest and diseases 1970-1980. London, Academic Press, 1981. p 621-634.
7. DARNELL, J.; LODISH, H. ; BALTIMORE, D. Biología celular y molecular. Barcelona, Editorial Labor, 1988. p. 1067-1069.
8. DE BACH, P. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. México, Editorial Continental, 1987. p. 31-46.
9. DE DUVE, C. La célula viva. Barcelona, Prensa Científica, 1988. p. 331-422.
10. DOMSCH, H.K.; GAMS, W.A.; ANDERSON, T.H. Compendium of soil fungi V.1. Londres. Academic Press, 1980. p 136-140.
11. GONZÁLEZ G., M.T.; POSADA F., F.J. ; MONTES, L.M. Potencial de inóculo de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. producido sobre *Hypothenemus hampei* (Ferrari). *In*: Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, 20. SOCOLEN, 1993. Cali , Julio 13-16. p. 102.
12. LE PELLEY, R.H. Pest of coffee. London, Longmans, Green and Co, 1968. 590 p.
13. MOORE, D.; PRIOR, C. The potential of mycoinsecticides. Biocontrol News and Information 14(2): 31-40. 1993.
14. RIVERA M., A.; LÓPEZ N., J.C. Medio selectivo para aislamiento de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. a partir de muestras del suelo. *In*: Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, 19. Julio 15-17, 1992. Resúmenes. Manizales, SOCOLEN, 1992. p 77.
15. TOBAR H., S.P. Selección de aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin por resistencia a la luz ultravioleta. Manizales, Universidad Católica. Facultad de Estudios Avanzados en Ciencias de la Salud, 1997. 82 p. (Tesis: Especialización en Microbiología).
16. 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.
17. VÉLEZ A., P.E.; MONTOYA R., E.C. Supervivencia del hongo *Beauveria bassiana* bajo radiación solar en condiciones de laboratorio y campo. Cenicafé 44 (3): 111-122. 1993.
18. VILLALBA G., D.D.; BUSTILLO P., A.E.; CHAVES C., B. Evaluación de insecticidas para el control de la broca del café en Colombia. Cenicafé 46 (3): 152-153. 1995.
19. VILAS BOAS, A.M.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; LUNA-ALVES-LIMA, E.A. Desenvolvimiento e aperfeicoamento de inseticidas biologicos para o controle de pragas. Arquivos de Biologia e Tecnologia 35 (4): 749-761. 1992.