

SELECCIÓN EN LABORATORIO DE AISLAMIENTOS DE *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* POR RESISTENCIA A LA LUZ ULTRAVIOLETA¹

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

RESUMEN

TOBAR H., S.P.; VÉLEZ A., P.E.; MONTOYA R., E.C. Selección en laboratorio de aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* por resistencia a la luz ultravioleta. Cenicafé 50(4): 327-337. 1999.

Se evaluó el efecto de la LUV sobre la viabilidad (UFC/ml) y la tasa de crecimiento (CD) de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* y se determinó la actividad enzimática y la patogenicidad de los aislamientos irradiados sobre la broca del café. Se encontraron diferencias entre tratamientos ($P=0,05$) para los aislamientos no irradiados, en la variable UFC/ml, a favor de *M. anisopliae* 9303 y de *B. bassiana* 9002, 9012, 9212, 9218 y 9205. Todos los aislamientos irradiados presentaron reducciones en su viabilidad mayores del 90%, independientemente del tiempo de exposición al efecto. La tasa diaria de CD mostró diferencias entre los aislamientos no irradiados a favor de *M. anisopliae* 9303, 9218, 9233 y de *B. bassiana* 9002, 9012, 9021, 9027, 9212, 9218. Cuando los aislamientos fueron sometidos a la LUV, en general, no presentaron CD, a excepción de los aislamientos *M. anisopliae* 9303 y *B. bassiana* 9218. La evaluación enzimática de los aislamientos irradiados mostró una mayor actividad en la mayor parte de los sustratos evaluados, especialmente en los aislamientos *Ma* 9303 y *Bb* 9218. Así mismo, los aislamientos irradiados presentaron una reducción en el porcentaje de mortalidad de broca, el cual pasó de un 80% a un 40%. Se concluye que aún cuando la LUV (254nm) es letal para la viabilidad de estos hongos, el método empleado permitió seleccionar una población de propágulos resistentes al efecto de la LUV, los cuales incrementaron su actividad enzimática como respuesta al agente mutagénico.

Palabras claves: Luz ultravioleta, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, resistencia, *Hypothenemus hampei*.

ABSTRACT

The effect of UV light on the viability (UFC/ml) and diametral colony growth (DG) of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* was evaluated, and enzymatic activity and pathogenicity on coffee berry borer of irradiated isolates was determined. There were differences among treatments ($P=0.05$) for the non-irradiated treatments in variable CFU/ml in favor of *M. anisopliae* 9303 and *B. bassiana* 9002, 9012, 9212, 9218, and 9205. All irradiated isolates showed reductions over 90% in their viability, independent from the exposition time. Daily rate of DG showed differences among the non-irradiated isolates in favor of *M. anisopliae* 9303, 9218, 9233, and *B. bassiana* 9002, 9012, 9021, 9027, 9212, 9218. When isolates were subjected to UV light, in general, they did not show DG, except for isolates *M. anisopliae* 9303 and *B. bassiana* 9218. Enzymatic evaluation of irradiated isolates showed a higher activity in the majority of the substrates evaluated, especially in isolates *Ma* 9303 and *Bb* 9218. Likewise, irradiated isolates showed a reduction in the percentage of coffee berry borer mortality, from 80% to 40%. Even though UV light (254nm) is lethal for these fungi, the method used allowed selection of resistant propagules to UV light, which increased their enzymatic activity as a response to the mutagenic agent.

Keywords: Ultraviolet light, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, resistance, *Hypothenemus hampei*.

1 Fragmento del trabajo "Selección de aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin por resistencia a la luz ultravioleta" presentado a la Universidad Católica de Manizales como requisito para optar al título de especialista en Microbiología. Manizales.

* Estudiante de Especialización en Microbiología

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

La broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) es el insecto más dañino que afecta la caficultura en Colombia; su daño se refleja en la destrucción y caída de frutos verdes y maduros. Los frutos brocados que quedan en el árbol no sólo reducen el rendimiento sino que demeritan la calidad del café (4).

Actualmente el control de la broca se realiza a través de un programa de Manejo Integrado de plagas (MIP), el cual involucra diferentes tipos de control. Dentro de ellos se encuentra el control biológico mediante el uso de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (1).

Con relación al uso del hongo *B. bassiana* como agente de control biológico, no es frecuente observar altos porcentajes de infección del hongo sobre la broca del café en condiciones de campo, lo cual puede atribuirse a factores de tipo exógeno presentes en el ecosistema cafetero como la alta temperatura, la humedad y la radiación solar que incluye rayos ultra violeta (UV). El componente UV de la luz solar puede inactivar los hongos entomopatógenos reduciendo su persistencia en el campo. Dicha acción se realiza en forma directa a través de deleciones, uniones cruzadas, ruptura de bandas y formación de sitios lábiles en la molécula de ADN, debido a que los ácidos nucleicos absorben la luz ultravioleta, que se localiza por debajo de la luz visible (210nm y 400nm).

En forma indirecta, esta radiación puede formar radicales altamente reactivos, de manera que la población tolerante a estos efectos puede presentar mutaciones en cuanto a la resistencia a los bacteriófagos, capacidad de fermentación o capacidad de sintetizar una sustancia, etc., lo que generalmente la hace diferente de la población original porque surgen modificaciones en su fisiología y genética produciendo mutantes que generalmente difieren de la población original (2, 7).

Paralelamente, De Duve (5), afirma que la luz ultravioleta es uno más de los múltiples agentes que pueden alterar el ADN al igual que los rayos X, las emisiones radiactivas, los radicales libres, los productos químicos, ciertas enzimas y errores en la replicación. Es así como el ADN se halla expuesto a diferentes tipos de lesión, las hebras pueden romperse o las bases perderse por hidrólisis, alterarse químicamente, emparejarse mal o unirse por enlaces covalentes; de una manera directa el principal efecto producido por la LUV es la dimerización de la timina, uniendo dos residuos adyacentes de ésta en una cadena de ADN sencillo, por medio de un anillo ciclobutilo, originando sobrecruzamientos, de modo que las sustancias intercaladoras pueden deslizarse entre los pares de bases adyacentes y dislocar la hélice del ADN.

Aunque las células tienen mecanismos de reparación, en la mayoría de los casos las lesiones resultan irreversibles. Sin embargo, es probable que ninguna de las lesiones inducidas por la luz ultravioleta sea mutagénica, lo cual indica que el efecto mutacional de la LUV tiene lugar durante la reparación del ADN y no como primera consecuencia de la radiación (3).

Con el fin de inducir mutaciones como una técnica para el mejoramiento de microorganismos, se ha utilizado ampliamente la luz ultravioleta en la investigación, ya que es de fácil manipulación y es un agente cuantificable (3, 11).

Actualmente existen en el cepario del laboratorio de patología de insectos de Cenicafé 92 aislamientos de *B. bassiana* (*Bb*) y 52 aislamientos de *M. anisopliae* (*Ma*) provenientes de diferentes regiones geográficas e insectos hospedantes, los cuales representan genotipos promisorios para el control biológico de plagas de importancia económica, no sólo en el café sino en otros cultivos. En estos aislamientos no

se ha llevado a cabo una selección en laboratorio por resistencia a la luz ultravioleta, factor de tipo abiótico que limita el crecimiento y desarrollo de estos hongos en el campo. Por tal razón, el presente trabajo tuvo como objetivo principal seleccionar en laboratorio aislamientos de *Bb* y *Ma* resistentes a diferentes tiempos de exposición a la luz ultravioleta, con una buena actividad enzimática y un alto porcentaje de patogenicidad a la broca del café, para ser utilizados en programas de manejo integrado del insecto.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se llevó a cabo en los laboratorios de la Disciplina de Entomología, en el Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Los aislamientos utilizados en el presente estudio provenían de diferentes órdenes de insectos y se seleccionaron según su alta capacidad biocontroladora sobre la broca demostrada en estudios previos realizados en

Cenicafé por González *et al.* (6). Estos aislamientos reactivados en broca de café se conservaron en Glicerol al 10% con una concentración de 1×10^6 esporas/ml y un volumen de 1ml, a una temperatura de -25°C . Los aislamientos evaluados fueron *Bb* 9002; *Bb* 9012, *Bb* 9021, *Bb* 9027, *Bb* 9204, *Bb* 9205, *Bb* 9212, *Bb* 9218 y *Bb* 9301 y *Ma* 9201, *Ma* 92189, *Ma* 9233, *Ma* 9236 y *Ma* 9303.

Dichos aislamientos provienen de hospedantes variables, los cuales se relacionan en la Tabla 1, así como su mortalidad expresada en porcentajes de patogenicidad sobre la broca del café superior al 79%.

Reactivación de los aislamientos. Para obviar la pérdida de patogenicidad de los aislamientos de *Bb* y *Ma* a través de los subcultivos se reactivaron en brocas adultas recién emergidas provenientes de la Unidad de cría de Cenicafé, con el fin de potenciar su patogenicidad al insecto. Para este propósito se utilizó el método estandarizado por González *et al.* (6).

TABLA 1. Relación de aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* seleccionados para el estudio, con porcentajes de patogenicidad sobre la broca del café superiores al 79%.

AISLAMIENTO	PATOGENICIDAD %	HOSPEDANTE			
		GÉNERO	ESPECIE	ORDEN	FAMILIA
Bb 9301	93,3	<i>Rhynchoporus</i>	<i>palmarum</i>	COLEOPTERA	CURCULIONIDAE
Bb 9012	91,7	<i>Hypothenemus</i>	<i>hampei</i>	COLEOPTERA	SCOLITYDAE
Bb 9021	91,7	<i>Hypothenemus</i>	<i>hampei</i>	COLEOPTERA	SCOLITYDAE
Bb 9205	90,0	<i>Diatraea</i>	<i>saccharalis</i>	LEPIDOPTERA	PYRALIDAE
Bb 9027	90,0	<i>Nilaparvata</i>	<i>lugens</i>	HOMOPTERA	DELPHACIDAE
Bb 9204	90,0	<i>Antaeotricha</i>	sp	LEPIDOPTERA	STENOMIDAE
Bb 9212	86,7	<i>Hypothenemus</i>	<i>hampei</i>	COLEOPTERA	SCOLITYDAE
Bb 9002	83,3	<i>Hypothenemus</i>	<i>hampei</i>	COLEOPTERA	SCOLITYDAE
Bb 9218	81,7	<i>Cosmopolites</i>	<i>sordidus</i>	COLEOPTERA	CURCULIONIDAE
Ma 9201	92,5	<i>Nemocestes</i>	<i>incomptus</i>	COLEOPTERA	CURCULIONIDAE
Ma 9236	87,5	<i>Desconocido</i>			
Ma 9218	85,0	<i>Teleogryllus</i>	<i>comodus</i>	ORTHOPTERA	GRYLLIDSE
Ma 9233	80,0	Saltahojas		HOMOPTERA	CICADELLIDAE
Ma 9303	92,5	<i>Hypothenemus</i>	<i>hampei</i>	COLEOPTERA	SCOLITYDAE

Exposición a la luz ultravioleta. A partir de los aislamientos reactivados en broca cultivados en SDA durante aproximadamente 10 días, incubados a 21-25°C, se prepararon suspensiones de conidias en Glicerol al 10% para cada uno de los aislamientos, para lo cual se realizaron diluciones sucesivas (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}). A partir de la dilución 10^{-3} se realizaron seis recuentos en cámara de Neubauer y una vez obtenida la concentración, a partir del promedio de las lecturas realizadas, se procedió a obtener las suspensiones de concentración 1×10^6 esporas/ml (10). Con una pipeta esterilizada se colocó 1ml de la suspensión en 3 beakers esterilizados de 50ml los cuales fueron irradiados en una cámara de flujo laminar con una lámpara de luz ultravioleta de 15watt de potencia, cuya emisión fue de 254nm y a una distancia de 25cm. Dicha exposición se realizó en tres tiempos: 10, 30 y 60 minutos. De igual manera se tuvo un tratamiento testigo sin exposición.

Una vez concluido el proceso de irradiación se procedió a inocular 0,1ml y 5 microlitros de esta suspensión en cajas de petri con SDA con el fin de evaluar las variables UFC/ml y Crecimiento diametral (CD) en milímetros, a los 29 días de la siembra, respectivamente.

Diseño experimental. El efecto de los aislamientos se estimó bajo un modelo de análisis completamente aleatorizado para las variables UFC/ml y CD. Para la variable UFC/ml se utilizaron 10 repeticiones por cada aislamiento partiendo del mismo medio de cultivo inicial con el aislamiento esporulado de cada uno de los hongos, donde la unidad experimental fue la caja de Petri. Para la variable CD se utilizaron 10 repeticiones partiendo del mismo medio de cultivo inicial. La tasa diaria de crecimiento diametral se estimó para cada una de las unidades experimentales de acuerdo con un modelo de regresión lineal simple, con coeficientes de determinación mayores del 80%.

Actividad enzimática. A los aislamientos que luego de ser sometidos a diferentes tiempos de exposición a la LUV presentaron una población de propágulos tolerantes a este efecto, se les determinó su actividad enzimática utilizando el sistema comercial ApiZym, el cual consiste en microcápsulas que contienen sustratos cromógenos de enzimas deshidratadas y tampón. Estos sustratos permiten la detección de 19 enzimas: fosfatasa alcalina, esterasa (C1), esterasa lipasa (C8), lipasa (C14), leucina arilamidasa, valina arilamidasa, cistina arilamidasa, tripsina, alfa quimotripsina, fosfatasa ácida, naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa, alfa galactosidasa, beta galactosidasa, beta glucoronidasa, alfa glucosidasa, beta glucosidasa, N-acetil-B-glucosaminidasa, alfa manosidasa y alfa fucosidasa.

La actividad enzimática de estos hongos resistentes al efecto de la LUV se evaluó luego de haberlos cultivado en agar agua y agar-saboureaud, bajo los mismos parámetros de inoculación, comparándolos con los patrones enzimáticos de los aislamientos que no fueron sometidos al efecto de la LUV, los cuales se utilizaron como testigos. Para la inoculación se tomaron 65 microlitros de la suspensión del hongo irradiado con una concentración de 1×10^6 esporas/ml y se depositaron en las cámaras de inoculación donde se incubaron durante cuatro horas a 37°C; transcurrido este tiempo se adicionó una gota de reactivo zym A y una gota de zym B en cada microcápsula, según las especificaciones de la prueba. La lectura de la reacción se realizó mediante una escala de 0 a 5 definida según la intensidad del color, donde 0 equivale a una reacción negativa, 1, reacción débilmente positiva, 2,3 y 4 a una reacción moderadamente positiva y 5 a una reacción fuertemente positiva.

Para la evaluación se realizaron dos lecturas, una a los 30 minutos y otra a las 16 horas de iniciada la reacción, según el método estandarizado por Valdés *et al.* (9).

Bioensayo de patogenicidad. Para la evaluación de la patogenicidad sobre la broca del café, se cultivaron los aislamientos irradiados en SDA, durante 30 días y, a partir de allí, se tomó el inóculo. Por cada aislamiento se utilizaron 5 unidades experimentales que contenía cada una, 15 brocas con cuatro repeticiones, según el método estandarizado por González *et al.*,(6). Como testigos se tuvieron un tratamiento conformado por adultos de broca que no estuvieron en contacto con el hongo y un testigo tratado con los aislamientos no irradiados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la luz ultravioleta sobre la viabilidad de los aislamientos. El análisis de varianza de los aislamientos no sometidos al efecto de la luz ultravioleta, mostró diferencias estadísticas entre ellos; el aislamiento *Ma 9303* presentó una menor tasa de reducción de UFC/ml (Figura 1), seguido de los aislamientos *Bb 9002*, *Bb 9012*, *Bb 9218* y *Bb 9205*. En cuanto a la

variable tasa de reducción de UFC/ml de los aislamientos, luego de ser irradiados, se presentaron reducciones superiores al 98% (Tabla 2), con respecto a los no irradiados e independientemente de los tiempos de exposición evaluados. Entre los aislamientos que presentaron una menor tasa de reducción de UFC/ml se destacan: *Bb 9218* y *Ma 9303*.

Efecto de la luz ultravioleta sobre el crecimiento diametral (CD). El análisis de varianza para la tasa diaria de crecimiento de los hongos no sometidos a la luz ultravioleta mostró diferencias significativas entre éstos a favor de los aislamientos *Ma 9303*, *Ma 9218* y *Ma 9233* y de los aislamientos *Bb 9002*, *Bb 9012*, *Bb 9021*, *Bb 9027*, *Bb 9212* y *Bb 9218*. La mayoría de los aislamientos sometidos al efecto de la luz ultravioleta no presentaron crecimiento, a excepción de los aislamientos *Ma 9303* y *Bb 9218* (Tabla 3).

Al evaluar la respuesta de estas dos variables se puede concluir que la luz ultravioleta ejerce

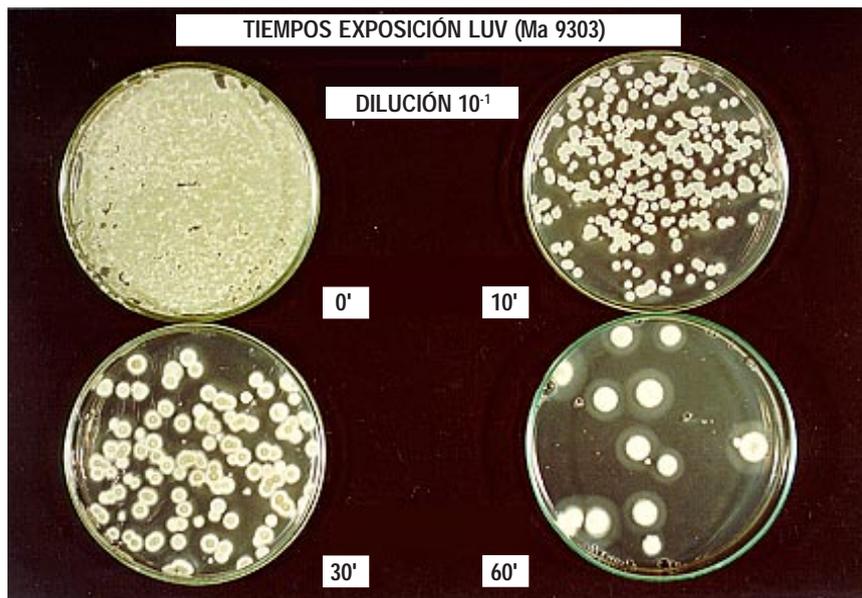


Figura 1. Unidades formadoras de colonia de un aislamiento de *Metarhizium anisopliae* sometido a la luz ultravioleta durante diferentes tiempos de exposición.

TABLA 2. Promedio de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) y Tasa relativa de reducción en la viabilidad de los diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sometidos a diferentes tiempos de exposición a la luz ultravioleta, con respecto a los aislamientos no irradiados.

AISLAMIENTO	TIEMPO DE EXPOSICIÓN			
	UFC/ml	10 minutos Tasa (%)	30 minutos Tasa (%)	60 minutos Tasa (%)
Bb 9002	186437,67b*	99,76a	99,75bc	99,99a
Bb 9012	145085,00b	99,99a	100e	100e
Bb 9021	16630,00bcd	99,80a	100e	100e
Bb 9027	84474,13bc	99,99a	99,99a	100e
Bb 9204	24509,53bcd	100e	100e	100e
Bb 9205	133778,67bc	99,99a	100e	100e
Bb 9212	89878,47bc	99,74a	99,96a	100e
Bb 9218	134436,00bc	98,55b	99,75ac	99,94ac
Bb 9301	75490,44bcd	100e	100e	100e
Ma 9201	71479,03bcd	100e	100e	100e
Ma 9218	14396,57bcd	99,99a	100e	100e
Ma 9233	62234,43bcd	99,99a	100e	100e
Ma 9236	21748,20bcd	100e	100e	100e
Ma 9303	268252,63a	98,11b	99,63b	99,89bc

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

TABLA 3. Tasa diaria de crecimiento diametral (CD) de aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, sometidos a diferentes tiempos de exposición a la luz ultravioleta.

TIEMPO AISLAMIENTO	0 Min X (mm)	10 Min X(mm)	30 Min X(mm)	60 Min X(mm)
Bb 9002	0,18518b*	0,028a	0,015a	0,00a
Bb 9012	0,24885a	0,082a	0,015a	0,00a
Bb 9021	0,29473a	0,050a	0,00b	0,00a
Bb 9027	0,29473a	0,046a	0,00b	0,00a
Bb 9204	0,15252b	0,00b	0,00b	0,00a
Bb 9205	0,18236b	0,00b	0,00b	0,00a
Bb 9212	0,24528a	0,034a	0,011a	0,00a
Bb 9218	0,27136a	0,053a	0,039a	0,015a
Bb 9301	0,26979a	0,00b	0,00b	0,00a
Ma 9201	0,23929b	0,00b	0,00b	0,00a
Ma 9218	0,20468b	0,016a	0,00b	0,00a
Ma 9233	0,19567b	0,035a	0,00b	0,00a
Ma 9236	0,18860b	0,00b	0,00b	0,00a
Ma 9303	0,20982b	0,039a	0,018a	0,017a

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

una acción letal sobre estos hongos, sin embargo, el método empleado en laboratorio permitió seleccionar una población de individuos tolerantes al efecto de la luz ultravioleta, los cuales se utilizaron en evaluaciones posteriores.

Efecto de la luz ultravioleta sobre la actividad enzimática. Con relación a los sustratos en los cuales se realizó la evaluación enzimática de los aislamientos se pudo observar una mayor reacción enzimática cuando fueron cultivados en el sustrato agar-agua (Tablas 4 y 6), con relación al sustrato SDA (Tablas 5 y 7). Por dicha razón sólo se referirán los resultados obtenidos en el sustrato agar-agua. En general, para la mayoría de los aislamientos evaluados se presentó un incremento de la actividad en la mayor parte de las enzimas después de la irradiación, especialmente en los aislamientos *Ma* 9303 y *Bb* 9218, los cuales presentaron mayores reacciones colorimétricas en la prueba enzimática. Es el caso del aislamiento *Bb* 9218, en el que las enzimas fosfatasa ácida y naftol A-S-BI fosfohidrolasa, aumentaron su reacción en función del tiempo de exposición, con relación a los aislamientos no irradiados. El aislamiento *Bb* 9002 presentó igual respuesta para las enzimas fosfatasa ácida y naftol A-S-BI fosfohidrolasa y los aislamientos *Bb* 9027 y *Bb* 9212 presentaron reacción en las enzimas fosfatasa ácida, naftol A-S-BI fosfohidrolasa, fosfatasa alcalina y beta glucosidasa, al ser sometidos a la luz ultravioleta, mientras que el aislamiento no irradiado no presentó actividad en las enzimas mencionadas (Figura 2).

Con respecto a *M. anisopliae*, el aislamiento *Ma* 9303 presentó un incremento en la actividad de las enzimas fosfatasa ácida, naftol A-S-BI fosfohidrolasa, alfa galactosidasa, beta glucosidasa, N- acetil beta glucosidasa, luego de la irradiación, con respecto al aislamiento no irradiado. Adicionalmente, las enzimas beta galactosidasa, beta glucuronidasa y alfa fucosidasa sólo se evidenciaron en este aisla-

miento irradiado y fueron negativas en el testigo. El aislamiento *Ma* 9218 presentó un incremento en la actividad de las enzimas fosfatasa ácida, naftol A-S-BI fosfohidrolasa y alfa galactosidasa, en función del tiempo de exposición. En el aislamiento *Ma* 9233 se presentó disminución de la actividad enzimática con respecto al aislamiento no irradiado, a medida que aumentó el tiempo de exposición para las enzimas fosfatasa alcalina, esterasa, esterasa lipasa, leucina, beta glucosidasa y N- acetil beta glucosidasa (Figura 3).

Efecto de la luz ultravioleta sobre la patogenicidad del hongo *B. bassiana* sobre la broca del café. Esta variable se evaluó en los aislamientos seleccionados en laboratorio por su resistencia a períodos de exposición a la luz ultravioleta de 30 y 60 minutos (Tabla 8). En general, se observó que la patogenicidad se redujo de un 80 a un 40%, en los aislamientos irradiados.

Se destacan los aislamientos: *Ma* 9303 con un porcentaje de patogenicidad del 60%, el aislamiento *Bb* 9218 con un porcentaje de patogenicidad del 55% y el aislamiento *Bb* 9002 con un porcentaje de patogenicidad del 42,5%, luego de 60 minutos de exposición a la luz ultravioleta.

Se concluye que la luz ultravioleta ejerce una acción letal sobre los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae*; sin embargo, el método empleado permitió seleccionar una población de individuos tolerantes a este efecto, los cuales a pesar de presentar reducciones en su viabilidad y patogenicidad sobre la broca del café, mostraron un incremento en la actividad enzimática. Tal respuesta se podría atribuir al efecto directo de la luz ultravioleta sobre el ADN de estos agentes biológicos, de modo que se modifica su actividad enzimática como respuesta a la acción del mutágeno, quizás como un mecanismo de adaptación de estos microorganismos a las condiciones adversas del medio.

TABLA 4. Caracterización enzimática de aislamientos patogénicos de *Metarhizium anisopliae* resistentes a diferentes tiempos de exposición a la luz ultravioleta, por el sistema comercial Api-zym, en el sustrato agar-agua. Lectura a los 30 min. y 16 h de reacción.

Aislamiento	Enzima	Fosfat.		Lipasas		Proteasas			Fosfatasa		Galacto		Glucor		Glucos		Manos		Fuco	
		Tiempo	Fosf. alcal	Ester C1	Lipasa	Ester Lipa	Lip C14	Leuc Arilam	Val Arilam	Trip	Fosfat. Ácida	Na-BI-S-BI-galac.	alfa galac.	Beta Galuco	Beta Gluco	Beta Glucos	N-ac-gluc	Beta Glucos	Manos	alfa Fuco
9303	0 min	1-1	3-4	2-4	2-4	0-0	3-4	0-1	0-0	4-5	4-5	3-4	0-0	0-0	1-3	1-2	0-0	0-0	0-0	0-0
	10 min	1-2	4-5	2-4	2-4	0-0	3-4	0-0	0-0	5-5	5-5	3-4	5-5	0-0	2-3	2-2	0-0	1-2	0-0	1-2
	30 min	1-1	3-4	2-3	2-3	0-0	2-2	0-1	0-0	4-5	4-5	4-4	5-5	0-0	3-4	2-3	0-0	1-1	0-0	1-1
	60 min	1-2	4-5	3-4	3-4	0-0	4-5	0-0	0-0	5-5	5-5	4-4	5-5	0-0	4-4	2-2	0-0	3-4	0-0	3-4
9233	0 min	3-4	3-4	3-4	3-4	0-0	3-4	0-1	1-1	4-5	4-5	3-4	1-2	0-0	3-5	3-5	0-1	0-0	0-0	0-0
	10 min	1-2	4-5	3-4	3-4	0-2	2-5	0-2	0-0	5-5	4-5	0-0	3-5	0-1	1-2	0-1	0-0	0-0	0-0	0-0
	30 min	1-1	3-4	1-2	1-2	0-0	0-1	0-1	0-0	3-4	3-4	0-0	1-1	0-0	1-1	0-0	0-0	0-0	0-0	0-0

La primera columna equivale a la lectura realizada a los 30 minutos y la segunda lectura a las 16 horas. Escala de reacción: 0= reacción negativa, 1= reacción débil, 2,3 y 4= reacción moderada, 5= reacción fuertemente positiva.

Enzimas= Fosfatasa alcalina, Esterasa, Esterasa lipasa, Leucina arilamidasa, Valina arilamidasa, Cistina arilamidasa, Tripsina, Alfa quimotripsina, Fosfatasa ácida, Naftol-A-S-BI-fosfodihrolasa, Alfa galactosidasa, Beta galactosidasa, Beta glucuronidasa, Alfa glucosidasa, Alfa glucosidasa, N-acetil-beta-glucosaminidasa, Manosidasa, Fucosidasa

TABLA 5. Caracterización enzimática de aislamientos patogénicos de *Metarhizium anisopliae* resistentes a diferentes tiempos de exposición a la luz ultravioleta, por el sistema comercial Api-zym, en el sustrato Saboureaud-dextrosa-agar. Lectura a los 30 min y 16 h de reacción.

Aislamiento	Enzima	Fosfat		Lipasas		Proteasas			Fosfatasa		Galactos		Glucos		Manos		Alfa	
		Tiempo	Fosfat Alcal	Ester C1	Ester lipa	Lipasa C14	Leucin arilam	Valina Arilam	Tripsi	Fosfat ácida	Na-A-S-BI-	alfa galac	Beta Galac	Beta Glucos.	Glucos	Manos	N-acetil Glucos.	Beta Manos
9303	0 min	1-1	3-4	2-2	2-2	0-0	2-2	0-1	0-0	4-5	4-5	0-0	0-0	2-3	1-1	0-0	0-0	0-0
	10 min	1-1	2-4	2-3	2-3	0-0	1-2	0-1	0-0	4-5	4-5	0-0	1-2	2-3	1-1	0-0	0-0	0-0
	30 min	1-1	2-4	1-2	1-2	0-0	1-2	0-2	0-0	4-5	4-5	0-0	2-2	2-2	1-1	0-0	0-0	0-0
	60 min	1-1	2-4	1-2	1-2	0-0	1-1	0-2	0-0	5-5	5-5	0-0	2-3	4-4	1-2	0-0	0-0	0-0
9233	0 min	2-3	3-4	2-3	2-3	0-0	3-4	0-1	1-1	3-4	4-5	3-4	1-2	3-5	3-5	0-1	0-0	0-0
	10 min	1-1	2-2	1-1	1-1	0-2	1-1	0-1	0-0	4-5	4-5	0-0	0-1	1-1	0-1	0-0	0-0	0-0
	30 min	1-2	3-5	2-2	2-2	0-0	0-2	0-2	0-0	5-5	5-5	0-0	0-0	1-1	0-0	0-0	0-0	0-0

TABLA 6. Caracterización enzimática de aislamientos patogénicos de *Beauveria bassiana* resistentes a la exposición a la luz ultravioleta, por el sistema comercial Api-zym, en el sustrato agar agua. Lectura a los 30 min y 16 h de reacción.

Aislamiento	Enzima	Fosfa		Lipasas		Proteasas			Fosfatasa		Galact	Gluco
		Tiempo	Fosfa Alkali	Ester C1	Ester Lipa	Lipa C14	Leuci arilam	Valin Arila	Alfa Quim	Fosfat ácida	Na-A-S-BI-	beta galac
9002	0 min	0-0	0-1	0-1	0-0	0-1	0-1	0-0	0-1	0-1	0-0	0-1
	10 min	0-0	1-1	0-1	0-1	0-1	0-0	0-0	1-2	1-2	0-0	0-0
	30 min	0-0	1-2	1-1	0-1	0-1	0-0	0-0	2-3	0-0	0-0	0-0
	60 min	0-0	2-2	0-1	0-1	0-1	0-1	0-0	3-4	3-4	0-0	0-0
9012	0 min	0-0	0-1	0-1	0-0	0-0	0-1	0-0	0-1	1-1	0-0	0-1
	10 min	0-0	0-0	1-2	0-0	0-0	1-2	0-0	2-2	1-2	0-0	1-2
9021	0 min	0-0	1-1	0-1	0-0	0-0	0-1	0-0	1-1	1-1	0-0	0-1
	10 min	0-0	2-2	1-2	0-0	0-0	0-1	0-0	2-2	2-2	0-0	0-1
9027	0 min	0-0	1-1	1-1	0-0	0-0	0-1	0-0	0-0	1-1	0-0	0-0
	10 min	0-0	2-3	1-2	0-0	0-1	0-1	0-0	5-5	1-2	0-0	0-0
	30 min	0-0	1-2	1-1	0-0	0-0	0-0	0-0	4-5	4-5	0-0	0-1
9205	0 min	0-0	1-1	1-1	0-0	0-0	0-1	0-0	2-2	2-2	0-0	0-1
	10 min	0-0	2-2	1-2	0-0	0-0	1-2	0-0	2-2	1-2	0-0	1-2
9212	0 min	0-0	0-1	0-1	0-0	0-0	0-1	0-0	0-0	0-1	0-0	0-0
	10 min	1-1	1-1	1-1	0-0	0-1	0-2	0-0	5-5	5-5	0-0	1-2
	30 min	0-1	1-1	1-1	0-1	0-2	0-2	0-0	5-5	5-5	0-0	1-2
9218	0 min	0-0	1-1	1-1	0-0	0-0	0-1	0-0	1-1	1-1	0-0	0-0
	10 min	0-1	2-3	1-2	0-0	1-1	0-1	0-0	2-3	2-3	0-1	1-1
	30 min	0-0	1-1	1-1	0-0	0-1	0-1	0-0	2-3	2-3	0-0	0-0
	60 min	0-1	2-3	1-2	0-0	0-2	0-2	0-0	3-4	3-4	0-0	0-1

TABLA 7. Caracterización enzimática de aislamientos patogénicos de *Beauveria bassiana* resistentes a diferentes tiempos de exposición a la luz ultravioleta, por el sistema comercial Api-zym, en el sustrato Saboureaud-dextrosa-agar. Lectura a los 30 min y 16 h de reacción.

Aislam.	Enzima	Fosfa		Lipasas		Proteasas		Fosfatasa		Galact	Gluco	Gluco
		Tiempo	Fosfa Alcal	Este C1	Este Lip	Lipa C14	Leuci arilam	Valina arilam	Fosf acid	Na-A-S-BI-	beta galac	beta gluco
9002	0 min	0-0	0-1	0-1	0-0	0-1	0-1	0-1	0-1	0-0	0-1	0-0
	10 min	0-0	1-2	0-1	0-0	0-1	0-1	0-1	1-1	0-0	0-0	0-1
	30 min	0-0	0-1	0-1	0-0	0-1	0-1	0-1	1-2	0-0	0-0	0-0
	60 min	0-0	1-3	0-2	0-1	0-2	0-1	5-5	5-5	1-2	1-1	0-1
9012	0 min	0-0	0-1	0-1	0-0	0-0	0-1	0-1	1-1	0-0	0-1	0-0
	10 min	0-0	0-0	0-1	0-0	0-0	1-1	1-1	1-2	0-0	1-2	0-0
9021	0 min	0-0	1-1	0-1	0-0	0-0	0-1	1-1	1-1	0-0	0-1	0-0
	10 min	0-0	1-1	1-1	0-0	0-0	0-1	2-2	2-2	0-0	1-2	0-0
9027	0 min	0-0	1-1	1-1	0-0	0-0	0-1	0-0	1-1	0-0	0-0	0-0
	10 min	0-0	0-0	1-1	0-0	0-1	0-1	2-3	1-1	0-1	0-0	0-0
	30 min	0-0	1-1	1-1	0-0	0-1	0-1	4-5	2-3	0-1	0-0	0-0
9205	0 min	0-0	1-1	1-1	0-0	0-0	0-1	2-2	2-2	0-0	0-1	0-0
	10 min	0-0	1-1	1-1	0-0	0-0	0-1	1-2	1-2	0-0	0-1	0-0
9212	0 min	0-0	0-1	0-1	0-0	0-0	0-1	0-0	0-1	0-0	0-0	0-0
	10 min	1-1	2-2	1-1	0-0	0-1	0-1	1-1	0-0	0-0	1-1	2-2
	30 min	1-1	1-2	1-1	0-0	0-1	0-0	0-1	1-1	0-0	2-2	2-2
9218	0 min	0-0	1-1	1-1	0-0	0-1	0-1	1-1	1-1	0-0	0-0	0-0
	10 min	0-0	1-1	1-1	1-1	1-1	0-1	2-3	1-2	0-0	1-1	0-0
	30 min	0-0	1-2	1-2	0-1	0-1	0-1	2-3	1-1	0-0	0-0	0-0
	60 min	0-0	2-3	1-2	0-1	0-1	0-1	2-3	1-2	0-0	0-0	0-0

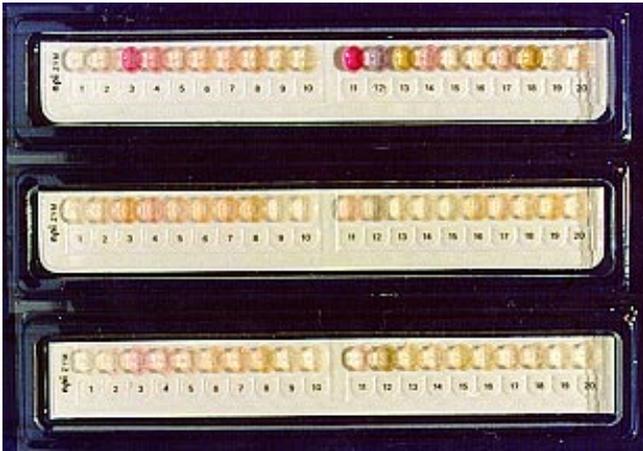


Figura 2. Actividad enzimática de un aislamiento del hongo *Beauveria bassiana* sometido a la luz ultravioleta durante diferentes tiempos de exposición.

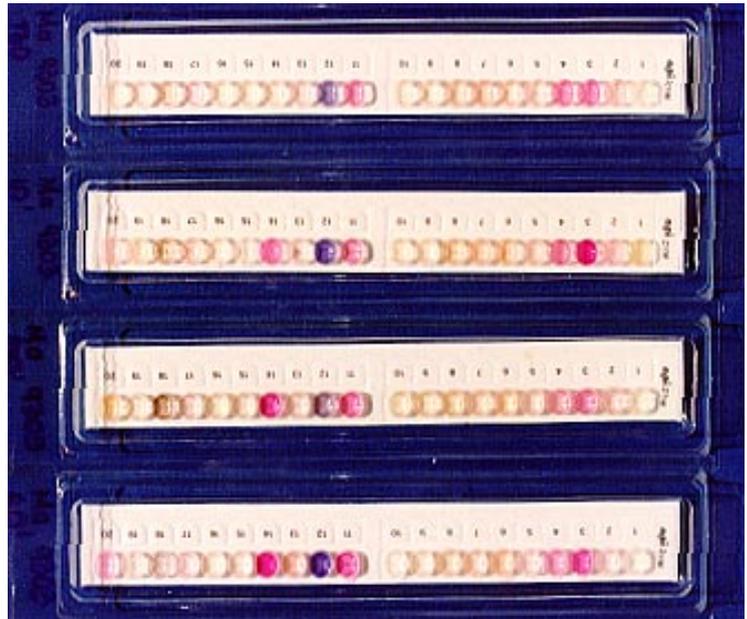


Figura 3. Actividad enzimática de un aislamiento del hongo *Metarhizium anisopliae* sometido a la luz ultravioleta durante diferentes tiempos de exposición.

Los aislamientos seleccionados en cuanto a su tolerancia al efecto de la luz ultravioleta, presentaron a su vez una mayor actividad enzimática; sin embargo, se observó en éstos una tendencia a la reducción de la viabilidad y patogenicidad sobre la broca del café. Es posible que mediante pases sucesivos de estos aislamientos a través de la broca se puedan potenciar nuevamente éstas últimas características, con-

servando su resistencia a la luz ultravioleta, con lo cual podrían formularse para ser evaluados en campo, en el control de la broca, tal como lo recomiendan Moore y Prior (8), quienes 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.

TABLA 8. Porcentaje de patogenicidad a *H. hampei* de aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* seleccionados por resistencia a la luz ultravioleta durante diferentes tiempos de exposición (Bioensayo en laboratorio).

AISLAMIENTO	PORCENTAJE DE PATOGENICIDAD (%)			
	TIEMPO DE EXPOSICIÓN A LA LUZ ULTRAVIOLETA			
	0 min	10 min	30 min	60 min
Bb 9002	83,3	47,5	47,5	42,5
Bb 9027	90,0	35	42,5	0
Bb 9212	86,7	50	52,5	0
Bb 9218	81,7	42,5	35,5	55
Ma 9303	92,5	59,4	57,5	60

AGRADECIMIENTOS

La realización de este estudio fue posible gracias al soporte financiero brindado por Colciencias y Cenicafé, dentro del marco del proyecto “Caracterización y obtención de cepas mejoradas de hongos entomopatógenos para el control de la broca del café”. Los autores expresan su agradecimiento al personal de la disciplina de Entomología, al auxiliar Silvio Marín y a los profesionales Alex E. Bustillo, Martha E. Londoño Z. y Alba Marina Cotes Prado.

LITERATURA CITADA

- BUSTILLO P., A.E. El hongo *Beauveria bassiana* como un componente en un programa de manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei*. In: Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología-SOCOLEN, 22. Santafé de Bogotá, julio 26-28 de 1995. Memorias. Santafé de Bogotá, SOCOLEN, 1995. p. 79-83.
- CALDWELL, M.M. Plant response to solar ultraviolet radiation. In: Lange, O.L.; Nobel, P.S.; Osmond, C.S.; Ziegler, H. (eds.). *Physiological plant ecology, I. Responses to the physical environment*. Berlín, Spowger-Verlag, 1981. p. 169-197. (Enciclopedia of plants physiology. Vol 12 A).
- DARNELL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D. *Biología celular y molecular*. Barcelona, Editorial Labor. 1988. p. 1067-1069.
- DECAZY, B. Descripción, biología, ecología y control de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferr.) In: 50 años de Cenicafé 1938-1988; Conferencias conmemorativas. Chinchiná, Cenicafé, 1990. p. 133-139.
- DEDUVE, C. *Lacélula viva*. Barcelona, Prensa Científica, 1988. p 331-422.
- GONZÁLEZ G., M.T.; POSADA F., F.J.; BUSTILLO P., A.E. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. *Cenicafé* 44 (3): 93-102. 1993.
- IGNOFFO, C.M.; BATZER, O.F. Microencapsulation and ultraviolet protectants to increase sunlight stability of an insect virus. *Journal of Economic Entomology* 64(4): 850-853. 1971.
- MOORE, D.; PRIOR, C. The potential of mycoinsecticides. *Biocontrol News and information* 14 (2): 31-40. 1993.
- VALDÉS D., B. E. 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%. Manizales, Universidad Católica. Facultad de Bacteriología, 1996. p 31-33. (Tesis: Bacteriología).
- 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
- VILAS BOAS, A.M.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; LUNA-ALVES-LIMA, E.A. Desenvolvimento e aperfeçoamento de inseticidas biológicos para o controle de pragas. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 35 (4): 749-761. 1992.