

# Evaluación en campo de un aislamiento del hongo *Beauveria bassiana* seleccionado por resistencia a la luz ultravioleta

Field evaluation of one isolate of the fungus *Beauveria bassiana* selected by resistance to the ultraviolet light

Sandra Patricia Tobar H.<sup>1</sup>  
Patricia Eugenia Vélez A.<sup>2</sup>  
Esther Cecilia Montoya R.<sup>2</sup>

## Resumen

La radiación solar, especialmente de tipo ultravioleta, constituye una de las mayores restricciones para el uso de los hongos entomopatógenos en el campo, dentro del programa de manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei*. En el presente estudio se realizó inicialmente en el laboratorio una selección de aislamientos del hongo *Beauveria bassiana* (*Bb*) por resistencia a la luz ultravioleta (LUV), para lo cual se evaluaron las variables unidades formadoras de colonia por ml (UFC/ml), crecimiento diametral de la colonia, actividad enzimática y % de mortalidad sobre la broca del café. El aislamiento seleccionado fue *Bb* 9218 resistente a períodos de exposición de 10, 30 y 60 minutos, el cual se evaluó frente a un testigo que consistía en el mismo aislamiento no irradiado, una formulación comercial con filtros de luz ultravioleta y un testigo absoluto. La etapa de campo se llevó a cabo en la subestación experimental "La Catalina", Departamento de Risaralda, en una zoca de café variedad Colombia, de 30 meses de edad, con una distancia de siembra de 2x1 m y con sombrero de plátano; las variables a evaluar fueron porcentaje de mortalidad de broca por acción del hongo y viabilidad del hongo en campo (UFC/ml) y tasa de reducción de la viabilidad del hongo en el tiempo 30 días, con respecto al tiempo inicial (1 hora). Durante el período del estudio se realizó un seguimiento de las variables exógenas humedad relativa, temperatura y radiación solar global. La parcela experimental estuvo constituida por 16 árboles y la unidad experimental por un árbol del cual se tomó 1 rama al azar de uno de los cuatro árboles centrales como parcela efecti-

va; se utilizaron 4 tratamientos, cada uno con 9 repeticiones. El efecto del hongo se evaluó bajo un modelo de análisis de clasificación simple y se utilizó la prueba de Tukey al 5% para la comparación de promedios. El análisis estadístico mostró efecto de tratamientos, a favor de *Bb* 9218 RLUV 60 min, el cual presentó los mayores porcentajes de mortalidad a través del tiempo de evaluación: 2,6 14,3 y 19,8% y mostró diferencias significativas con los demás tratamientos a excepción de los 30 días, tiempo en el cual fue estadísticamente igual al aislamiento no irradiado. La formulación comercial presentó los porcentajes más bajos de mortalidad durante el tiempo de evaluación. El testigo absoluto mostró promedios de mortalidad bajos en la mayor parte de los tiempos de evaluación, a excepción del tiempo 15 días, quizás por la presencia de focos del hongo como producto de aspersiones previas en la parcela experimental. El efecto del hongo *Bb* sobre la población de broca se evidenció a los 30 días de evaluación, cuando se presentaron porcentajes de mortalidad de broca del 9 al 20,6%. El análisis estadístico de la variable viabilidad mostró efecto de tratamientos destacándose *Bb* 9218 RLUV 60 min, con el mejor comportamiento a través del tiempo de evaluación. En relación con la tasa de reducción de la viabilidad entre el tiempo inicial y los 30 días de evaluación, todos los tratamientos presentaron tasas brutas de reducción superiores al 90% y el comportamiento fue estadísticamente igual; sin embargo, el tratamiento *Bb* 9218 RLUV 60 min, fue el que mostró la menor reducción de las UFC/ml en el tiempo final de evaluación. Los resultados obtenidos muestran la eficacia del hongo a nivel de campo por efecto de una sola aspersión con un aislamiento previamente seleccionado en laboratorio por resistencia a la LUV lo cual es un aporte importante al Manejo Integrado teniendo en cuenta que mostró los mayores valores de viabilidad a través del tiempo. El estudio confirma la importancia de asperjar cepas mejoradas con una mayor sobrevivencia en el campo y un mayor control sobre las poblaciones de broca dentro de un esquema de manejo integrado.

**Palabras claves:** Resistencia, Luz ultravioleta, Mortalidad, Viabilidad, Campo, *Beauveria bassiana*, *Hypothenemus hampei*.

## Summary

The solar radiation, specially the UV type, is one of the most limiting factors for the use of the entomopathogenic fungi in the field in an integrated management program of the coffee berry borer (cbb), *Hypothenemus hampei*. In the following study, a laboratory selection of isolates of the fungus *Beauveria bassiana* resistant to the UV light was made and the variables unit forming colonies per ml (UFC/ml), diametral colony growth, enzyme activity and pathogenicity to the cbb were evaluated. The selected isolate was *Bb* 9218 resistant to 10, 30 and 60 minutes of exposure to UV light, a control in which the same non-irradiated isolate was included, a commercial formulation with UV light filters and an absolute control. The field work was carried out in the Experimental Station "La Catalina", Department of Risaralda, in a zoca of Colombian coffee variety plants with an age of 30 months, a planting distance of 2x1 m. and plantain shadow. The evaluated variables were the mortality percentage of cbb, viability of the fungus in the field (UFC/ml) and reduction ratio of the viability of the fungus at 30 days of evaluation, with respect to the initial time (1 hour). The exogen variables temperature, relative humidity and global solar radiation were registered throughout the time of the study. The experimental unit comprised plots of sixteen trees in which the central tree was randomly taken as the effective plot; four treatments, each one with nine replicates were evaluated. The effect of the fungus was evaluated by means of an aleatorized analysis model and the 5% Tukey test was used to compare treatments means. The statistics analysis showed effect of the treatments which favoured the *Bb* 9218 RLUV 60 min treatment with the highest percentage of mortality throughout the evaluation time (2,6, 14,3 and 19,8%, respectively) and showed significant differences with the other treatment, except at 30 days of evaluation, when this treatment was statistically equal to the non-irradiated one. The commercial formulation presented the lowest mortality percentage throughout the evaluation times, except, the at 15 days, which can be explained by the presence of the fungus as a product of previous sprayings in the experimental plot. The effect of the fungus *Bb* on the cbb population was relevant at 30 days, when the mortality percentages were from 9 to 20,6%. The statistics analysis of the viability variable showed effect of the treatments, the best treatment among the evaluation time was *Bb* 9218 RLUV 60 minutes. As regarding the viability reduction ratio from the initial time to the last time of evaluation, all the treatments presented a net reduction ratio upper than 90%

1 [spobar@ucaticolamz.edu.co](mailto:spobar@ucaticolamz.edu.co), Universidad Católica de Manizales. A: A. 357 Manizales

2 Investigadores científicos I, Disciplinas de Entomología y Biometría respectivamente, [fcpv@cafedecolombia.com](mailto:fcpv@cafedecolombia.com); [fcemon@cafedecolombia.com](mailto:fcemon@cafedecolombia.com) A. A. 2427 Manizales.

and they were statistically equal; however, *Bb* 9218 RLUV 60 min showed the lowest reduction of the UFC/ml in the final time of evaluation. These results showed the cbb control by the effect of one field spray with an isolate of this fungus, previously selected in the laboratory by resistance to the UV light, which showed the highest viability percentages through the time. This study confirms the importance of spraying improved strains with higher survival in the field and higher control against broca populations within integrated pest management programs.

**Key words:** Resistance, UV light, Mortality, Viability, Field, *Beauveria bassiana*, *Hypothenemus hampei*

## Introducción

La broca del café *Hypothenemus hampei* es considerada la plaga más importante que afecta la caficultura en el mundo (Le Pelley 1968), ya que su ataque se dirige a la almendra, donde puede reproducirse. Los daños causados por la broca están representados en la pérdida de peso de las almendras, caída de frutos y alteración en la calidad de la bebida (Cárdenas 1991).

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 y factores abióticos tales como el clima, la temperatura, el agua, la humedad, la radiación solar, el suelo, los vientos y las sustancias químicas, las cuales determinan el éxito o el fracaso de un agente de control biológico en campo (Couch e Ignoffo 1981; De Bach 1987).

Debido a la necesidad de obtener patógenos más eficaces en 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 de estos microorganismos (Vilas Boas *et al.* 1992). 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 que 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 campo, por una mayor supervivencia y acción eficaz sobre el insecto al cual se dirige el control (Varela y Morales 1996).

Teniendo en cuenta que la exposición del hongo *Beauveria bassiana* (*Bb*) al efecto de la luz ultravioleta modifica su virulencia, esporulación y viabilidad, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar en condiciones de campo la via-

bilidad y la virulencia sobre la broca del café de un aislamiento del hongo, seleccionado previamente por resistencia a la luz ultravioleta

## Materiales y Métodos

**Selección de aislamientos.** Se realizó una selección inicial, partiendo de 9 aislamientos del hongo *Beauveria bassiana*, los cuales presentaban porcentajes de mortalidad a la broca del café superiores al 80% (Tabla 1). Para tal propósito, se utilizó la metodología descrita por Vilas Boas *et al.* (1992), con algunas modificaciones. De esta manera, se prepararon suspensiones de 1 ml con una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/ml, se sometieron a 10, 30 y 60 minutos de exposición a la luz ultravioleta, en una cámara de flujo laminar con una longitud de onda de 254 nm y a una distancia de 25 cm. Luego de la irradiación, se evaluaron las variables: unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) o propágulos viables del hongo, crecimiento diametral diario de la colonia durante 29 días, actividad enzimática en el sistema comercial Api Zym y porcentaje de mortalidad sobre la broca del café, en cada uno de los aislamientos irradiados y en el testigo no irradiado. 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 una formulación comercial con filtros de luz ultravioleta, Conidia<sup>®</sup> WG de Agrevo<sup>2</sup>.

Con el fin de evaluar la resistencia a la luz ultravioleta del hongo presente en la formulación comercial, la cual según las especificaciones de la casa comercial, contiene filtros de luz ultravioleta que retardan el deterioro de las esporas por efecto de la radiación solar<sup>2</sup>, se realizaron pruebas de resistencia con el método de UFC/ml, estandarizado por Vélez y Montoya (1993) en el medio selectivo para el desarrollo de *Bb* (Rivera y López 1992). Para esta evaluación, se tomaron tres lotes de la formulación correspondientes a los períodos de Marzo (lote # 0301110), Abril (lote # 0301104) y Mayo (lote # 0301105) de 1996 y de cada uno de ellos, se aisló el hongo *Bb* para

someterlo al efecto de la LUV. Paralelamente, el lote # 0301110, correspondiente a mayo/96, se preparó según las indicaciones de la casa comercial y se tomaron alícuotas de 1 ml de la formulación en beakers de 50 ml, según el método descrito previamente, con el propósito de ser sometidas a irradiación en una cámara de flujo laminar con una longitud de onda de 240 nm (Tobar 1997).

**Etapas de campo.** Se llevó a cabo en la Subestación Experimental "La Catalina", vereda El Retiro, municipio de Pereira, ubicada a 1350 m.s.n.m., en un lote de café variedad Colombia (zoca), conformado por 1200 árboles de 30 meses de edad, con una distancia de siembra de 2x1 m y con sombrío de plátano.

Los tratamientos evaluados fueron: *Bb* 9218 no expuesto a la luz ultravioleta (LUV), *Bb* 9218 resistente a 60 minutos de exposición a la LUV, formulación comercial con filtros de luz ultravioleta "Conidia<sup>®</sup> WG" de Agrevo y un Testigo absoluto, el cual correspondía al hongo encontrado en forma natural.

**Infestación artificial.** La parcela experimental estuvo constituida por 16 árboles y la unidad experimental por un árbol del cual se tomó 1 rama al azar de uno de los cuatro árboles centrales como parcela efectiva; de este árbol se seleccionó 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, constituida por una estructura cilíndrica, construida con alambre #10 de 40 cm de largo y 20 cm de diámetro y cubierta con tela de muselina blanca, sujeta a la rama con hilo de polipropileno (Villalba *et al.* 1995).

Una vez instaladas las mangas, se realizó la infestación con aproximadamente 150 brocas hembras recién emergidas, las cuales fueron suministradas por la Unidad de Cria de Parasitoides de Cenicafé y transportadas en recipientes plásticos de fotografía con trocitos de papel para evitar el canibalismo. En el momento de realizar la infestación en el interior de la manga se utilizó un colador con el fin de separar las brocas de los trocitos de papel.

**Tabla 1.** Relación de aislamientos de *Beauveria bassiana* seleccionados para el estudio con porcentajes de mortalidad sobre la broca del café superiores al 80%

AISLAMIENTO	% MORTALIDAD	HOSPEDANTE			
		Género	Especie	Orden	Familia
Bb 9301	93.3	<i>Rhynchophorus</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

**Equipo de Aspersión.** Para la aspersión, realizada al cabo de 48 horas de la infestación artificial, se retiró la manga de la rama y se descartaron en un balde con insecticida las brocas que no habían perforado los frutos y se encontraban aún en la manga. Se partió de un porcentaje de infestación por broca en las ramas seleccionadas superior al 50%. La aspersión se realizó con un equipo de presión neumática, Calimax 10 cafetera, con recipientes intercambiables de un litro de capacidad, utilizando una boquilla HC3, con un flujo de 190 cc/min, a una presión de 40 lbs/pulg<sup>2</sup>.

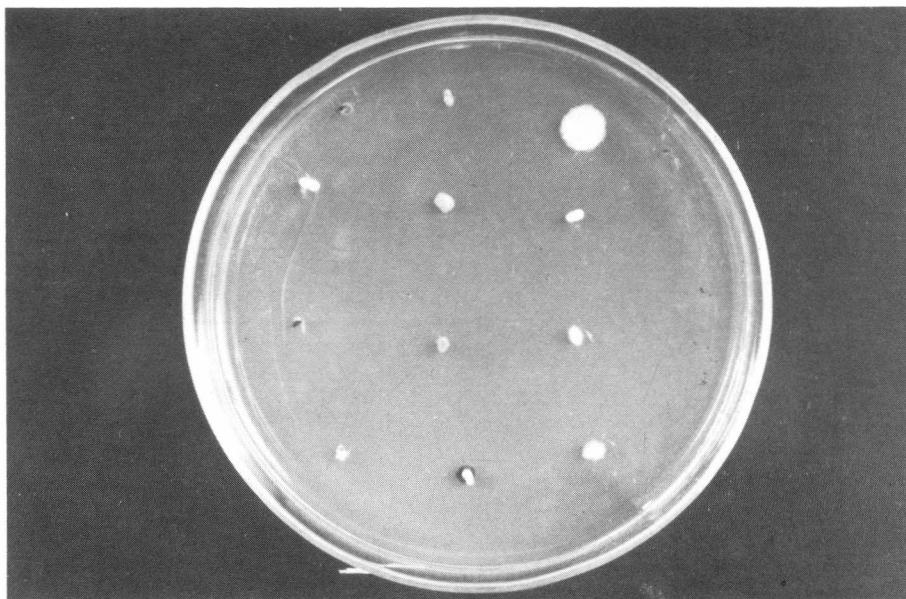
Se estableció un tiempo de aplicación de 18 segundos, para un volumen total de 57 cc de preparación del hongo por árbol, con una concentración de  $5 \times 10^8$  esporas/árbol de cada uno de los tratamientos, a excepción del tratamiento conformado por la formulación comercial el cual se preparó según las indicaciones de la etiqueta. Una vez realizada la aspersión en el árbol, se procedió a cubrir nuevamente la rama con la manga, para ser retirada posteriormente en cada tiempo de evaluación.

Cada uno de los tratamientos con el aislamiento de *Bb* 9218 fue cultivado en arroz en forma artesanal (Antía *et al.* 1992) 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 y se ajustó con agua a un volumen final de 10 l.

**Evaluación.** Se consideró un período de evaluación de un mes, una vez realizada la aspersión de los diferentes tratamientos, evaluando semanalmente (8, 15 y 30 días), la mortalidad de broca por efecto de los diferentes tratamientos del hongo *Bb*.

**Mortalidad.** Al momento de la evaluación, se retiró del árbol la rama infestada (unidad experimental), se tomaron todos los frutos brocados, se disectaron y se evaluó en éstos la mortalidad causada por *Bb*. Todas las brocas que en el momento de la evaluación se encontraban muertas, pero no presentaban evidencia del hongo, fueron sometidas a un proceso de desinfestación con hipoclorito de sodio comercial, durante dos minutos, se removió el exceso de éste con toallas de papel y posteriormente, se depositaron en cajas de petri con agar agua acidificado (ácido láctico al 44%) y se llevaron a incubación a 21°C durante 8 días. Al cabo de este período se evaluó, en forma macroscópica y estereoscópica, la esporulación del hongo en los insectos. De esta forma, se evidenció el hongo como responsable en la etiología de la infección al insecto (Fig 1).

**Viabilidad.** Una vez realizada la aspersión de los tratamientos, se procedió a evaluar la viabilidad del hongo en campo, es decir, su capacidad de sobrevivencia a través del tiempo. Para esta evaluación, se tomaron al azar, de



**Figura 1.** Esporulación del hongo *Beauveria bassiana* sobre adultos de broca en medio de cultivo

cada árbol asperjado, 60 frutos verdes no perforados por broca y se depositaron en botellas con 50 ml de glicerol al 10%, para la evaluación de viabilidad de acuerdo con el método sugerido por Vélez y Montoya en 1993. En cada uno de los tiempos de evaluación se realizaron 9 repeticiones por tratamiento.

El porcentaje de eficacia para cada uno de los tratamientos en cada una de las evaluaciones con respecto al testigo absoluto se determinó según la fórmula de Schneider-Orelli (Ciba Geigy 1981), la cual se aplica sólo cuando la infestación es uniforme al comienzo del ensayo.

**Diseño experimental.** El efecto 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 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 variable 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

Los aislamientos del hongo *Bb* 9218 y 9002 se seleccionaron por presentar resistencia a todos los períodos de exposición a la luz ultravioleta evaluados. Sin embargo, luego de la irradiación, el aislamiento *Bb* 9218 mostró

una mayor actividad enzimática y una mayor virulencia sobre la broca del café (60%) que el aislamiento 9002, por lo cual *Bb* 9218 fue seleccionado para la prueba de campo.

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

La formulación comercial presentó los porcentajes más bajos de mortalidad en todos los tiempos evaluados. El testigo absoluto mostró promedios de mortalidad bajos en la mayoría de los tiempos de evaluación, a excepción de los 15 días, en el cual se presentaron diferencias significativas a favor de éste, debido quizás a la presencia de focos del hongo en el lote experimental, tal vez como producto de aspersiones pasadas. En la última evaluación no se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos *Bb* 9218 no irradiado y *Bb* 9218 RLUV 60 min, pero sí de éstos, con los tratamientos formulación comercial y testigo absoluto.

El porcentaje de mortalidad total de broca durante todo el tiempo de evaluación fluctuó entre 6,5 y 36 % y el porcentaje de mortalidad por acción del hongo *Bb* estuvo en un rango entre 1,3 y 20,6% (Tabla 2). El efecto real del hongo en el control de poblaciones de la bro-



ca del café pudo evidenciarse en el último tiempo de evaluación (30 días), en el cual el tratamiento Bb 9218 testigo presentó un porcentaje de brocas muertas del 27,5%, del cual un 20,6% correspondió a muerte por efecto de Bb, lo que equivale a un 74,9% de mortalidad de broca causada por el hongo; el tratamiento Bb 9218 RLUV 60 min. presentó un porcentaje de mortalidad de broca del 29,5%, del cual el 19,8% fue por efecto del hongo, lo que equivale a un 67,1% de mortalidad de broca causada por Bb; la formulación comercial presentó un 17,9 de mortalidad, del cual el 9% fue por acción del hongo, lo que equivale a un 50,2% de mortalidad causada por éste y el tratamiento testigo absoluto presentó una mortalidad del 24,1%, con un 12,5% por efecto del hongo, lo que equivale al 51,8% de mortalidad causada por Bb.

La evaluación del porcentaje de eficacia para cada uno de los tratamientos en todos los tiempos se ilustra en la tabla 3, en la cual se presentan los promedios y la variación. Los valores promedio fluctuaron entre 1,1 y 22,7, con el máximo porcentaje de eficacia para el tratamiento Bb 9218 resistente a la luz ultravioleta, en la última evaluación. Cabe anotar que para el análisis de varianza de la variable porcentaje de eficacia ésta fue transformada a:  $(\% \text{ eficacia} + 1)^{1/2}$ .

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 Bb, 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, según el método recomendado por Cenicafé (Antía *et al.* 1992), 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 del hongo *Beauveria 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 (Bustillo *et al.* 1991).

Trabajos posteriores en los cuales se realizó un seguimiento acerca de la epizootiología del hongo Bb, es decir, la evolución de la infección de éste sobre la broca, en dosis de  $1 \times 10^8$  esporas/árbol, demostraron que a medida que se dispersó la broca espacial y temporalmente, se diseminó el hongo, obteniendo al cabo de ocho meses de evaluación, niveles de in-

**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 a través del tiempo de evaluación, en condiciones de campo

TRATAMIENTOS	TIEMPOS DE EVALUACIÓN								
	8 Días			15 Días			30 Días		
	TB	TBM%	BMH%	TB	TBM%	BMH%	TB	TBM%	BMH%
Bb 9218 testigo	822	9,3	1,9 ab	801	18,3	8,1 c	711	27,5	20,6 a
Bb 9218 60 min	903	8,9	2,6 ab	860	27,3	14,3 b	807	29,5	19,8 a
F. comercial	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  
 BM: Total de brocas muertas  
 BMH: Brocas muertas por *Beauveria bassiana*

**Tabla 3.** Porcentaje medio de eficacia con respecto al testigo de los tratamientos a base del hongo *B. bassiana*

TRATAMIENTO	EVALUACIÓN (Días)	% EFICACIA	
		X	C.V.
Bb 9218 testigo	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
Formulación comercial	8	1,12	64,44
	15	7,29	79,28
	30	6,69	52,90

**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

TRATAMIENTOS	TIEMPOS DE EVALUACIÓN								
	8 Días			15 Días			30 Días		
	TB	TBM%	BMH%	TB	TBM%	BMH%	TB	TBM%	BMH%
Bb 9218 testigo	822	9,3	1,9 ab	801	18,3	8,1 c	711	27,5	20,6 a
Bb 9218 60 min	903	8,9	2,6 ab	860	27,3	14,3 b	807	29,5	19,8 a
F. comercial	881	6,5	1,3 b	933	19,7	6,2 c	698	17,9	9,0 c
Testigo absoluto	1316	6,5	2,1a	1301	36,0	20,3 a	740	24,1	12,5 b

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

**Tabla 5.** Registro de las variables exógenas, temperatura (°C), humedad relativa (%) y radiación solar global (Wh/m<sup>2</sup>) a través del tiempo de evaluación

VARIABLES EXÓGENAS	TIEMPO EVALUACIÓN			
	1 HORA	8 DIAS	15 DIAS	30 DIAS
TEMPERATURA (°C)	21	20	20	21
HUMEDAD RELATIVA (%)	85	86	80	83
RADIACIÓN SOLAR GLOBAL (Wh/m <sup>2</sup> )	13673	45618	80136	139177

fección superiores al 75% (Bustillo *et al.* 1991).

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

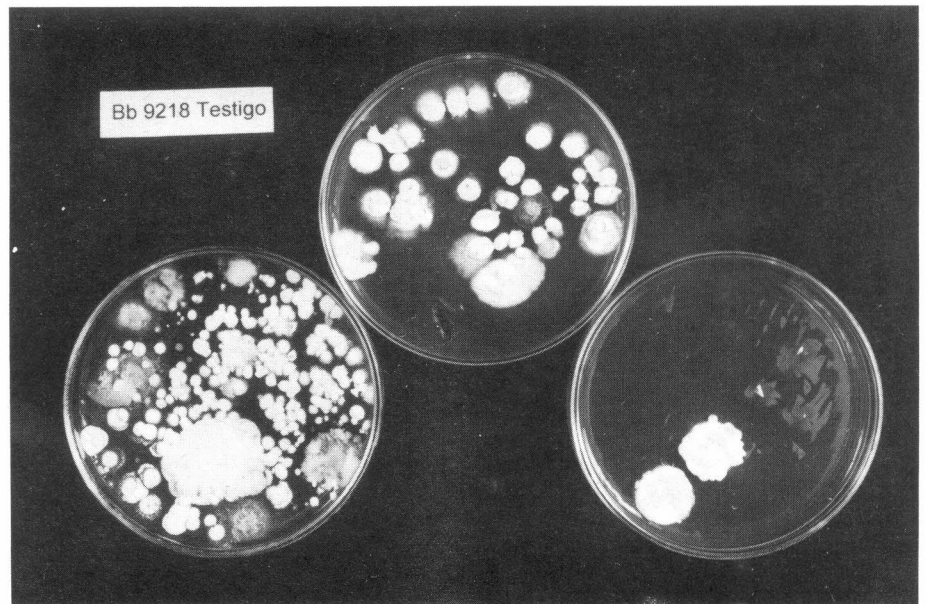
Con relación a la variable tasa de reducción de la viabilidad a los 30 días de evaluación, todos los tratamientos presentaron tasas brutas de reducción de UFC/ml superiores al 90% y el comportamiento fue estadísticamente igual. Cabe resaltar, que el tratamiento *Bb* 9218 RLUV 60 min, fue el que mostró la menor reducción de las UFC/ml al final de la evaluación (Figs. 2-5).

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, se presentó una esporulación incipiente del hongo en el medio selectivo.

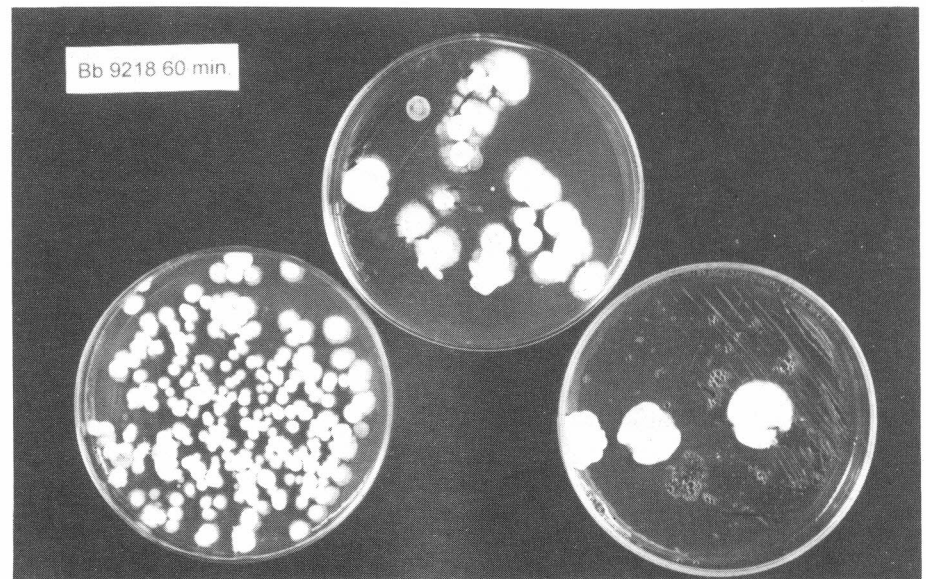
La tabla 5 ilustra el promedio de las variables exógenas: temperatura, la cual fluctuó entre 19,95°C y 20,69°C, de modo que fue relativamente constante, la humedad relativa con fluctuaciones entre 79,53% y 86,12% y la radiación solar global con un acumulado de 139176, 80 horas luz, a través del estudio. Estos rangos de temperatura y humedad relativa corresponden a los registrados para el óptimo desarrollo de este hongo entomopatógeno en condiciones de campo (Domsch *et al.* 1980) y explican posiblemente su respuesta favorable, en cuanto al control de la broca en las condiciones climáticas prevalentes. El número reducido de puntos muestrales no permitió evaluar la asociación de estas variables exógenas con las variables viabilidad del hongo y mortalidad de broca.

## Discusión

En general, se observó un aumento de poblaciones de broca atacada por el hongo *Bb* a tra-



**Figura 2.** Unidades formadoras de colonia por mililitro del tratamiento *Beauveria bassiana* 9218 testigo, al cabo de 8 días de la aspersión en campo



**Figura 3.** Unidades formadoras de colonia por mililitro del tratamiento *Beauveria bassiana* 9218 resistente a 60 minutos de exposición a la luz ultravioleta, al cabo de 8 días de la aspersión en campo.

vés del tiempo de evaluación; sin embargo, el número medio de UFC/ml del hongo en cada uno de los tratamientos se redujo en cada uno de los tiempos evaluados. El incremento de la población de broca atacada por el hongo *Bb* se explica probablemente por el efecto del potencial de inóculo del hongo presente en los insectos afectados y su distribución a otras poblaciones de broca, es decir, el insecto por sí mismo, constituye la mejor fuente de

inóculo para dispersión de este agente biológico. Esto coincide con los estudios de González *et al.* (1993), en los cuales se afirma que el inóculo de una broca infectada con el hongo *Bb* es equivalente al aplicado por árbol en las aspersiones con las formulaciones comerciales, lo cual indica el carácter autodiseminativo del hongo una vez se establece en un cafetal. Así mismo, Vélez y Montoya (1993), en estudios tendientes a eva-

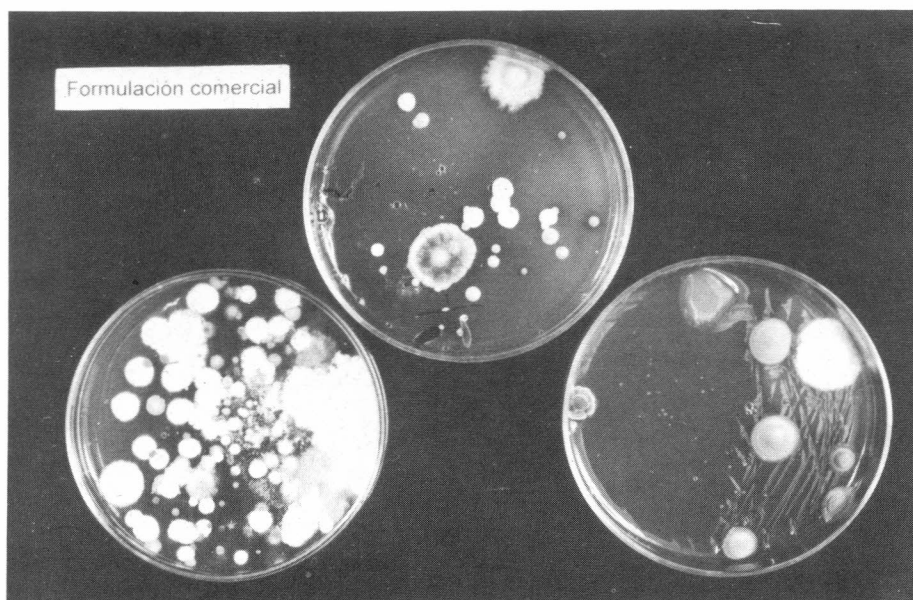


Figura 4. Unidades formadoras de colonia por mililitro del tratamiento formulación comercial, al cabo de 8 días de la aspersión en campo.

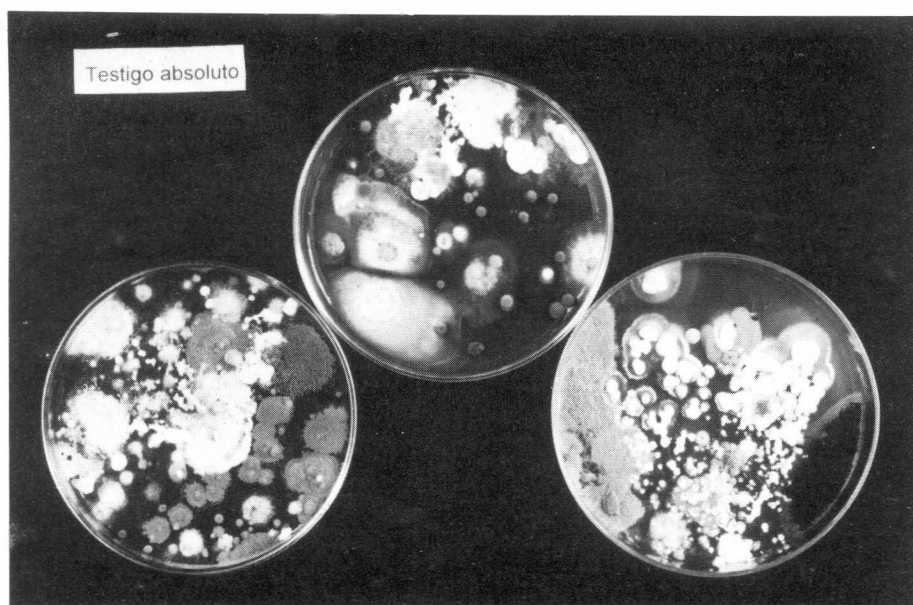


Figura 5. Unidades formadoras de colonia por mililitro del tratamiento testigo, al cabo de 8 días de la aspersión en campo.

luar la supervivencia de los hongos *Bb* y *Metarhizium anisopliae* en agua más carrier, según la tecnología recomendada por Cenicafe 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 registra-

dos en el tiempo inicial. Esta respuesta confirma lo expresado anteriormente, en el sentido que la broca contribuye a la supervivencia y dispersión del hongo en el ecosistema cafetero.

Moore y Prior (1993) 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 campo. En el presente estudio, se

seleccionó el aislamiento *Bb* 9218 por su resistencia a 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 a 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 (De Duve 1988), conservando su resistencia a la luz ultravioleta e incrementando su potencial patogénico, al ponerse en contacto con el hospedante en condiciones de campo.

De Duve (1988) sostiene que la naturaleza de los mecanismos de reparación dependen de la lesión, muchas veces la luz solar se ve obligada a reparar su propio daño con la ayuda de una enzima especial fotorreactiva, que separa los dímeros de timina inducidos por la luz ultravioleta, pero en la mayoría de los casos, la lesión resulta irreversible y debe eliminarse. De ello se encargan las glicosilasas que cortan las bases alteradas o las endonucleasas que cortan el segmento de oligonucleótidos donde se encuentra la parte alterada, luego una polimerasa hace posible el ensamblamiento de una nueva secuencia correcta y una ligasa realiza el empalme.

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 (Darnell *et al.* 1988).

De acuerdo con el concepto de la Biotecnología, en el cual se modifica la actividad de los microorganismos para ser usados eficientemente por el hombre, 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, se muestran promisorios en cuanto a la utilización de este agente biológico, previamente seleccionado en laboratorio por resistencia a la luz ultravioleta, como una medida de control en programas de manejo integrado de la broca, teniendo en cuenta que dicha selección permitió una mayor eficiencia del hongo *Bb*, con respecto al testigo no expuesto al agente mutagénico. En el proceso de manipulación adecuada de un microorganismo para su uso eficiente, al aislamiento seleccionado deben incorporarse otras características, tales como una alta capacidad esporulativa, germinativa, tolerancia a altas temperaturas, compatibilidad con productos químicos, etc., previo al proceso de formulación y aspersión en el campo, factor que determinará finalmente el éxito en su acción.

Para concluir, esta respuesta corresponde a una sola aspersión del hongo en dicha localidad, en la cual se observó un incremento en la mortalidad del insecto por efecto del hongo y una mayor sobrevivencia en el campo de éste a través del estudio. Es posible que aspersiones frecuentes de este agente biológico y mayores dosificaciones 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 personal de apoyo de la subestación experimental "La Catalina", a la Disciplina de Agroclimatología, 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 y a los profesionales Diógenes Villalba G. Alex E. Bustillo P, Pablo Benavides M. y Beatriz Elena Valdés D. por su valiosa colaboración en el desarrollo del estudio y en la corrección del documento.

### Bibliografía

- ANTIA L.O.P.; POSADA F. F.J.; BUSTILLO P, A.E.; GONZALEZ G, M.T. 1992. Producción en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. Cenicafé. (Avances técnicos Cenicafé N° 182). Chinchiná (Colombia).
- BUSTILLO P. A.E.; CASTILLO, H.; VILLALBA, D.A.; MORALES, E.C.; VELEZ, P.E. 1991. Evaluaciones de campo con el hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. *Hypothenemus hampei* en Colombia. ASIC, 14e. Colloque, San Francisco, EE.UU., p. 679-686.
- CARDENAS, R.M. 1991. La broca del café *Hypothenemus hampei* en Colombia. Sociedad Colombiana de Entomología - SOCOLEN. p 106-118 (miscelánea N°18).
- CIBA-GEIGY S.A. 1981. Manual para ensayos de campo en protección vegetal. Segunda Edición. Werner Funtener, 204 p.
- COUCH, T.L.; IGNOFFO, C.M. 1981. Formulation of insect pathogens. In: BURGESS, H.D. Ed. Microbial control of pest and diseases 1970-1980. London Academic Press. p 621-634.
- DARNELL, J.; LODISH, H. ; BALTIMORE, D. 1988. Biología celular y molecular. Barcelona, Editorial Labor. p 1067-1069.
- DE BACH, P. 1987. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. México, Editorial Continental. p. 31-46.
- DE DUVE, C. 1988. La célula viva. Barcelona, Prensa científica, Editorial Labor. p 331-422.
- DOMSCH, H.K.; GAMS, W.; ANDERSON. 1980. Compendium of soil fungi V.I. Academic Press. p 136-140.
- GONZALEZ G, M.T.; POSADA F, F.J. ; MONTES, L.M. 1993. Potencial de inóculo de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. producido sobre *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Resúmenes XX congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología (SOCOLEN) Cali, julio 13-16. p 120.
- LE PELLEY, R.H. 1968. Pest of coffee. Londres, Longmans, Green and Co. p. 590.
- MOORE, D.; PRIOR, C. 1993. The potential of mycoinsecticides. Biocontrol News and information. 14(2): 31-40.
- RIVERA M. A.; LÓPEZ N, J.C. 1992. Medio selectivo para aislamiento de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. a partir de muestras del suelo. Resúmenes XIX congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología (SOCOLEN) Manizales, julio 15-17. p 77.
- TOBAR H. S.P. 1997. 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. 82 p. (Tesis Especialización en Microbiología).
- VARELA, A.; MORALES, E. 1996. Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. Journal of Invertebrate Pathology 67: 147-152.
- VÉLEZ A, P.E.; MONTOYA R, E.C. 1993. Supervivencia del hongo *Beauveria bassiana* bajo radiación solar en condiciones de laboratorio y campo. CENICAFE 44 (3): 111-122.
- VILLALBA, G.D.D.; BUSTILLO, P.A.E.; CHAVEZ, C.B. 1995. Evaluación de insecticidas para el control de la broca del café en Colombia. Cenicafé (Colombia) 46 (3): 152-153.
- VILAS BOAS, A.M.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; LUNA-ALVES-LIMA, E.A. 1992. Desenvolvimento e aperfeiçoamento de inseticidas biológicos para o controle de pragas. Arguinos de Biologia e Tecnologia 35 (4): 749-761.