

Preservación de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin (Moniliales: Moniliaceae) contra la broca del café en diferentes sistemas

Preservation of *Beauveria bassiana* (Balsam) Vuillemin (moniliales: moniliaceae) pathogenicity against the coffee borer in different systems

T. Bahamón¹, E. Aycardi², J. Orozco³, P. Marín⁴, A. Bustillo⁵

RESUMEN

Este trabajo tiene como objetivo evaluar técnicas de preservación de patogenicidad en el laboratorio, que permitan almacenar por tiempos prolongados cultivos de *B. bassiana* de manera que se puedan utilizar en la preparación de un producto industrial sin tener que recurrir tan frecuentemente a pases sobre poblaciones de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleóptera: Scolytidae) para mantener su efectividad en el control de esta plaga. Existen numerosos trabajos sobre la preservación de la viabilidad, pero prácticamente son inexistentes los trabajos sobre la preservación de la patogenicidad de *B. bassiana*. Se evaluó la viabilidad de *B. Bassiana*, en comparación con su patogenicidad, en cultivos madres sometidos a diferentes temperaturas de preservación con silica gel anhidra y aceite mineral para refrigeración, glicerol y dimetilsulfóxido para preservación en nitrógeno líquido y leche descremada al 10% y 20%, leche descremada con inositol al 5%, y dos medios de cultivo de un centro de referencia internacional como protectores para la preservación por liofilización. Durante 24 semanas, cada 6 semanas se realizaron las evaluaciones. En el análisis inferencial, donde se compararon los protectores de conservación y sistemas de conservación versus patogenicidad y viabilidad, se encontró que sí existen diferencias significativas y que los protectores influyen en la preservación de la patogenicidad, principalmente.

Palabras clave: liofilización, conservación, congelación, protectores, *Hypothenemus hampei*.

ABSTRACT

The objective of this study is to find preservation techniques of *Beauveria bassiana* pathogenicity in the laboratory. Long term storage of *B. bassiana* cultures is very important to prepare industrial products. Preservation techniques for pathogenicity would replace the need to pass *B. bassiana* spores frequently in the target insect. Studies on *B. bassiana* pathogenicity are almost nonexistent. Viability of *B. bassiana* was evaluated in comparison with pathogenicity when subjected to different preservation temperatures with various protectors. The most succesful procedures were silica gel and mineral oil in refrigeration; glicerol and dimethylsulfoxide in liquid nitrogen; liophilization with skim milk at 10% and 20% and skim milk with inositol at 5%. The tests were carried our during 24 weeks at 6 weeks intervals. A monosporic *B. bassiana* culture (*Bb. 9620*) isolated by Cenicafé research center was used for the study. The mean value for the preservation of pathogenicity was influenced by the protectors used.

Key words: Liophilization, freezing, protectors, *Hypothenemus hampei*, conservation.

* Bacterióloga M.Sc. Unidad de Hongos. Vecol S.A. Apartado Postal 7476. Bogotá.
** Ph.D. Gerencia de Investigación y Desarrollo. Vecol S.A. Apartado Postal 7476. Bogotá.
*** Ingeniero Agrónomo. Unidad de Hongos. Vecol S.A. Apartado Postal 7476. Bogotá.
**** Bacterióloga. Disciplina de Entomología, Cenicafé. Apartado Aéreo 2427 Manizales.
***** Ph.D. Disciplina de Entomología, Cenicafé. Apartado Aéreo 2427 Manizales. Colombia.

INTRODUCCIÓN

El hongo *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin es considerado apto para regular naturalmente poblaciones de la broca del café *Hypothenemus hampei*, mostrando alto poder residual en determinados rangos de humedad y temperatura; asegurando de esta manera un control característico sobre este insecto.

Para la producción industrial de este hongo, se necesita mantener durante el mayor tiempo posible la capacidad entomopatógena del mismo, de manera que las esporas sometidas a todo el proceso de producción y convertidas en un producto terminado, conserven las características vitales que lo hacen eficaz en condiciones de campo y adecuado para el control de la broca del café.

Actualmente los centros de referencia internacionales y bancos de cepas de hongos, como American Type Culture Collection (ATCC) e International Mycological Institute (CAB IMI), conservan la viabilidad de los hongos utilizando primordialmente la liofilización o, algunos, la conservación a temperatura ambiente (Smith y Onions 1994).

Ninguno de los métodos utilizados garantiza la patogenicidad en el huésped primario, puesto que sólo se garantiza que el hongo pueda ser aislado nuevamente de la muestra que se sometió al sistema de conservación determinado (Dhingra y Sinclair 1995; Simione y Brown 1991).

De los trabajos realizados en Cenicafé, desde 1988, año en que entró la broca al país y se empezó a controlar este insecto con *B. bassiana*, se han identificado variaciones de este microorganismo en cuanto a su viabilidad en su capacidad entomopatógena contra la broca del café *H. hampei* (González *et al.* 1993).

Estas variaciones hacen que las esporas utilizadas como agrobiológicos para controlar la broca no siempre tengan la misma efectividad patogénica en campo; de ahí que el control biológico como parte del Manejo Integrado de Plagas sea inconstante y poco efectivo, y arroje como consecuencia final, pérdidas para la economía cafetera (Bustillo 1998).

Actualmente se deben hacer pases sobre el insecto cada veinte días para mantener la patogenicidad del hongo (González *et al.* 1993).

El presente trabajo tiene como objetivo determinar el sistema de conservación que logre preservar la patogenicidad del hongo *B. bassiana* contra *H. hampei*, durante un tiempo mayor que el de los métodos biológicos tradicionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de conservación

Intervalos de evaluación: semana cero, seis, doce, dieciocho, veinticuatro o seis meses.

Diseño experimental

Se utilizaron bloques completos aleatorios. La principal fuente de variación son las diferencias en el tiempo de preparación de las muestras ya que no se pueden montar simultáneamente por razones logísticas. Para la evaluación de los datos obtenidos se analizó la varianza de dos factores con una muestra por grupo. Se utilizó el paquete estadístico SSPS/PC Versión 7.0 para Windows 95. Para el análisis de los resultados de las distintas condiciones experimentales, se utilizaron herramientas de estadística inferencial factorial a una entrada (ANOVA). El nivel de significancia establecido para las pruebas fue $p < 0.05$.

Para este estudio se prepararon 15 muestras para cada uno de los 13 tratamientos, preservativos y temperaturas de conservación (cuadro 1). De estas 15 muestras se tomaron al azar 5 frascos para la evaluación de la viabilidad y del porcentaje de patogenicidad en cada período. De manera que para cada fecha de evaluación se examinaron 65 muestras y para el total del estudio se evaluaron 325 muestras.

Obtención del cultivo madre de *B. bassiana* monoespórico y patogénico

Se preparó un cultivo de *B. bassiana* a partir de la cepa Cenicafé Bb. 9620 monoespórica con patogenicidad sobre broca del café *H. hampei* del 100%, luego de dos pases sobre este insecto.

Origen del hongo. El aislamiento monoespórico se obtuvo a partir de un aislamiento multiespórico 9205 de *B. bassiana* reactivado, procedente del hospedante *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae), cultivado en Agar Sabouraud Dextrosa (ASD) acidificado. La edad del cultivo fue 30 días.

Cuadro 1. Determinación de variables.

Variables independientes	Aceite mineral y silica gel a 4°C, -20°C y -70°C; glicerol al 10% y dime-tilsulfóxido al 5% a -196°C (nitrógeno líquido); leche descremada al 10% y al 20%, leche descremada al 10% más inositol al 5%, Medio ATCC 20 y ATCC 18 en liofilización.
Variables dependientes	Viabilidad y porcentaje de patogenicidad.
Variables fijas	Propágulos en una concentración de 1×10^9 propágulos / ml.

Propagación del cultivo madre monoespórico de *B. bassiana*

A partir de las cajas de Petri donde la cepa *Bb. 9205* multiesporica creció y fue pasada sobre broca dos veces, y denominada (*B.b. 9620*), se tomó toda la población presente en las cajas y se hizo una suspensión en 500 ml de agua destilada con Tween 80® estéril al 0.1% hasta una concentración final de 1×10^8 propágulos/ml. Se distribuyeron 3 ml de la suspensión del hongo en cada uno de los tubos de ensayo de 15 ml de capacidad, que contenían 8 ml de ASD estéril e inclinado. Los tubos se llevaron a incubación por 20 días a 27°C.

Cosecha de los cultivos madre de *B. bassiana*

Luego del período de incubación, se encontró completa esporulación del hongo. Se lavó el contenido de cada tubo con la suspensión de Tween 80® al 0,1% preparado en agua destilada estéril.

La evaluación de la viabilidad y patogenicidad de esporas de *B. bassiana* se llevaron a cabo de acuerdo con la metodología determinada por Cenicafé (Cenicafé 1997).

Sistemas de preservación

Conservación en aceite mineral a 4 °C, -20 °C y -70 °C. Se utilizó aceite mineral denominado Markol 52® (ESSO Colombiana). Fue vertido el ASD esterilizado y fundido en un volumen de 8 ml, en forma inclinada, en cada frasco McCartney. Después se preparó la suspensión de propágulos a partir de los cultivos de hongo esporulado y propagados durante 20 días. Se tomaron 3 ml de esta

suspensión que contenía 1×10^9 propágulos/ml y se depositaron en cada frasco McCartney sobre el medio de cultivo ASD. Los frascos se llevaron a incubación durante 30 días a 27°C. Al cabo de este tiempo, se tomaron 180 frascos con hongo esporulado y bajo condiciones de esterilidad, se agregó a cada frasco 2 ml de aceite mineral Markol 52®.

Se llevó a preservación a temperatura entre 4 y 8 °C en nevera y a -20 °C y -70 °C, en congelador (Smith y Onions 1994). Los frascos McCartney que debían ser evaluados fueron retirados de la nevera y del congelador a -20 °C y a -70 °C, se dejaron descongelar y luego con una jeringa con agua destilada estéril se lavó y se retiró el exceso de aceite mineral del cultivo.

Posteriormente, se retiró con espátula estéril el hongo libre de aceite y se depositó en frasco Schott tapa rosca de 500 ml. A este frasco se le adicionó medio Goral nutritivo (Goral 1973) en un volumen de 200 ml y se incubó durante 3 días mínimo a 27 °C en incubadora con agitación a 140 rpm. Después de que el hongo presentó crecimiento, se sembró en una bandeja de plástico transparente que contenía arroz pulverizado y estéril y se llevó a incubación durante 12 días a 27 °C. Después de este tiempo de incubación, el hongo –totalmente esporulado– se sometió a un proceso de secado del agua condensada. Luego se prosiguió a la evaluación de cada una de las variables de viabilidad y porcentaje de patogenicidad.

Conservación mediante el método de silica gel a 4°C, -20 °C y -70 °C

Preparación del medio de suspensión. Se preparó una solución de leche descremada® (Difco No. 0032-17-3) en polvo al 5% en agua destilada y se esterilizó a 121 °C por 15 minutos. La solución de leche descremada se refrigeró y almacenó a 4 °C, antes de ser utilizada. Adicionalmente, se prepararon botellas McCartney estériles y a cada frasco se le adicionaron 8 ml de ASD en forma inclinada (Smith y Onions 1994).

Luego se tomo 1 gramo de silica gel ® (Merck No. 101925) y se depositó a lo largo del agar presente en cada frasco, esparciendo el contenido con espátula estéril, manteniendo el recipiente de la silica gel en un balde con trocitos de hielo. Seguidamente se agregó a cada frasco con silica gel, 2 ml de la suspensión preparada en leche descremada al 5% con propágulos de *B. bassiana* en una concentración de 1×10^9 prop/ml, proveniente de un cultivo crecido durante 20 días.

Cada frasco se dejó en posición vertical durante 30 días a 27 °C (Onions 1971; Smith 1984). Posteriormente, luego de este período, se ajustó la tapa rosca de los frascos con crecimiento establecido y hongo esporulado y se colocaron a temperatura de nevera entre 4 y 8 °C y de congelador entre -20 °C y -70 °C.

Proceso de recuperación del hongo conservado en silica gel anhidra. Se removieron los frascos que contenían el hongo conservado en silica gel de 4 °C, -20 °C y -70 °C, se descongelaron y luego se raspó todo el contenido de cada frasco McCartney con espátula estéril y se depositó en un frasco Schott tapa rosca de 500 ml, que contenía 200 ml de medio Goral nutritivo (Goral 1973). Estos frascos se incubaron en agitación a 140 rpm a 27 °C durante un mínimo de 3 días, tiempo en el cual se evidenció el crecimiento del hongo (Simione y Brown 1991).

Después de que el hongo presentó crecimiento, se desarrolló el mismo procedimiento descrito para el hongo conservado en aceite mineral.

Conservación en nitrógeno líquido a -196 °C

Se partió de un cultivo esporulado de *B.b 9620* desarrollado durante 30 días. A este cultivo se le hizo un preenfriamiento entre 4 y 8 °C antes del almacenamiento en nitrógeno líquido.

Preparación del inóculo y del crioprotector. Los crioprotectores utilizados fueron el glicerol al 10% v/v estéril ® (Merck No. 1.04094) y el dimetil sulfóxido estéril (DMSO al 5% v/v) ® (Merck No. 1.02952). Los cultivos de la cepa de *B. bassiana* desarrollados durante 30 días fueron lavados con 10 ml de glicerol al 10% y con 10 ml de DMSO al 5% por separado; llevando cada suspensión con cada protector a una concentración de 1×10^9 propágulos / ml.

Protocolo de congelamiento. El hongo se depositó en viales de polipropileno de 2 ml de capacidad, estériles. Estos recipientes criogénicos se inocularon con 1 ml de cada suspensión de DMSO y glicerol. Luego se

congelaron a una velocidad de congelación aproximadamente de $1 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, suspendiendo los crioviales en la fase de vapor de una cámara de enfriamiento ® (Union Carbide). Después, los crioviales se llevaron hasta -35 °C en 45 minutos.

Este proceso fue seguido por la inmersión de los recipientes criogénicos dentro de un termo con nitrógeno líquido ® (Marca MVE, Ref. XLC. 230), en el cual las muestras llegaron a -196°C (Simione y Brown 1991).

Proceso de recuperación del hongo luego de su conservación en nitrógeno líquido. Se removieron los crioviales inmersos en nitrógeno líquido y se sumergieron en agua destilada a 37 °C durante 10 minutos; luego se sometieron las muestras al período de recuperación en medio Goral y se sembraron en arroz pulverizado de acuerdo con la metodología descrita anteriormente y se prosiguió a evaluar la patogenicidad y viabilidad del cultivo.

Conservación por liofilización o desecación al vacío

Todo el proceso de liofilización se llevó a cabo en Liofilizador Stokes 48 ®.

Preparación del inóculo fúngico. Se preparó un inóculo de *B. bassiana* de concentración de 1×10^9 propágulos/ml a partir de un cultivo esporulado desarrollado durante 30 días en el medio de cultivo ASD. La población de propágulos humedecida se mezcló con el protector correspondiente con el que se había hecho el lavado de los propágulos en los tubos de ensayo. Finalmente se rasparon, con una espátula estéril, los propágulos aún presentes en los tubos de ensayo.

Los protectores utilizados fueron leche descremada al 10% y al 20% ® (Difco No. 0032-17-3); leche descremada al 10% más inositol al 5% ® (Sigma No. 11740707); Medio ATCC 18 y Medio ATCC 20. Estos medios de suspensión fueron esterilizados y almacenados a 4 °C, al igual que los viales utilizados.

Proceso de recuperación del hongo luego de su conservación en liofilización. Para evaluar cada una de las variables a los cultivos conservados mediante liofilización, se removieron los viales de 4°C (nevera). Se rehidrataron las muestra con medio Goral por 10 minutos y luego se sometieron al período de recuperación, se sembraron en arroz pulverizado de acuerdo a la metodología descrita anteriormente. Finalmente se prosiguió con la

evaluación de las variables mencionadas anteriormente (Cenicafé 1997).

Evaluación de la patogenicidad

Se seleccionaron adultos de broca del café de menos de 8 días de edad, provenientes de una cría libre de patógenos. Se desinfectaron previamente con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% durante 10 minutos y se lavaron en agua destilada estéril (ADE) usando mallas de tul esterilizadas que sirven de colador. De estas brocas se seleccionaron las que presentaron mayor actividad. La concentración del inóculo empleado fue de 1×10^7 propágulos / ml suspendidos en ADE. Se tomaron 40 brocas al azar, distribuidas en cuatro repeticiones, cada una con diez individuos. Para cada evaluación se utilizó un testigo compuesto de adultos de broca que no entraron en contacto con el hongo.

Las brocas se sumergieron en una suspensión de propágulos del hongo (1×10^7 prop/ml) durante 10 minutos, la cual se mantuvo en agitación manual. Luego, se colocó una broca por vial de vidrio (frasco de antibiótico), con un disco de toalla de papel previamente humedecido con ADE y se tapó con una mota de algodón esterilizada bien ajustada a la boca del vial. Al cabo de 24 horas se adicionó, como sustrato a cada vial, un grano de café pergamino seco de agua (45% de humedad), es decir, sin ningún proceso de secado mecánico.

Diariamente durante 10 días se evaluó la mortalidad causada por el hongo en estudio, observando al estereoscopio los síntomas y signos de enfermedad en las brocas. Las brocas vivas o muertas permanecieron en los viales para no interrumpir el desarrollo normal del hongo en el insecto. Con una jeringa desechable, diariamente se adicionó ADE hasta humedecer el disco de papel evitando la presencia de agua libre. Con el registro diario de patogenicidad se estableció el porcentaje de mortalidad (Cenicafé 1997).

Los resultados de patogenicidad se corrigieron de acuerdo con la fórmula de Abbott con base en el testigo absoluto. En los casos en que el testigo presentó mortalidad debido a *B. Bassiana*, se hizo la corrección teniendo en cuenta el porcentaje de mortalidad causado por este hongo, así:

$$\boxed{\% \text{ mortalidad corregido}} = \frac{\% \text{ mortalidad observada} - \% \text{ mortalidad testigo}}{100 - \% \text{ mortalidad testigo}}$$

Cuando el testigo presentó mortalidad debido a otros hongos, se hizo la corrección teniendo en cuenta la mortalidad total (B. bassiana + testigo), así:

$$\boxed{\% \text{ mortalidad corregido}} = \frac{\% \text{ mortalidad total} - \% \text{ mortalidad testigo}}{100 - \% \text{ mortalidad testigo}}$$

RESULTADOS

Efecto de los protectores utilizados sobre la patogenicidad del hongo *B. bassiana*

Cuando se analizaron en promedio los resultados obtenidos al utilizar los diferentes protectores, se encontró que sí existieron diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($p < 0.05$), en el efecto que éstos produjeron sobre la patogenicidad del hongo.

La mortalidad producida en las brocas por el hongo conservado durante 24 semanas en DMSO al 5% fue 51.6% y la mortalidad producida por el hongo conservado en leche descremada al 20% fue 75.2%, al igual que la mortalidad producida en las brocas por el hongo conservado en leche descremada al 10% más inositol al 5%.

La mortalidad producida por el hongo con el glicerol al 10% fue 77.9%; la del aceite fue 79% y la de la leche descremada al 10% fue 82.3%. La mortalidad producida en las brocas por el hongo conservado en sílica gel y en el medio ATCC 18 fue 68% y 64.4%, respectivamente (figura 1).

Efecto del tiempo de almacenamiento sobre *B. bassiana* conservado en aceite mineral a 4 °C, - 20 °C y - 70 °C

En cuanto a la viabilidad, se encontró un valor de germinación a las 24 semanas comparable al del inicio (figura 2).

Sin embargo, al evaluar después de las 12 semanas, se encontró que para todos los casos hubo un descenso en la germinación, menor cuando el hongo se conservó a 4 °C, con un resultado del 65.3%. Mientras que cuando se conservó a - 20 °C y a - 70 °C, los resultados de germinación fueron del 35.4% y 31% respectivamente (figura 2).

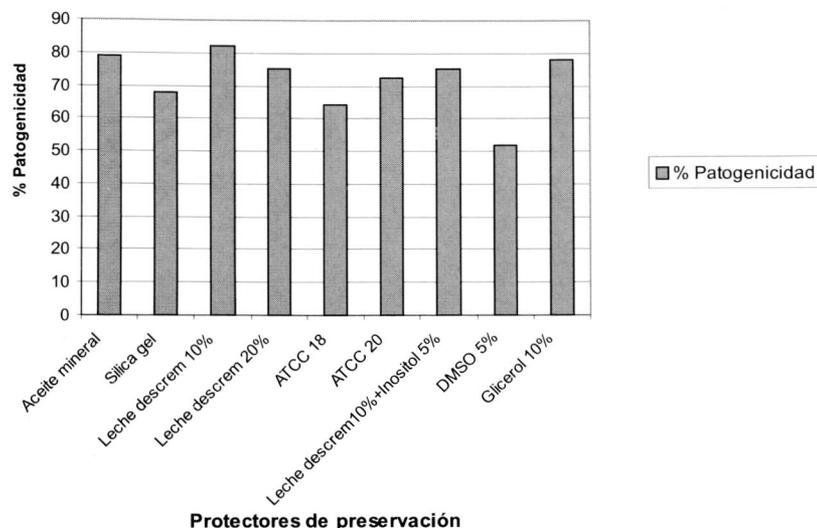


Figura 1. Comportamiento de la patogenicidad de acuerdo con el uso de protectores de preservación.

De acuerdo con el análisis inferencial, se demuestra que sí existen diferencias significativas; por tanto, el tiempo de almacenamiento a 4 °C, - 20 °C y - 70 °C sí afectó la viabilidad del hongo conservado en aceite mineral, $p < 0.05$ (figura 2).

Al evaluar la patogenicidad del hongo conservado a estas temperaturas, se encontró que para todos los casos se presentó un descenso a las 12 semanas, tiempo mucho menor que cuando el hongo estuvo a 4 °C, con un resultado de mortalidad en broca del 88.3%, mientras

que cuando se conservó a -20 °C, el resultado de mortalidad fue 40% (figura 3).

Cuando la evaluación se hizo en la semana 24, se presentó una disminución en la mortalidad de las brocas. Al final de las 24 semanas, aumentó notoriamente a -20 °C.

Efecto del tiempo de almacenamiento sobre *B. bassiana* conservado en silica gel a 4 °C, - 20 °C y - 70 °C

Se encontró que a menor temperatura de preservación, la viabilidad se mantuvo estable hacia las 24 semanas de almacenamiento con un resultado de 67.3% de germinación a -70 °C (figura 4).

Así mismo los propágulos conservados a 4 °C y a -20 °C, en la semana 24 de almacenamiento, presentaron un aumento de la viabilidad; con un valor de 88.7% y de 88.1% respectivamente. De acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$), existen diferencias significativas entre los grupos evaluados durante el tiempo de almacenamiento.

El período de recuperación que presentaron los propágulos conservados a 4 °C, en la semana 6, fue dos días. Se produjeron blastosporas abundantes y micelio. En la semana 12, por el contrario, el tiempo de recuperación fue 20 horas aproximadamente, y además se presentaron propágulos germinados.

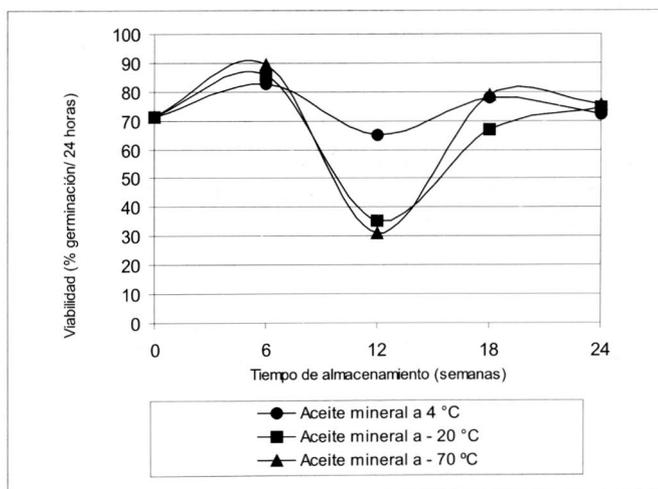


Figura 2. Comportamiento comparativo de la viabilidad durante el tiempo de almacenamiento en aceite mineral a 4 °C, - 20 °C y - 70 °C.

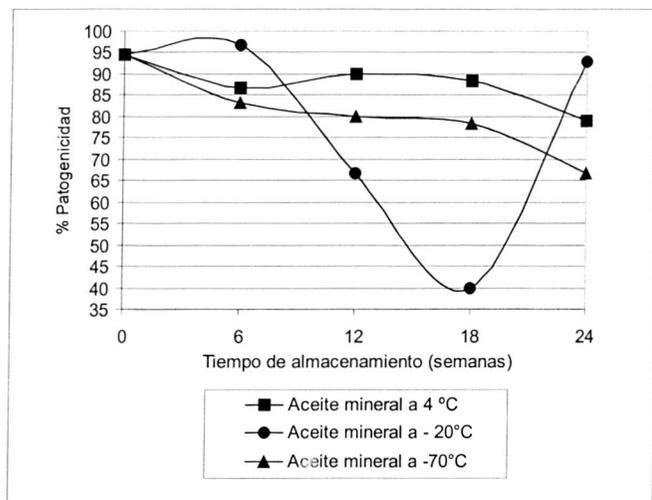


Figura 3. Comportamiento comparativo de la patogenicidad durante el tiempo de almacenamiento en aceite mineral a 4 °C, -20 °C y -70 °C.

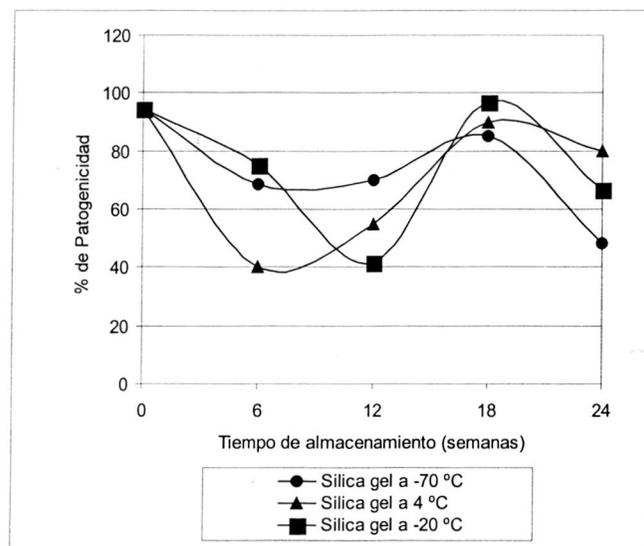


Figura 5. Comportamiento comparativo de la patogenicidad durante el tiempo de almacenamiento en silica a 4 °C, -20 °C y -70 °C.

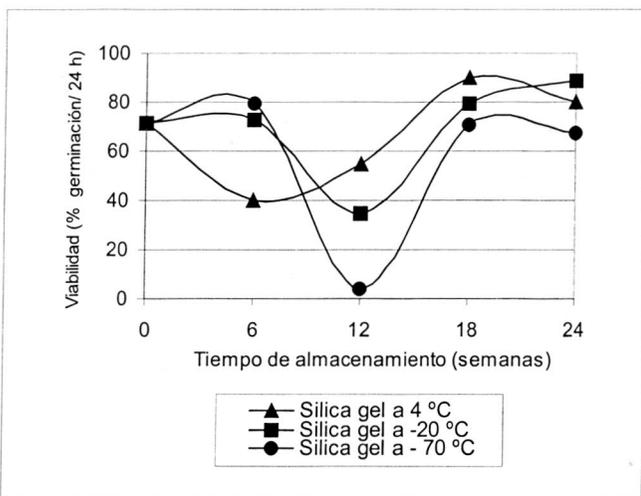


Figura 4. Comportamiento comparativo de la viabilidad durante el tiempo de almacenamiento en silica gel a 4 °C,

Los propágulos conservados a -20 °C y a -70 °C, en la semana 6, necesitaron 30 horas para salir del período de latencia y presentar blastosporas y micelio abundante.

Los propágulos conservados a 4 °C en silica gel presentaron variaciones acentuadas entre la semana 12 y 18, a las temperaturas de conservación de -20 °C y -70 °C.

Los propágulos de este hongo no conservaron la patogenicidad en las tres temperaturas ensayadas (figura 5).

Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el hongo conservado en liofilización

Se encontró mayor tendencia a proteger los propágulos liofilizados cuando estos fueron suspendidos en leche descremada al 10% o al 20% y en el medio ATCC 20, presentándose porcentajes de germinación de 89.6%, 90% y de 87.6%, respectivamente, en la semana 24 (figura 6). Éstos presentaron porcentajes de humedad relativa de 2.82%, 3.46% y 2.32%, respectivamente. El medio ATCC 18 presentó humedad del 1.8% y la leche descremada al 10% + inositol al 5%, humedad del 4.38%.

De acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$), existen diferencias significativas entre los protectores utilizados en la liofilización para la preservación de la viabilidad. La mortalidad producida en estos protectores, después de seis meses, fue inferior al 70% (figura 7).

Efecto del tiempo de almacenamiento sobre *B. bsassiana* conservada en nitrógeno líquido

Cuando el hongo se conservó en nitrógeno líquido usando glicerol al 10%, se observó un aumento de la viabilidad de los propágulos de este hongo durante las 24

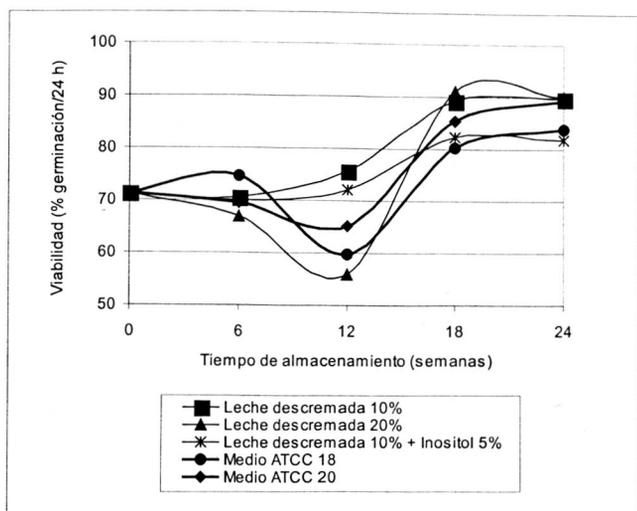


Figura 6. Comportamiento comparativo de la viabilidad durante el tiempo de almacenamiento usando protectores para liofilización.

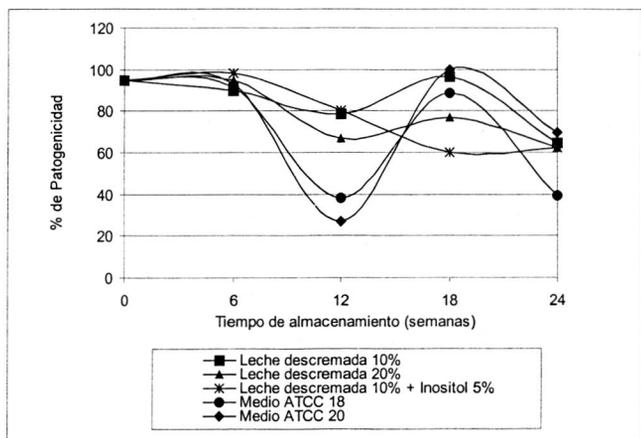


Figura 7. Comportamiento comparativo de la patogenicidad durante el tiempo de almacenamiento usando protectores para liofilización.

semanas de evaluación, con un valor de 90.5%. Con el dimetilsulfóxido (DMSO 5%), se conservó el hongo en un 82.9% (figura 8). Se presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Utilizando glicerol al 10%, se alcanzó la patogenicidad más alta luego de seis meses (91.6%); utilizando DMSO al 5%, la patogenicidad llegó a un valor de 63.3% a las 24 semanas (figura 9).

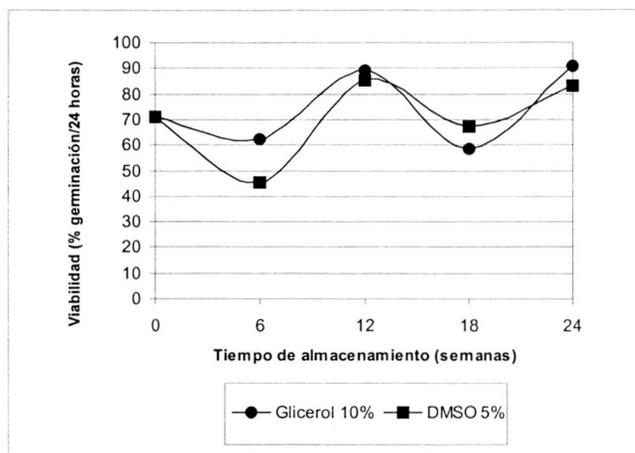


Figura 8. Comportamiento comparativo de la viabilidad durante el tiempo de almacenamiento usando protectores en nitrógeno líquido.

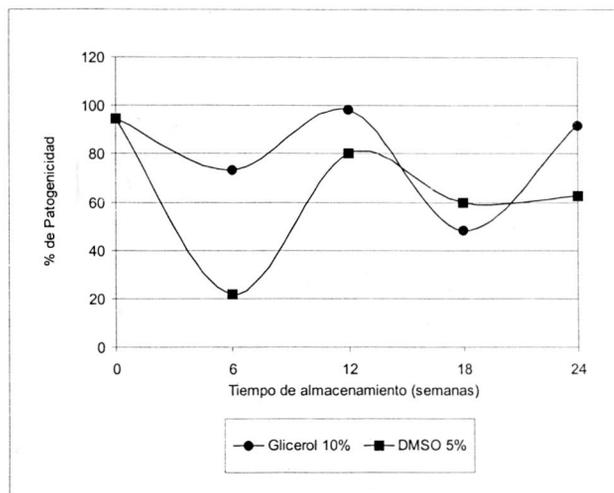


Figura 9. Comportamiento comparativo de la patogenicidad durante el tiempo de almacenamiento usando protectores en nitrógeno líquido.

DISCUSIÓN

El presente estudio indica que la leche descremada es uno de los mejores protectores de la viabilidad de los propágulos de *Beauveria bassiana*. Además permitió comprobar que este protector mantuvo la patogenicidad del *Beauveria bassiana* para broca en condiciones de laboratorio. La leche descremada al 10% permitió preservar la patogenicidad en el 82.3% en el sistema de liofilización.

Este dato coincide con lo hallado por otros autores (Crowe et al. 1984; Crowe *et al.* 1990), quienes opinan que es uno de los compuestos protectores que ofrecen mayor efectividad sobre la estabilidad biológica del microorganismo durante el almacenamiento. Este protector muestra gran efectividad tanto a una concentración del 10% como mezclado con otros compuestos (Singleton y Sainbury 1978). Es así como en sistemas acuosos liofilizados se han propuesto varios mecanismos que tratan de explicar la estabilización proteica por solutos, como la leche descremada, al igual que por disacáridos, como sacarosa, lactosa y trehalosa.

Teniendo en cuenta que los propágulos de *B. bassiana*, antes de ser sometidos a la liofilización, presentaron patogenicidad del 95% y del 82.3%; después del proceso de conservación, se puede interpretar esta disminución posiblemente como consecuencia de cambios enzimáticos, genéticos o estructurales del hongo, y además, de la variabilidad de los factores ambientales presentes durante la evaluación de la prueba biológica de patogenicidad.

La capacidad patogénica de un hongo entomopatógeno, como el *B. bassiana*, depende en gran medida de la actividad del complejo de enzimas encargadas de degradar la cutícula del insecto. Las tres clases más importantes son lipasas, proteasas y quitinasas, que participan y en este orden en el proceso de infección del hongo sobre la broca del café. La mayoría de las enzimas presentan reducción de su actividad entre $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Shikama y Yamasaki 1961). Es el caso de proteínas globulares, como la quitinasa y la proteasa, las cuales podrían presentar disminución en su actividad, dependiendo de las condiciones de congelamiento (temperatura y duración) (Hanafusa 1973) o por cambios estructurales producidos directamente sobre el sitio activo.

En el caso de la utilización de la leche descremada, se ha encontrado que tanto los azúcares como los fosfatos (presentes en la albúmina bovina) pueden interactuar durante el congelamiento de la liofilización. Esta interacción, de acuerdo con otros autores, puede prevenir la fusión y el daño en la bicapa fosfolipídica de la membrana plasmática celular y, por lo tanto, se incrementaría la fluidez, que evitaría la deshidratación de ésta y, finalmente, el daño (Crowe *et al.* 1990; Crowe et al. 1984; Gekko y Timasheff 1981).

Se ha reportado que la virulencia asociada a la patogenicidad en diferentes insectos plaga, causada por *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin y *B. Bassiana*, depende de altas velocidades de germinación de

los propágulos (Al-Aidroos y Roberts 1978; Pekrul y Grula 1979; Hassan et al. 1989; Yokoyama et al. 1993).

Sin embargo, no se ha encontrado correlación entre la velocidad de germinación y la patogenicidad con otros hongos como *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas (Chandler et al. 1993). Boucias y Pendland (1984) observaron que un aislamiento virulento de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, germinó más lentamente que otros aislamientos no agresivos. Esta situación se puede apreciar en la conservación con aceite mineral donde, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, la patogenicidad de *B. bassiana* es alta en promedio, mientras que la viabilidad fue menos del 80%.

La silica gel, en las tres diferentes temperaturas de conservación, no permitió la preservación de las características vitales del hongo, debido posiblemente a la remoción del contenido de agua intracelular (secado), lo que a su vez lleva a la reducción del metabolismo celular de los cultivos. Esta disminución en la viabilidad fue más notoria a medida que la temperatura fue más baja. cumple en este caso, no se lo registrado por Alves et al. (1996), relacionado con la disminución de la viabilidad en aislamientos más patógenos y virulentos.

Aunque la viabilidad se conservó más adecuadamente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, la patogenicidad fue más alta después del período de recuperación al que fueron sometidos los propágulos de *B. bassiana*, lo cual permitió que éstos, posiblemente, salieran del estado de latencia en el que se encontraban, debido probablemente a las condiciones de congelación bajo cero.

A medida que transcurrió el tiempo de almacenamiento en silica gel, la patogenicidad y la viabilidad no disminuyeron sino que presentaron comportamientos diferentes que dejan notar que existe en realidad gran variabilidad en los factores ambientales y en la metodología utilizada en la medición de estas variables.

El uso del glicerol al 10%, para la conservación en nitrógeno líquido, permitió preservar la patogenicidad de *B. bassiana*. Esta actividad patogénica es comparable con la obtenida en la semana de inicio (95%). El glicerol, un osmoregulador en el interior de la célula fúngica, reemplaza las moléculas de agua perdidas y mantiene la hidratación de las proteínas, en especial las de bajo peso molecular. A su vez el glicerol es preferencialmente excluido del dominio de la proteína; por lo tanto la proteína no se despliega y se estabiliza en su conformación nativa (Crowe *et al.* 1984; Crowe *et al.* 1990; Fink 1986). En el caso del efecto del glicerol sobre la viabilidad del hongo, esta característica se mantuvo en el valor óptimo del 90%. Los propágulos entraron posiblemente en un estado de latencia atribuido también a choque osmótico leve

o a cambios en la permeabilidad de la membrana, lo que finalmente disminuyó el crecimiento y, dependiendo de las condiciones ambientales a las que estuvo sometido el propágulo en el período de recuperación, aumentó la capacidad germinativa (Luard 1982; Coulson *et al.* 1986).

Con el DMSO al 5%, se alcanzaron valores de patogenicidad más bajos que con el glicerol. Parece ser que este solvente protege y estabiliza las proteínas propias de la patogenicidad, o las relacionadas con la germinación, a temperaturas bajo cero; mientras que a temperaturas más elevadas, como sucede en el momento de la descongelación a 37 °C, el DMSO se asocia con estas proteínas por interacciones hidrofóbicas, llevando finalmente a la desnaturación de la proteína (Crowe *et al.* 1990). Los resultados obtenidos tuvieron alguna relación con el comportamiento del DMSO, ya que se presentaron períodos de recuperación de 6 a 8 días, tiempo necesario para que el propágulo se adaptara a las condiciones de choque osmótico más intensas en el medio intracelular. El DMSO parece ofrecer protección menos significativa a la pared celular fúngica.

La viabilidad del hongo presentó igual comportamiento, y en valores muy parecidos a los de patogenicidad, cuando fue conservado en glicerol. De esta manera, se refleja la relación directa entre patogenicidad y viabilidad, aunque el hongo necesitó períodos de recuperación de 5 a 6 días en promedio. El crecimiento presentado pudo ser el resultado de una secuencia de eventos, como la disminución en el volumen de las paredes celulares de los propágulos, y algunos grados de plasmólisis en paredes celulares. Luego se observó un retorno gradual, usualmente al volumen inicial o turgencia de la hifa, dependiendo de la concentración de sustancias activas incrementadas internamente así como del influjo de agua del medio al propágulo. Posiblemente, en este momento el glicerol se ajustó osmóticamente el medio, por ser el soluto de mayor concentración en él. Estos eventos de osmorregulación celular se han reportado también en hongos imperfectos como *Penicillium chrysogenum* y *Chrysosporium fastidium* (Luard 1982; Smith *et al.* 1986).

De acuerdo con los resultados obtenidos, es importante anotar que se necesitan investigaciones más prolongadas que correlacionen la viabilidad y la patogenicidad de otros hongos entomopatógenos en condiciones de preservación en los diferentes sistemas de conservación industrial, ya que así se va a lograr tener en el mercado productos optimizados y estandarizados, que funcionen eficazmente contra insectos plaga, en condiciones de campo.

AGRADECIMIENTOS

A Vecol S.A., por poner a nuestra disposición las instalaciones del laboratorio, así como por el apoyo financiero para la ejecución este trabajo.

A los profesionales pertenecientes al Laboratorio de Control de Calidad de Formulaciones de Hongos Entomopatógenos de la Disciplina de Entomología de Cenicafé, por su colaboración en la realización de las pruebas de patogenicidad y viabilidad de los propágulos de *B. bassiana* sometidos a los diferentes tratamientos de preservación.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Aidroos, K. & Roberts D. W. 1978. Mutans of *Metarhizium anisopliae* with increased virulence towards mosquito larvae. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 20: 211-219.
- Alves, S. B., Pereira, R. M. Stimac J. L. & Vieira s. a. 1996. Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia after prolonged storage at low, above-freezing temperatures. *Biocontrol Science and Technology* 6: 575-581.
- Boucias, D. G. & Pendland J. C. 1984. Nutritional requirements for conidial germination of several host range pathotypes of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Journal of Invertebrate Pathology* 43: 288-292.
- Bustillo, P.A., Cardenas, M. R. Villalba, Benavidez, G.D. Orozco, P. Posada H & F.F. 1998. *Manejo Integrado de la Broca del Café Hypothenemus hampei (Ferrari) en Colombia*. Chinchiná. Cenicafé.
- Centro Nacional de Investigaciones de Café. 1997. Técnicas para el Control de Calidad de formulaciones hongos entomopatógenos. Cenicafé (Colombia). *Boletín Técnico* No. 17, pp. 1-37.
- Chandler, D., Heale J. B. & Gillespie A. T. 1993. Germination of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* on scales of the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *Biocontrol Science and Technology* 3: 161-164.
- Coulson, G. E., Morris G. J. & Smith D. 1986. A cryomicroscopic study of *Penicillium expansum* hyphae during freezing and thawing. *Journal of General Microbiology* 132: 183-190.
- Crowe, J. H., Whittam, M.A. Chapman, D. & M.Crowe L. 1984. Interactions of phospholipid monolayer with carbohydrates. *Biochemica et Biophysica Acta* 769: 152-159.
- Crowe, J. H., Carpenter, J. F. Crowe L. M. & Anchordoguy T.J. 1990. Are Freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Criobiology* 27: 219-231.
- Dhingra, O. D. & Sinclair, J. B. 1995. *Basic plant pathology methods*. CRC Press. Boca Ratón. Florida. Pp. 61-81

- Fink, A. L. 1986. Effects of cryoprotectants on enzyme structure. *Cryobiology* 23: 28-37.
- Gekko, K. & Timasheff S. N. 1981. Mechanism of protein stabilization by glycerol; preferential hydration in glycerol – water mixtures. *Biochemistry* 20 (16): 4667-4676.
- González, M. T., Posada, F. J. & Bustillo a. e. 1993. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. *Cenicafé* 44(3): 93 -102.
- Goral, V. M. 1973. ¿Proc. 5th Int. Colloq. Insect Path. Microbiol Control, Oxford. 1973. Pp. 73. In P. Ferron, *Pest control by the fungi Beauveria and Metarhizium*. Academic Press, New York. Pp. 472.
- Hanafusa, N. 1973. Freeze-drying of enzyme protein. In Reunión de la Comisión C1 de l'nstitu International du Froid. Principes et applications de la lyophilisation des produits biologiques, pharmaceutiques et alimentaires. Sapporo, Institut International du froid. Japón. Pp. 9-18.
- Hasaan, E. M., Dillon R. J. & Charnley A. K. 1989. Influence of accelerated germination of conidia on the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology* 54: 277-279.
- Luard, E. J. 1982. Effect of osmotic shock on some intracellular solutes in two filamentous fungi. *Journal of General Microbiology* 128: 2575-2581.
- Onions, A.H.S. 1971. Preservation of fungi. In *Methods in Microbiology*. Booth ed Academic Press. New York. Pp. 13-41.
- Pekrul, S. & Grula E. A. 1979. Mode of infection of the corn ear-worm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as a revealed by scanning electron microscopy. *Journal of Invertebrate Pathology* 34: 238-247.
- Shikama, K. & Yamasaki I. 1961. Denaturation of catalasa by freeze, drying and thawing. *Nature* 190 (4770): 83-84.
- Simione, F. & Brown E. M. 1991. *Atcc Preservation Methods: Freezing and Freezing-drying*. 2 ed. Rockville, MD: ATCC, pp. 1-7.
- Singleton, P. & Sainsbury D. 1978. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. 2ª.ed. John Willey & Sons. Chichester. Pp. 43-44.
- Smith, D. Maintenance of fungi. In *Maintenance of microorganisms*. 1984 edited by B.E. Kirsop y J.J.S. Snell. Academic Press. London. Pp. 83-107.
- Smith, D., Coulson G. E. & Morris G. J. 1986. A comparative study of the morphology and viability of hyphae of *Penicillium expansum* and *Phytophthora nicotianae* during freezing and thawing. *Journal of General Microbiology* 132: 2013 -2021.
- Smith, D. & Onions A. H. 1994. *The preservation and maintenance of living fungi*. Wallinford: Centre for Agriculture and Biosciences International. Reino Unido. Pp. 22-65.
- Yokoyama, T., Fujikata M. & Fujjie A. 1993. Improvement of infectivity of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) to *Anomala cuprea* Hope (Coleoptera: Scarabaeidae) by ultraviolet irradiation of protoplast. *Applied Entomology and Zoology* 28: 452-461.