

CARACTERIZACIÓN PATOGENICA Y MORFOLÓGICA DE AISLAMIENTOS DE *Metarhizium anisopliae* OBTENIDOS DE DIFERENTES ORDENES INSECTILES

Gloria Nancy Padilla-Melo*; Martha Gladys Bernal-Uribe**; Patricia Eugenia Vélez-Arango**; Esther Cecilia Montoya-Restrepo***

RESUMEN

PADILLA M., G. N.; BERNAL U., M. G.; VÉLEZ A., P. E.; MONTOYA R., E. C. Caracterización patogénica y morfológica de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* obtenidos de diferentes ordenes insectiles. Cenicafé 51(1): 28-40. 2000.

Se seleccionaron 50 aislamientos de *Metarhizium anisopliae* provenientes de diferentes órdenes de insectos y zonas geográficas por su patogenicidad a la broca del café (*Hypothenemus hampei*) y la capacidad de germinación. Diez de los 50 aislamientos se caracterizaron mediante parámetros fisiológicos como producción de esporas en Sabouraud dextrosa agar (SDA) y Agar agar complementado con macerado de brocas adultas al 0,96% (AAB), crecimiento radial (SDA) y características morfológicas, como formación de sinemas, color, aspecto de la colonia, producción y difusión de pigmento. La producción de esporas en SDA fue mayor, principalmente para *Ma* 9101 que a 30 días de incubación produjo $6,5 \times 10^9$ esporas/ml y *Ma* 9235, con la mayor producción 15 días después de incubación ($4,4 \times 10^7$ esporas/ml). No hubo diferencias en el crecimiento radial en cinco aislamientos cuyo diámetro osciló entre 91,5 y 93,5 mm y en los otros, entre 87,4 y 89,5 mm. El color de las colonias de *M. anisopliae* varió de amarillo a verde y el aspecto de algodonoso a compacto, según la proporción de micelio y esporas. Hubo formación de sinemas en dos aislamientos y todos presentaron pigmento; sin embargo, sólo tres lo difundieron al medio. La respuesta esporulativa al igual que el crecimiento radial, la formación de sinemas y la difusión del pigmento permitieron diferenciar aislamientos, mientras que el color y el aspecto de la colonia no lo permitieron.

Palabras claves: Hongos entomopatógenos, *Hypothenemus hampei*, patogenicidad, germinación, características fisiológicas, morfológica.

ABSTRACT

In order to evaluate pathogenicity and morphology of *Metarhizium anisopliae*, 50 isolates from different insects and geographic localities were selected according to pathogenicity to coffee berry borer and germination, with a minimum value of 80% in both variables. Ten out of the 50 isolates evaluated were further characterized by physiological parameters such as spore production in Sabouraud dextrose agar (SDA) and water agar plugs with a macerate of adult coffee berry borers 0,96% (AAB), radial growth (SDA), and morphological aspects such as synnemata production, color, colony aspect, and pigment production and diffusion. Spore production was evaluated in SDA, in which the highest averages were observed, mainly for *Ma*9101 with $6,5 \times 10^9$ spores/ml after 30 days of incubation and *Ma* 9235 with the highest spore production after 15 days ($4,4 \times 10^7$ spores/ml). There were no differences in radial growth: for five isolates diameter was 91,5 to 93,5 mm, and for the others 87,4 to 89,5 mm. Color varied from yellow to green and the aspect varied from cottony to compact, according to mycelium and spore proportion. There was synnemata formation in two isolates and all had pigments; however, only three diffused in the media. Sporulating response, radial growth, synnemata formation, and diffusion of pigment in agar allowed differentiation of isolates, whereas color and colony aspects did not allow it.

Keywords: Entomopathogen fungi, *Hypothenemus hampei*, coffee berry borer, pathogenicity, germination, physiological characteristics, morphology.

* Bacterióloga y Laboratorista Clínico. Universidad Católica de Manizales.

** Asistente de Investigación e Investigador Científico I, respectivamente. Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

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

La broca del café *Hypothenemus hampei* es el insecto plaga de mayor importancia en las plantaciones del café en el mundo por el daño que causa en la almendra (13). La Federación Nacional de Cafeteros de Colombia a través de Cenicafé, ha desarrollado un Programa de Manejo Integrado que incluye el control cultural, el control biológico, empleando enemigos naturales como los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, y el control químico con insecticidas de baja toxicidad.

El género *Metarhizium* fue descrito por Sorokin en 1883 y con base en sus características morfológicas se han descrito las variedades *M. anisopliae* var. *anisopliae* y var. *majus* (23); estos criterios fueron utilizados en el laboratorio de patología de insectos de Cenicafé para caracterizar 51 aislamientos de *M. anisopliae*, encontrándose que la variedad *anisopliae* fue la más común y solamente cuatro aislamientos de un mayor tamaño correspondieron a la variedad *majus*. Recientemente se han descrito las especies *M. flavoviridae* y *M. album* (19); y en la China se registraron tres nuevas especies *M. cylindrospora*, *M. guizhouense* y *M. pingshaense* (10).

La evidencia del ataque de *M. anisopliae* sobre insectos, en condiciones naturales, ha sido descrita como "muscardina verde" en más de 200 especies de insectos (25), exhibiendo diferentes grados de especificidad, la cual está influenciada por las características del patógeno y de la cutícula del hospedante (11). Durante la patogénesis, *M. anisopliae* tiene la capacidad de sintetizar enzimas extracelulares que pueden degradar polímeros de la cutícula (proteínas, lípidos y quitina), permitiendo el aprovechamiento de nutrimentos para su crecimiento (22).

M. anisopliae asimila muy bien las fuentes de carbono orgánico e inorgánico y no exige requerimientos especiales de carbohidratos (14). Varios autores registran como medios ideales de

crecimiento de este entomopatógeno los sustratos SDA (Saboraud dextrosa agar) y PDA (Agar papa dextrosa), y para la producción masiva el sustrato más comúnmente usado es el arroz. Avila y Umaña (1), registran que las esporas de *M. anisopliae* cultivadas en arroz, al cabo de 18 ó 20 días de incubación se encuentran en óptimas condiciones para su utilización como agente de control.

M. anisopliae se caracteriza por ser mesófilo, con una temperatura óptima para germinación y crecimiento de 25 a 30°C, una máxima de 32 a 35°C y una mínima de 10 a 12°C (21).

Las colonias de *M. anisopliae* en PDA presentan un crecimiento de micelio con borde blanco y con grupos de conidióforos que se tornan coloreados al multiplicarse las conidias, con diferentes variaciones de color: de olivo a amarillo verdoso, de olivo a verde, decolorada en el envés, de color miel o amarillo pálido y pigmento amarillo que se difunde en el medio (3). Este pigmento no es esencial para el crecimiento y desarrollo, por ello puede considerarse un metabolito secundario; sin embargo, algunos pigmentos juegan un papel importante en la resistencia de las esporas en ambientes desfavorables (9). Varios autores registran que algunas características morfológicas y fisiológicas pueden contribuir en la diferenciación de aislamientos (24, 27) y permiten el conocimiento básico de determinado material biológico.

Debido a que no se han realizado estudios de caracterización de *M. anisopliae* que permitan el conocimiento básico de dicho material biológico, se hizo necesaria la realización del presente estudio, el cual tuvo como objetivo primordial seleccionar aislamientos altamente patogénicos hacia *H. hampei* y con alta capacidad de germinación, para su posterior caracterización morfológica y fisiológica, buscando seleccionar aquellos aislamientos con mejores características para ser usados en programas de manejo integrado de la broca del café.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se siguió la metodología planteada en el flujograma descrito en la Figura 1.

I. Reactivación de aislamientos de *M. anisopliae*. Se tomaron 50 aislamientos de *M. anisopliae* de la colección de entomopatógenos de Entomología de Cenicafé, de los cuales se describe en la Tabla 1 su hospedante original y procedencia geográfica. Éstos fueron reactivados utilizando adultos de la broca, siguiendo la metodología estandarizada por González *et al.* (8).

Los aislamientos ya reactivados permanecieron en tubos con SDA sin acidificar y en AA (Agar agar al 1,5%). Este procedimiento se realizó tanto para la preselección como para la conservación en glicerol al 10% de los aislamientos seleccionados para la caracterización.

II. Preselección de los aislamientos. Una vez reactivados los 50 aislamientos en la broca, se sometieron a las pruebas biológicas de patogenicidad (8) y germinación (26). Estas dos variables se tomaron como criterio de selección, de modo que aquellos aislamientos que

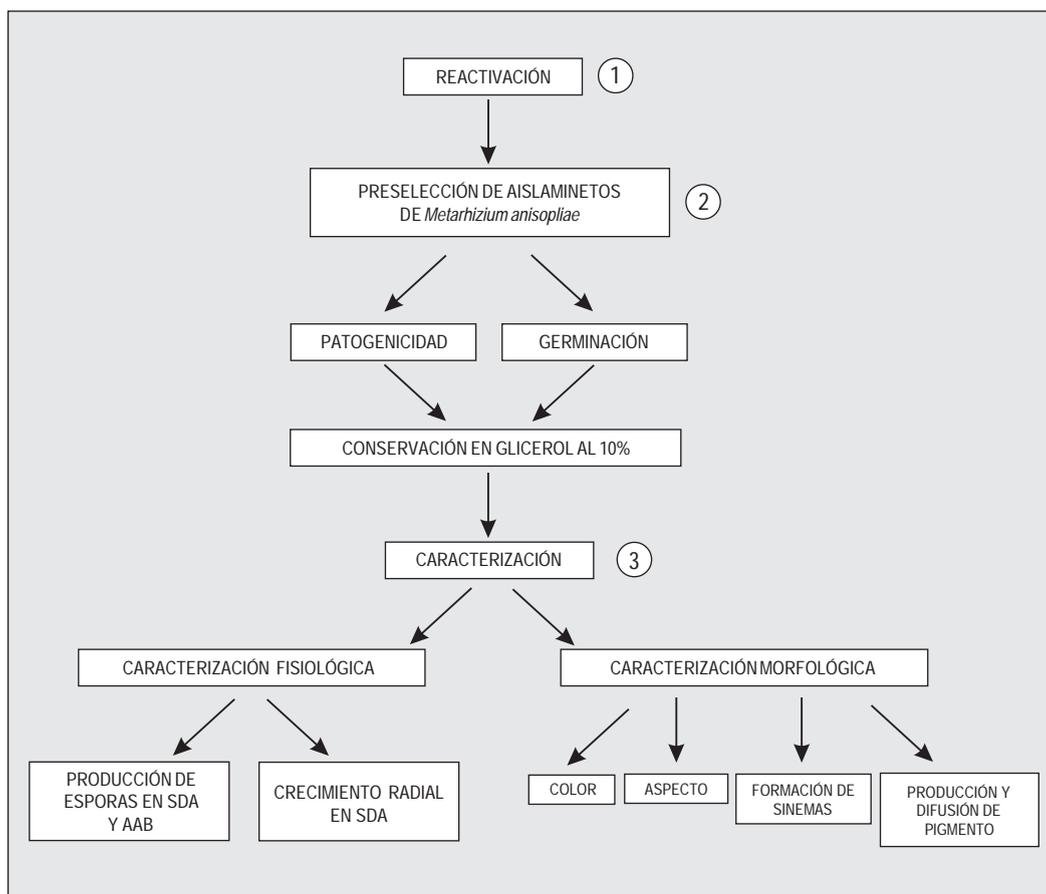


Figura 1. Flujograma que ilustra la secuencia de etapas desarrolladas para la caracterización de aislamientos del hongo *Metarhizium anisopliae*.

TABLA 1. Aislamientos de *Metarhizium anisopliae* con su hospedante original y procedencia geográfica correspondiente.

CÓDIGO AISLAMIENTO	HOSPEDANTE		ORIGEN GEOGRÁFICO
	Género y Especie	Orden y Familia	
Ma 9001	<i>Ancognatha scarabaeoides</i>	Coleoptera: Scarabaeidae	Colombia
Ma 9003	<i>A. scarabaeoides</i>	Coleoptera: Scarabaeidae	Colombia
Ma 9004	<i>A. scarabaeoides</i>	Coleoptera: Scarabaeidae	Colombia
Ma 9101	<i>Scapanes australis</i>	Coleoptera: Scarabaeidae	Papua nueva Guinea
Ma 9102	<i>Brontista longissima</i>	Coleoptera: Hispidae	Papua nueva Guinea
Ma 9103	<i>Pemphigus trehernei</i>	Homoptera: Aphidae	Reino Unido
Ma 9105	<i>Heteronychus santae-helenae</i>	Coleoptera: Scarabaeidae	Nueva Zelanda
Ma 9106	<i>Costelytra zealandica</i>	Coleoptera: Scarabaeidae	Nueva Zelanda
Ma 9107	<i>Myllocerus discolor</i>	Coleoptera: Curculionidae	India
Ma 9108	<i>Cargolia arana</i>	Lepidoptera: Geometridae	Colombia
Ma 9201	<i>Nemocestes incomptus</i>	Coleoptera: Curculionidae	EE.UU
Ma 9202	<i>N. incomptus</i>	Coleoptera: Curculionidae	EE.UU
Ma 9203	<i>N. incomptus</i>	Coleoptera: Curculionidae	EE.UU
Ma 9205	<i>N. incomptus</i>	Coleoptera: Curculionidae	EE.UU
Ma 9206	<i>Aeneolamia reducta</i>	Homoptera: Cercopidae	Colombia
Ma 9207	<i>Mocis sp</i>	Lepidoptera: Noctuidae	Colombia
Ma 9208	Hospedante desconocido		Colombia
Ma 9209	Hospedante desconocido		Colombia
Ma 9210	Hospedante desconocido		Colombia
Ma 9211	<i>Zulia colombiana</i>	Homoptera: Cercopidae	Colombia
Ma 9212	<i>Costelytra sp</i>	Coleoptera: Scarabaeidae	Nueva Zelanda
Ma 9215	<i>Porina sp</i>		Nueva Zelanda
Ma 9216	<i>Oryctes rhinoceros</i>	Coleoptera: Scarabaeidae	Nueva Zelanda
Ma 9217	Huesped desconocido	Coleoptera: Scarabaeidae	Nueva Zelanda
Ma 9218	<i>Teleogrylus commudus</i>	Orthoptera: Gryllidae	Australia
Ma 9219	<i>Saricesthis germinata</i>	Coleoptera: Scarabaeidae	Australia
Ma 9220	<i>Anaplognathus porosus</i>	Coleoptera: Scarabaeidae	Australia
Ma 9221	<i>Rhopaea magicornis</i>	Coleoptera: Scarabaeidae	Australia
Ma 9222	<i>A. porosus</i>	Coleoptera: Scarabaeidae	Australia
Ma 9223	<i>S. germinata</i>	Coleoptera: Scarabaeidae	Australia
Ma 9224	<i>Anaplognathus porosus</i>	Coleoptera: Scarabaeidae	Australia
Ma 9225	<i>Rhopaea verreauxi</i>	Coleoptera: Scarabaeidae	Australia
Ma 9226	<i>S. germinata</i>	Coleoptera: Scarabaeidae	Australia
Ma 9227	<i>Anaplognathus porosus</i>	Coleoptera: Scarabaeidae	Australia
Ma 9228	Hospedante desconocido		Holanda
Ma 9229	<i>Spp</i>	Homoptera: Cercopidae	Brasil
Ma 9230	<i>Spp</i>	Homoptera: Cercopidae	Brasil
Ma 9231	<i>Spp</i>	Homoptera: Cercopidae	Brasil
Ma 9232	<i>Bombix mori</i>	Lepidoptera: Bombycidae	Japón
Ma 9233	<i>Saltahojas</i>	Homoptera: Cicadellidae	Filipinas
Ma 9234	<i>Spp</i>	Homoptera: Cicadellidae	Belize
Ma 9235	<i>Spp</i>	Homoptera: Cercopidae	Belize
Ma 9236	Hospedante desconocido		Colombia
Ma 9237	<i>Plectris sp</i>	Coleoptera	Colombia
Ma 9301	<i>Ancognata spp</i>	Coleoptera: Scarabaeidae	Colombia
Ma 9302	<i>Prosapia</i>		
Ma 9303	<i>Hypotenemus hampei</i>	Coleoptera: Scotylidae	Colombia
Ma 9304	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Coleoptera: Curculionidae	Colombia
Ma 9401	Hospedante desconocido		
Ma 9601	<i>Atta cephalotes</i>	Hymenoptera: Formicidae	Colombia

presentaron un valor mayor o igual al 80% de respuesta en ambas variables, se caracterizaron fisiológicamente y morfológicamente.

Patogenicidad. El procedimiento siguió la metodología estandarizada por González *et al* (8). La evaluación se realizó durante 12 días y se registró la mortalidad diaria y las etapas del desarrollo de la micosis sobre el insecto, adicionando agua destilada estéril (ADE) donde fuere necesario para favorecer el desarrollo de la enfermedad causada por el hongo en el insecto.

Germinación. Se evaluó la capacidad germinativa de los aislamientos simultáneamente a la prueba de patogenicidad, utilizando suspensiones de esporas con concentraciones de 1×10^6 esp/ml. El procedimiento consistió en inocular alícuotas de 5 μ l en cajas de petri con 10ml de AA. Se marcó la cara posterior externa de las cajas de petri con 7 puntos correspondientes a los lugares donde se depositaron las alícuotas; posteriormente, se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente, tiempo después del cual se adicionó una gota de azul de lactofenol con el fin de suspender el proceso de germinación y teñir las esporas. Los puntos de inoculación se cortaron en cuadrados, se transfirieron a láminas portaobjetos y se cubrieron con una laminilla para proceder al recuento. La observación microscópica se realizó con un aumento de 400x, determinando la germinación en cinco campos microscópicos/alícuota, totalizando las esporas germinadas y no germinadas; los resultados se expresaron en porcentaje de esporas germinadas/repetición. Para cada aislamiento se utilizaron 5 cajas de petri por repetición.

III. Caracterización fisiológica y morfológica.

Se utilizaron las suspensiones de esporas de los aislamientos seleccionados en la etapa anterior, con una concentración de 1×10^6 esp/ml, conservados en glicerol al 10% y almacenados a -25°C , con el fin de asegurar disponibilidad del material biológico para cada una de las evaluaciones. Antes de su inoculación en los diferentes medios

de cultivo se sometieron a choque térmico a 37°C , utilizando baño de maría durante 10 minutos.

Caracterización fisiológica. Crecimiento radial. Se inocularon 5 μ l de las suspensiones, en el centro de cajas de petri con 10ml de SDA sin acidificar. El material se incubó a temperatura ambiente durante 30 días y se midió el crecimiento con un noniómetro cada dos días, a partir del quinto día de incubación. El diámetro de la colonia se expresó en milímetros. Para la evaluación de esta variable se usó un diseño completamente aleatorio con 10 repeticiones/aislamiento. Como repetición se tomó la caja de petri con el cultivo del hongo y para la comparación de promedios se usó la prueba de Duncan al 5%.

Producción de esporas. Esta actividad se desarrolló en forma simultánea a la anterior y se utilizaron las mismas suspensiones conidiales. La producción de esporas se determinó en dos medios de cultivo: SDA sin acidificar y AAB (agar-agua con broca al 0,96%), este último se evaluó para conocer la esporulación del hongo en presencia del insecto de interés y compararla con la obtenida en el medio sintético. Se inocularon alícuotas de 5 μ l en el centro de 10 cajas de petri con 10ml de cada uno de los medios en estudio y se incubaron a temperatura ambiente. Las evaluaciones de producción de esporas se realizaron al cabo de 8, 15, 21 y 30 días de incubación.

Se determinó el número de esporas generadas en cada tiempo de incubación mediante el depósito de la totalidad del cultivo presente en los 9cm de diámetro de caja de petri, en erlenmeyeres con 50ml de ADE+ tween 80 al 0,1%, los cuales se agitaron durante tres minutos. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas con un factor de dilución de 1/10, hasta llegar a la dilución que facilitara el recuento de esporas en cámara de Neubauer. Para analizar la información se realizó un análisis de varianza de una vía, con cinco repeticio-

nes/aislamiento/tiempo, considerando la caja de petri con el cultivo del hongo como la unidad experimental. Para tal efecto se llevó a cabo la transformación a logaritmo ($X+1000$) y posteriormente se realizó la prueba de Tukey al 5%.

Caracterización morfológica. La determinación de las características morfológicas como color, aspecto de la colonia, formación de sinemas, producción y difusión de pigmento de los aislamientos seleccionados en la etapa anterior se basó en la observación macroscópica de las colonias. El procedimiento consistió en inocular alícuotas de 5µl en el centro de 10 cajas de petri con 10ml de SDA sin acidificar, incubando a temperatura ambiente por 30 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección inicial de los aislamientos. La respuesta presentada por los aislamientos evaluados en las variables patogenicidad y germinación permitió establecer cuatro grupos: el primero, conformado por los aislamientos seleccionados para la caracterización (Tabla 2), el segundo, por aislamientos con porcentajes de patogenicidad > 80% y germinación < 80%; el

tercero, por aquellos que presentaron una patogenicidad < 80% y germinación > 80% y el último grupo incluyó los que presentaron patogenicidad y germinación < 80%. Al observar la respuesta de los aislamientos que conformaron los grupos 2 y 3 es posible afirmar que no se presentó asociación entre estas variables (Tabla 3).

Respecto a los aislamientos del primer grupo (Tabla 3), el mayor porcentaje de patogenicidad lo presentaron los aislamientos *Ma* 9230 y *Ma* 9234 con un 93%, y el menor, el aislamiento *Ma* 9227 con el 83%. Para el caso de la variable germinación, el mayor porcentaje lo presentaron los aislamientos *Ma* 9212 y *Ma* 9236, con 99,1% y el menor, el aislamiento *Ma* 9101 con 89,4%. En cuanto a la procedencia se halló que un 40% provenían de hospedantes del orden Coleoptera, 30% del orden Homoptera, y 30% restante de procedencia desconocida.

Teniendo en cuenta que se registró variabilidad patogénica y germinativa entre aislamientos provenientes de diferentes órdenes de insectos y zonas geográficas, se puede inferir que la capacidad patogénica y germinativa de los aislamientos no obedece al hospedante original de los mismos. Estos resultados confirman los hallaz-

TABLA 2. Valor máximo, mínimo y promedio de patogenicidad y germinación de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* seleccionados para el estudio de caracterización.

AISLAMIENTO	PATOGENICIDAD			GERMINACIÓN		
	Prom (%)	Max.	Min.	%	Max.	Min.
Ma9101	85,0	90,0	80,0	89,4	95,8	80,6
Ma9210	88,0	90,00	80,0	96,7	98,6	93,9
Ma9212	90,0	90,0	90,0	99,1	100,0	97,3
Ma9227	83,0	90,0	80,0	96,4	100,0	90,6
Ma9228	85,0	100,0	80,0	94,8	98,4	90,3
Ma9230	93,0	100,0	90,0	98,5	100,0	93,9
Ma9234	93,0	100,0	80,0	94,7	100,0	86,3
Ma9235	88,0	100,0	80,0	96,8	98,8	95,1
Ma9236	88,0	100,0	80,0	99,1	100,0	96,3
Ma9303	85,0	90,0	80,0	94,7	94,7	92,0

AISLAM: Aislamiento; %: Porcentaje.

TABLA 3. Agrupación de los aislamientos de *Metarhizium anisopliae* por patogenicidad a la broca del café y por germinación.

GRUPO	AISLAMIENTOS	Patogenicidad	Germinación
1	<i>Ma9101, Ma9210, Ma9212, Ma9227, Ma9228, Ma9230, Ma9234, Ma9235, Ma9236, Ma9303</i>	> 80%	> 80%
2	<i>Ma9003, Ma9004, Ma9201, Ma9206, Ma9208, Ma9221, Ma9222, Ma9223, Ma9232, Ma9237, Ma9601</i>	> 80%	< 80%
3	<i>Ma9105, Ma9106, Ma9202, Ma9205, Ma9207, Ma9211, Ma9220, Ma9224, Ma9229, Ma9231, Ma9301,</i>	< 80%	> 80%
4	<i>Ma9103, Ma9001, Ma9102, Ma9107, Ma9203, Ma9209, Ma9115, Ma9216, Ma9217, Ma9218, Ma9219, Ma9225, Ma9226, Ma9233, Ma9302, Ma9304, Ma9401</i>	< 80%	< 80%

gos de otros estudios donde no hubo correlación entre la patogenicidad y el hospedante de dichos aislamientos (16). También se observó que los aislamientos *Ma 9215, Ma 9216, Ma 9217 y Ma 9224* pertenecientes a la variedad *major*, mostraron baja patogenicidad hacia la broca. Éstos, fueron aislados inicialmente de los hospedantes *Porina, Oryctes rhinoceros*, hospedante desconocido y *Anaplognatus porosus*, respectivamente. En otros estudios se registró que aislamientos pertenecientes a la variedad *major* y de los cuales sus hospedantes originales son del género *Oryctes*, sólo presentaron patogenicidad hacia dicho orden insectil (6). De igual manera, estos aislamientos presentaron baja germinación, a excepción del aislamiento *Ma 9224*. En otros estudios, se registró esta misma tendencia de baja germinación, por parte de aislamientos de la variedad *major* (15).

Caracterización fisiológica y morfológica

Caracterización fisiológica. Crecimiento radial. Todos los aislamientos presentaron la misma tendencia a través del tiempo, mostrando la curva típica de crecimiento e iniciando con una fase no mensurable macroscópicamente, seguida de una fase de crecimiento acelerado en la cual hubo aumento en su diámetro de 5 a 10mm en cada medida; finalmente, se presentó un cre-

cimiento lento, con un incremento de 1 a 2mm de diámetro, lo cual se ilustra con los aislamientos *Ma 9227 y Ma 9235* (Figura 2). El análisis de varianza mostró diferencias entre aislamientos y la prueba de Duncan indicó que los aislamientos con mayor diámetro en un menor tiempo fueron: *Ma 9227, Ma 9228, Ma 9230, Ma 9101 y Ma 9236*, con valores entre 91,4 y 93,5mm para los 27 días de incubación; el menor diámetro lo presentaron los aislamientos *Ma 9235, Ma 9303, Ma 9212, Ma 9234 y Ma 9210*, con valores que oscilaron entre 87,4 y 89,5mm (Tabla 4).

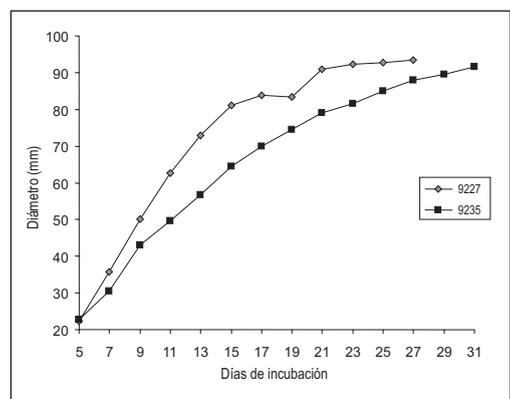


Figura 2. Crecimiento radial acumulado de aislamientos de *Metarhizium anisopliae*, *Ma 9227 y Ma 9235*, a través del tiempo de evaluación, en el medio Sabouraud Dextrosa Agar.

TABLA 4. Crecimiento radial de aislamientos de *Metarhizium anisopliae*, al cabo de 27 días de incubación

AISLAMIENTO	DIÁMETRO (mm)	CV
Ma 9101	91,4 ^{ab*}	1,2
Ma 9210	89,5 ^{bc}	2,3
Ma 9212	88,0 ^c	2,9
Ma 9227	93,5 ^a	0,0
Ma 9228	93,3 ^a	0,3
Ma 9230	91,5 ^{ab}	1,4
Ma 9234	88,1 ^c	1,6
Ma 9235	87,4 ^c	3,3
Ma 9236	91,4 ^{ab}	1,5
Ma 9303	87,9 ^c	5,4

*Aislamientos seguidos de la misma letra no difieren estadísticamente, según la prueba de Duncan (P = 0,05)

Milner (15), afirma que es posible que algunos aislamientos entren en un tipo de dormancia fisiológica, la cual los hace aptos para sobrevivir por períodos prolongados en el campo, fuera del insecto hospedante. Aquellos aislamientos que en el presente estudio mostraron el mayor crecimiento en menor tiempo, poseen ventaja comparativa sobre los demás, puesto que esta característica les permitirá un mejor desempeño en condiciones de campo.

Producción de esporas. En cuanto a la producción de esporas en SDA, se destaca el aislamiento *Ma 9235* que presentó una mayor producción

de esporas a los 15 días de incubación; sin embargo, no hubo diferencia estadística significativa con la producción a los 21 y 30 días. Los aislamientos *Ma 9228*, *Ma 9230*, *Ma 9234*, *Ma 9236* y *Ma 9303* presentaron la mayor producción a los 21 días y no se encontraron diferencias estadísticas con la producción a los 30 días, a excepción del aislamiento *Ma 9228*. Los aislamientos *Ma 9101*, *Ma 9210*, *Ma 9212* y *Ma 9227* presentaron la mayor producción de esporas a los 30 días. El análisis de varianza mostró diferencias estadísticas entre aislamientos y medios de cultivo.

A los 21 días de incubación, los aislamientos *Ma 9228* con $3,1 \times 10^8$ esp/ml y *Ma 9101* con $2,1 \times 10^8$ esp/ml presentaron el mayor número de esporas y el menor, el aislamiento *Ma 9210* con $2,1 \times 10^5$ esp/ml. Al cabo de 30 días se produjo el mayor número de esporas en los aislamientos *Ma 9101* (*Scapanes australis*) y *Ma 9228* (hospedante desconocido), con $6,5 \times 10^9$ esp/ml y $2,3 \times 10^8$ esp/ml, respectivamente, resultando estadísticamente diferentes. Los aislamientos *Ma 9210* (hospedante desconocido), *Ma 9234* (Homoptera) y *Ma 9303* (*H. hampei*), presentaron la menor producción de esporas, con un registro que osciló entre $2,3 \times 10^6$ esp/ml y $3,4 \times 10^6$ esp/ml; éstos últimos no presentaron diferencias estadísticas significativas entre ellos (Tabla 5).

TABLA 5. Producción de esporas de *Metarhizium anisopliae* en SDA (Saboraud Dextrosa Agar).

TIEMPO	8 Días		15 Días		21 Días		30 Días	
	NES (e/ml)	CV	NES (e/ml)	CV	NES (e/ml)	CV	NES (e/ml)	CV
Ma 9101	$1,5 \times 10^{7a}$	12,5	$5,5 \times 10^{7ab}$	36,2	$2,1 \times 10^{8a}$	42,2	$6,5 \times 10^{9a}$	158,7
Ma 9210	$2,0 \times 10^{4g}$	69,9	$1,3 \times 10^{5g}$	10,7	$2,1 \times 10^{5f}$	23,1	$3,4 \times 10^{6f}$	135,1
Ma 9212	$1,7 \times 10^{5d}$	19,9	$4,7 \times 10^{6d}$	118,9	$2,9 \times 10^{7c}$	52,1	$4,1 \times 10^{7de}$	58,7
Ma 9227	$1,5 \times 10^{5ef}$	193,4	$2,3 \times 10^{6e}$	92,6	$1,2 \times 10^{7d}$	84,5	$2,8 \times 10^{7de}$	78,7
Ma 9228	$1,6 \times 10^{7a}$	35,6	$8,6 \times 10^{7a}$	43,8	$3,1 \times 10^{8a}$	32,2	$2,3 \times 10^{8b}$	40,0
Ma 9230	$1,2 \times 10^{6c}$	159,6	$2,4 \times 10^{7bc}$	52,3	$4,4 \times 10^{7c}$	32,2	$5,3 \times 10^{7cd}$	60,4
Ma 9234	$1,6 \times 10^{5de}$	18,7	$1,4 \times 10^{6e}$	6,4	$3,4 \times 10^{6e}$	103,4	$2,9 \times 10^{6f}$	96,9
Ma 9235	$2,0 \times 10^{6b}$	31,1	$4,4 \times 10^{7ab}$	12,5	$3,9 \times 10^{7c}$	28,4	$4,4 \times 10^{7cd}$	22,8
Ma 9236	$1,9 \times 10^{6b}$	56,4	$3,5 \times 10^{7bc}$	24,3	$8,4 \times 10^{7b}$	30,0	$8,5 \times 10^{7cd}$	36,3
Ma 9303	$3,4 \times 10^{5ef}$	195,1	$7,9 \times 10^{5f}$	172,3	$1,7 \times 10^{6f}$	150,6	$2,4 \times 10^{6f}$	59,4

Aislam= Aislamiento; NES= Número de esporas; CV= Coeficiente de variación; e/ml= Esporas por mililitro; Promedios seguido de la misma letra no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de tukey (0,05).

En AAB, todos los aislamientos presentaron la mayor producción de esporas al cabo de 30 días de incubación. La mayor fue para el aislamiento *Ma 9212* (*Costelytra sp.*), con $3,9 \times 10^7$ esp/ml; este aislamiento fue a su vez estadísticamente diferente a los demás (Tukey 5%). La menor producción de esporas ocurrió en el aislamiento *Ma 9303* (*H. hampei*) con $3,7 \times 10^6$ esp/ml, el cual no mostró diferencias estadísticas con los aislamientos *Ma 9236* (hospedante desconocido), *Ma 9235* (Homoptera) y *Ma 9230* (Homoptera) (Tabla 6). Aunque la mayoría de los aislamientos tuvieron mayor esporulación en el medio sintético, los aislamientos *Ma 9234* (Homoptera), *Ma 9210* y *Ma 9303* respondieron mejor en AAB, y sólo el aislamiento *Ma 9212* tuvo producción similar en ambos medios.

Shaerffenberg (21), establece que la cantidad relativa de fuentes de C (carbono) y N (nitrógeno) disponible para los hongos determina si ellos producen esporas o micelio. Otros autores afirman que algunos de los materiales que componen la cutícula del insecto contienen un número de sustancias antifúngicas capaces de interferir en el desarrollo de los hongos entomopatógenos (12).

La esporulación de los aislamientos en el medio sintético puede explicarse teniendo en

cuenta la complejidad de los nutrientes presentes. El medio sintético está conformado por glucosa y peptona, componentes simples si se comparan con los polímeros constituyentes de la cutícula del insecto, por tanto, es posible que el proceso de degradación de la cutícula pueda influir en la respuesta esporulativa de los aislamientos en el medio adicionado con broca del café.

Los resultados obtenidos en esta variable indican que no necesariamente la alta producción de esporas está asociada a una mayor virulencia del hongo hacia el insecto sobre el cual se dirige el control, tal es el caso del aislamiento *Ma 9303*, con un porcentaje de patogenicidad de 85%, cuyo hospedante original es la broca del café y cuya producción de esporas fue significativamente menor en ambos medios evaluados. Este comportamiento está de acuerdo con otros estudios, donde se evaluó la producción de esporas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en sustrato arroz y broca, observándose que no existe asociación entre las variables patogenicidad y esporulación (17).

De manera general, cada aislamiento mostró una respuesta esporulativa variable dependiendo del sustrato. En otros estudios en los cuales se evaluó la producción de esporas de *B. bassiana*,

TABLA 6. Producción de esporas de *Metarhizium anisopliae* en AAB (Agar- Agar al 0,96% de broca macerada)

TIEMPO	8 Días		15 Días		21 Días		30 Días	
	NES (e/ml)	CV	NES (e/ml)	CV	NES (e/ml)	CV	NES (e/ml)	CV
<i>Ma 9101</i>	$1,4 \times 10^{5bc}$	35,4	$1,5 \times 10^{6a}$	41,9	$3,6 \times 10^{6b}$	69,9	$2,0 \times 10^{7b}$	71,3
<i>Ma 9210</i>	$1,1 \times 10^{5cd}$	48,8	$1,1 \times 10^{6ab}$	43,1	$2,0 \times 10^{6c}$	114,7	$1,4 \times 10^{7b}$	40
<i>Ma 9212</i>	$2,0 \times 10^{5ab}$	41,1	$8,9 \times 10^{5b}$	50,1	$5,6 \times 10^{6a}$	17,1	$3,9 \times 10^{7a}$	29,2
<i>Ma 9227</i>	$1,3 \times 10^{5c}$	32,2	$7,7 \times 10^{5bc}$	47,7	$2,2 \times 10^{6bc}$	35,1	$1,6 \times 10^{7b}$	48,1
<i>Ma 9228</i>	$1,6 \times 10^{4f}$	43,9	$2,9 \times 10^{5d}$	53,2	$2,5 \times 10^{6bc}$	49,4	$2,1 \times 10^{7b}$	78,3
<i>Ma 9230</i>	$2,0 \times 10^{5a}$	23,2	$8,1 \times 10^{5b}$	34,4	$2,3 \times 10^{6bc}$	42,6	$3,9 \times 10^{6c}$	44,2
<i>Ma 9234</i>	$1,8 \times 10^{5c}$	22,8	$5,3 \times 10^{5c}$	25,9	$2,4 \times 10^{6bc}$	43,7	$2,2 \times 10^{7b}$	78,6
<i>Ma 9235</i>	$6,6 \times 10^{4e}$	54,6	$3,7 \times 10^{5d}$	40,9	$2,8 \times 10^{6b}$	30,2	$5,0 \times 10^{6c}$	57,5
<i>Ma 9236</i>	$1,2 \times 10^{5c}$	29,5	$7,8 \times 10^{5bc}$	41,2	$1,9 \times 10^{6c}$	37,0	$4,8 \times 10^{6c}$	32,9
<i>Ma 9303</i>	$9,6 \times 10^{4de}$	63,8	$4,0 \times 10^{5d}$	61,2	$1,2 \times 10^{6d}$	78,6	$3,7 \times 10^{6c}$	32,6

Aislam= Aislamiento; NES= Número de esporas; CV= Coeficiente de variación; e/ml= Esporas por mililitro; Promedios seguidos de la misma letra no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Tukey (0,05).

en diferentes medios de cultivo, el comportamiento de los aislamientos fue distinto para los diferentes medios de cultivo (18).

Con base en los resultados anteriores, puede inferirse que el medio de cultivo SDA ofrece mejores condiciones para la esporulación, en comparación con el medio AAB.

Caracterización morfológica. El aspecto de las colonias varió de algodonoso, aterciopelado a compacto, aún en un mismo aislamiento (Figura 3); esta característica se encuentra influenciada por la proporción existente de micelio y esporas, de modo que cuando la proporción de micelio es mayor a la producción de esporas, su aspecto es algodonoso. De la misma manera, si la proporción de esporas es superior, su aspecto será compacto y se evidencia el color. La esporulación, varió de amarillo a verde en diferentes intensidades (Figura 4).

Estas características morfológicas, no permiten la diferenciación entre aislamientos debi-



Figura 3. Aspecto macroscópico de colonias del aislamiento de *Metarhizium anisopliae*, Ma 9235, en el medio Sabouraud Dextrosa Agar.

Figura 4. Color de la esporulación presentada por *Metarhizium anisopliae* en el medio Sabouraud Dextrosa Agar



do a la alta variabilidad presentada aún en un mismo aislamiento, tal como se menciona en otros estudios (27).

La formación de sinemas se presentó en condiciones de laboratorio bajo luz constante, por los aislamientos *Ma* 9210 (en forma variable) y *Ma* 9303 (de manera más uniforme y abundante); el tiempo de aparición estuvo entre 15 a 21 días de incubación, para ambos aislamientos. En la parte superior de los sinemas, se observó un color amarillo mostaza, dado por el cúmulo de esporas presentes en las cabezas de dichos sinemas (Figura 5), característica que puede favorecer la dispersión de éstas, puesto que están depositadas en una parte donde pueden ser fácilmente removidas por corrientes de aire. Otros estudios registran la formación de sinemas en *Penicillium claviforme*, cuando se alternó luz y oscuridad (4). Varela y Morales (24), afirman que esta característica puede permitir la diferenciación entre aislamientos.

Se observó producción de pigmento en todos los aislamientos en forma variable, con excepción del aislamiento *Ma* 9228, el cual mostró color de amarillo a anaranjado ó de rosado a rojo vino. La difusión del pigmento caracterizada por el cambio de color del medio de cultivo a un



Figura 5. Formación de sinemas por el aislamiento de *Metarhizium anisopliae*, *Ma* 9303, en el medio Sabouraud Dextrosa Agar.

amarillo intenso, la presentaron los aislamientos *Ma* 9212, *Ma* 9235 y *Ma* 9234; en este último fue variable. Algunos estudios registran que los aislamientos de *Beauveria bassiana* intensamente pigmentados fueron más patogénicos que aquellos que no produjeron pigmento (5).

Los aislamientos que difundieron su pigmento en el medio presentaron una patogénicidad que osciló entre 88% y 93%; sin embargo, esta característica no puede atribuírse sólo a aquellos aislamientos con un mayor grado de patogénicidad, ya que los aislamientos que no presentaron difusión de pigmento fueron altamente patogénicos hacia la broca.

La difusión de pigmento puede ayudar en la diferenciación de aislamientos; es así como algunos estudios de caracterización de aislamientos de *B. bassiana*, muestran que la producción de oosporeina permite la diferenciación de éstos (24). Esta característica debe ser aprovechada en la formulación de un bioinsecticida, ya que la producción de pigmento ha sido asociada con la resistencia de las esporas en condiciones naturales (9).

A la luz de los resultados es posible inferir que estas características en forma conjunta pueden contribuir a establecer parámetros de comparación y diferenciación entre los aislamientos.

En términos generales se registró gran variabilidad en la expresión genotípica de los aislamientos principalmente en los parámetros morfológicos; sin embargo, se destacaron los aislamientos *Ma* 9101 y *Ma* 9228, por presentar homogeneidad en la mayoría de los parámetros evaluados.

En cuanto al color de la esporulación, Tulloch en 1976 (23), sugirió que este parámetro solamente tiene mérito como valor taxonómico secundario. Sin embargo, la identificación de hongos entomopatógenos aún se basa en criterios morfológicos (7, 20, 24).

La caracterización fisiológica de los hongos entomopatógenos constituye una herramienta para identificar variabilidad entre éstos y seleccionar patotipos con características adaptativas que favorecen su sobrevivencia y eficacia como micoinsecticidas (7, 24). Sin embargo, se hace necesario correlacionar estos parámetros con estudios moleculares que permitan determinar el origen genético de los aislamientos y su relación con la virulencia sobre el insecto al cual se dirige el control.

LITERATURA CITADA

1. AVILA DE M., C.; UMAÑA, M. I. Aspectos de la biología y patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, sobre *Aneolamia varia*. Revista ICA 23: 155-161. 1988.
2. BERNAL U., M. G. Concentración letal media y tiempo letal medio de *Metarhizium anisopliae* sobre la broca del café. In: CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ. Cenicafé. Informe anual de actividades de la Disciplina de Entomología 1991-1992. Chinchiná, Cenicafé, 1992. s.p.
3. BRADY, B. L. K. *Metarhizium anisopliae*. Commonwealth Mycological Institute. N° 509:2p. 1979. Citado por: LUJAN, M. La importancia de *Metarhizium anisopliae* como insecticida microbiológico en el control de plagas nocivas. Boletín de Reseñas: Protección de Plantas N°27-28: 7-26.1988.
4. CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. The fungi. London, Academic Press, 1994. p.126.
5. FENG, M. G; JOHNSON, J. B. Relative virulence of six of *Beauveria bassiana* on *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). Environmental Entomology 19 (3): 785-790. 1990.
6. FERRON, P; HURPIN, B.; ROBERT, P. H. Sur la espécifité de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Entomophaga 17: 165-178. 1972.
7. GÓMEZ, D. R. S.; ALVES, S. B.; MILANI, M. T. Characterization an phenetic analysis of geographical isolates of *Beauveria spp.* Pesquisa Agropecuária Brasileira 29 (3): 401-409. 1994.
8. 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.
9. GRIFFIN, D. H. Fungal physiology. New York, Wiley - Liss, 1994. 458 p.
10. GUO, H. L.; YE, B. L.; CHEN, Q. T.; YUC, Y. Y.; FU, C. S. Three new species of *Metarhizium*. Acta Mycologic Science 5: 177-184. 1986. Citado por: ZIMMERMANN, G. The entomopatogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potencial as biocontrol agent. Pesticide Science 37: 375- 379. 1993.
11. HALL, R. A.; PAPIEROK, B. Fungi as biological control agents of arthropods agricultural and medical importance. Parasitology 84: 205-240. 1982.
12. KOIDSUMI, K. Antifungal action cuticular lipids in insects. Journal of Insect Physiology 1: 40-45. 1957. Citado por: KHACHATOURIANS, G. Physiology and genetics of entomopatogenic fungi. In: ARORA, D. K.; AJELLO, L.; MUKERJI, K. J. Handbook of Applied Micology: Humans, Animals and Insects. New York, Marcel Dekker, 1991. p. 613-663.
13. LE PELLEY, R. H. Las plagas del Café. Barcelona, Labor, 1968. p. 140-162.
14. MARTIGNONI, M. E. Producción masiva de patógenos de insectos. In: DE BACH, P. Control biológico de las plagas de insectos. México, Compañía Editorial Continental, 1987. p. 679-713.
15. MILNER, R. J.; HUPPATZ, R. J.; SWARIS, S. C. A new method for assessment of germination of *Metarhizium* conidial. Journal of Invertebrate Pathology 57: 121-123. 1991.
16. MOORHOUSE, E. R.; GILLESPIE, A. T.; CHARNLEY, A. K. Laboratory selection of *Metarhizium anisopliae* spp isolates for control of vine weevil larvae (*O. sulcatus*). Journal of Invertebrate Pathology 62: 15-21. 1993.
17. NARVAEZ G., M. DEL P. Estimación de la cantidad de esporas producidas por los aislamientos patogénicos de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, cultivados en arroz y sobre broca del café. Manizales, Universidad Católica. Facultad de Bacteriología, 1996. 66p. (Tesis: Bacterióloga y Laboratorista Clínico).

18. PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; AZEVEDO, J. L. Viabilidae natural do fungo entomopatogénico *Beauveria bassiana*. Arquivos de Biología e Tecnologia 33 (3): 665-672. 1990.
19. ROMBACH, M. C.; HUMBER, R. A.; EVANS, H. C. *Metarhizium album* a fungal pathogen of leaf and planthoppers of rice. Transaction of the British Mycological Society 88: 451-459. 1987.
20. SAMSON, R. A. Constrains associated with taxonomy of biocontrol fungi. Canadian Journal of Botany 73: 83-88. 1995. (Suppl 1)
21. SCHAEFERFFENBERG, B. Biological conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Journal of Insect Pathology 66: 8-20. 1964.
22. ST. LEGER, R. J.; DURRANDS, P. K.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Role of extracellular chemoelastasa in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. Journal of Invertebrate Pathology 52: 285-293. 1988.
23. TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. Micología y Fitopatología 66 (3): 407-411. 1978.
24. VARELA, A.; MORALES, E. Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. Journal of Invertebrate Pathology 67: 147-152. 1996.
25. VEEN, K. H. Recherches sur la maladie due à chez le criquet pèlerin. Wageningen, H. Veenman & Zohen, N.V., 1968. 78p. (Mededelingen Landbouwhogesschool 68-5).
26. VÉLEZ A., P. E.; POSADA F., F. J.; MARIN M., P.; GONZÁLEZ G., M. T.; OSORIO V. E.; BUSTILLO P., A. E. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Boletín Técnico Cenicafé No 17:1-34. 1997.
27. YIP, H.Y.; RATH, A. C.; KOENT, T. B. Characterization of *Metarhizium anisopliae* isolates from tasmanian pasture soils and their patogenicity to Redheaded cockchafer (Coleoptera Scarabaeidae: *Adoryporus couloni*). Mycological Research 96: 92-96. 1992.