

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Beauveria bassiana*

Patricia E. Vélez-A. *, María T. González-G.**, Ana M. Valderrama-F.***, María N. Estrada-V.****, Álex E. Bustillo-P.****, Esther C. Montoya-R.*

RESUMEN

VÉLEZ A., P.E.; GONZÁLEZ G., M.T.; VALDERRAMA F., A.M.; ESTRADA V., M.N.; BUSTILLO P., A.E.; MONTOYA R., E.C. Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de aislamientos de *Beauveria bassiana*. Cenicafé 51(3): 196-206. 2000.

Se caracterizaron 17 aislamientos multiespóricos de *B. bassiana* según las variables fisiológicas: patogenicidad a la broca del café, producción de esporas, germinación, tasa de crecimiento diario de las colonias y tamaño de esporas, y las variables moleculares a través de la técnica RAPDS mediante el uso de primers universales. Para las variables fisiológicas se realizó un análisis multivariado de componente principal y el dendrograma, con el fin de seleccionar grupos de aislamientos. Posteriormente un análisis de varianza de los grupos ($P=0,05$) y una prueba de Duncan al 5%. Adicionalmente, un análisis de varianza de los grupos según la variable morfológica y una prueba de Duncan al 5%. Las variables moleculares se evaluaron mediante el coeficiente de similitud de Jaccard, para calcular la distancia genética y un dendrograma por el método UPGMA. Los grupos de aislamientos clasificados según el dendrograma se compararon a su vez en las variables fisiológicas y morfológicas. En la clasificación fisiológica ninguna de las variables permitió la separación de los tres grupos de aislamientos, mientras que la variable fisiológica producción de esporas y la morfológica tamaño, definieron los dos grupos de la clasificación molecular. No hubo diferenciación evidente de grupos según los criterios fisiológicos considerados; sin embargo, la clasificación molecular definió dos grupos de aislamientos según criterios morfológicos y fisiológicos.

Palabras claves: Control biológico, hongos entomopatógenos, *Beauveria bassiana*, caracterización, broca del café, *Hypothenemus hampei*.

ABSTRACT

Seventeen multispore isolates of *B. bassiana* were characterized according to physiological traits: pathogenicity to coffee berry borer, spore production, germination, daily growth rate of colonies, and spore size, and molecular variables with the RAPD technique with universal primers. For physiological variables, a multivariate analysis with principal components and dendrogram was carried out with the purpose of selecting isolate groups. For morphological variables, analysis of variance and Duncan Test were carried out. Molecular variables were evaluated by means of the Jackard coefficient used to calculate genetic distances and a dendrogram by the UPGMA method. Groups generated by the dendrogram were compared to the results of the physiological and morphological data analysis. In the physiological classification no variable allowed distinction of the three groups of isolates. The physiological variable spore production and the morphological variable spore size defined two groups in the molecular classification. There were no differences according to the physiological criteria, but the molecular analysis indicated two groups according to morphological and physiological criteria.

Keywords: Biological control, entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, characterization, coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*.

-
- * Investigador Científico I, Entomología y Biometría, respectivamente. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.
** Asistente de Investigación, Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.
*** Microbióloga, Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia
**** Auxiliar IV e Investigador Principal I, Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

La broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari), (Coleoptera: Scolytidae) es en la actualidad el insecto plaga que mayor daño causa al cultivo del café porque su ataque se dirige a la almendra donde puede reproducirse (9). Posee la mayor importancia económica en Colombia y en la mayoría de los países productores de café. Desde su detección en Colombia, en 1988, la Federación de Cafeteros, a través de Cenicafé ha promovido investigación en otras alternativas de control, usando un programa de manejo integrado. El control biológico con parasitoides y en especial, con el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bb) constituye un medio promisorio de control, teniendo en cuenta que los insectos del orden Coleoptera son conocidos por su susceptibilidad al ataque del hongo; así mismo, ofrece una alternativa al uso de los plaguicidas químicos que afectan la salud humana y animal (2).

Cenicafé cuenta con una colección de hongos entomopatógenos conformada por 131 aislamientos del hongo *B. bassiana* de diversos países y órdenes insectiles. En 1996 se inició un estudio de caracterización de los aislamientos, con el fin de seleccionar cepas mejoradas para utilización en campo en el manejo integrado de la broca. Este estudio tuvo como objetivo, la evaluación morfológica, fisiológica y molecular de los diferentes aislamientos de la colección para seleccionar las variables que permitieran establecer diferencias entre éstos, definir grupos de aislamientos según localidad y/o hospedante y definir la especificidad de hospedantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos. Se evaluó un grupo de 17 aislamientos de *B. bassiana*, los cuales se relacionan en la Tabla 1, donde aparece el número de código, hospedante y localidad. Los aislamientos usados en los diferentes experimentos fueron cultivados en Sabouraud Dextrosa Agar (SDA)

durante 15 días a 25°C y posteriormente activados a través de la broca del café (17).

Tamaño de la spora. Se determinó en láminas portaobjetos, en las cuales se depositaron gotas de una suspensión de concentración conocida de esporas (1×10^6 esp/ml) de cada uno de los aislamientos en evaluación, en Tween 80 al 1%. Con un micrómetro adaptado al microscopio usando el objetivo 100x se midió un total de 100 esporas por aislamiento.

Viabilidad. Se midió a través del porcentaje de germinación de las esporas en agar SDA. Se depositaron en cada caja de Petri siete alícuotas de cinco microlitros (1×10^6 esp/ml), para un total de 10 repeticiones por aislamiento. Las cajas se sometieron a incubación durante 24 horas, a 25°C y luego se llevó a cabo la evaluación microscópica de las esporas germinadas. El porcentaje de germinación se determinó mediante la evaluación de un mínimo de 100 esporas germinadas y no germinadas por alícuota, considerando como espora germinada aquella cuyo tubo germinativo era igual o mayor al diámetro de la spora.

Patogenicidad. Para su determinación se distribuyeron en seis grupos 60 hembras de la broca y se mantuvieron individualmente en viales, a 27°C y 55% de HR. Los insectos se inocularon con el hongo por inmersión en una suspensión de esporas, a razón de 1×10^7 esp/ml en agua destilada estéril más Tween 80 al 1%. Posteriormente se confinaron en el vial de vidrio (volumen: 4ml), que contenía una almendra de café con un contenido de humedad del 45% y un disco de papel de filtro humedecido, el cual finalmente se selló con un tapón de algodón. Con observaciones diarias y durante 10 días, se evaluó la mortalidad de la broca y la presencia de signos y síntomas de la infección causada por el hongo (5).

Producción de esporas. Los aislamientos se sembraron en cajas de Petri con medio SDA, con

TABLA 1. Origen, hospedante, grupo de clasificación (morfológico, fisiológico y molecular) y promedio individual de los aislamientos en las variables fisiológicas evaluadas.

Aislamiento	Origen	Hospedante	PRUEBA		Tamaño esporas (TE)		Patogenicidad a la broca (PPB) %		Producción de esporas (E) (10 ⁸)		Tasa diaria (TCD) (cm)		Germinación (PG) %		
			Morfo-lógico	Fisio-lógico	Molecu-lar	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV
Bb 9005	Nariño (Colombia)	Desconocido	1	1	1	2,04	6,30	78,28	12,76	23	47,05	0,19	6,42	78,40	1,45
Bb 9008	Magdalena (Colombia)	<i>Leptotharsa gibbicularina</i> /Hemiptera : Tingidae	2	1	1	2,42	16,91	77,50	12,35	14	46,64	0,18	15,90	87,00	5,86
Bb 9010	Colombia	<i>Hypothenemus hampei</i> / Coleoptera : Scolytidae	3	3	1	2,62	12,10	15,00	38,49	5	111,2	0,18	12,0	86,40	3,80
Bb 9012	Antioquia (Colombia)	<i>Hypothenemus hampei</i> / Coleoptera : Scolytidae	3	1	1	2,75	9,13	91,63	3,65	5	56,68	0,34	18,53	84,00	6,07
Bb 9021	Ecuador	<i>Hypothenemus hampei</i> / Coleoptera : Scolytidae	2	1	1	2,39	9,67	91,63	7,00	11	69,97	0,19	7,91	80,00	1,25
Bb 9023	Filipinas	<i>Leptocorisa</i> sp / Hemiptera : Coreidae	1	1	2	2,17	16,75	61,65	42,65	23	68,05	0,17	22,89	82,40	5,46
Bb 9101	Nariño (Colombia)	<i>Hypothenemus hampei</i> / Coleoptera : Scolytidae	1	3	1	2,04	6,30	31,65	43,34	16	59,62	0,14	31,70	73,20	3,26
Bb 9108	Antioquia (Colombia)	<i>Hypothenemus hampei</i> / Coleoptera : Scolytidae	1	3	1	2,07	10,37	15,00	66,66	3	80,76	0,19	5,62	83,20	3,22
Bb 9116	Risaralda (Colombia)	<i>Hypothenemus hampei</i> / Coleoptera : Scolytidae	2	1	1	2,43	10,18	95,00	10,52	12	65,05	0,18	5,56	77,80	1,07
Bb 9117	Valle (Colombia)	<i>Hypothenemus hampei</i> / Coleoptera : Scolytidae	1	1	1	2,11	12,41	73,32	7,42	10	48,25	0,19	4,62	80,20	2,04

TABLA I. Continuación ...

Aislamiento	Origen	Hospedante	PRUEBA		Tamaño esporas (TE)	Patogenicidad a la broca (PPB) %	Producción de esporas (E) (10 ⁸)	Tasa diaria (TCD) (cm)	Germinación (PG) %						
			Morfo-lógico	Fisio-Molecu-lar											
					\bar{x}	CV	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV					
Bb 9120	Risaralda (Colombia)	<i>Hypothenemus hampei</i> / Coleoptera : Scolytidae	1	3	1	2,26	11,57	11,65	71,96	27	72,82	0,22	8,65	91,60	8,65
Bb 9204	Santander (Colombia)	<i>Antaeotricha</i> sp / Lepidoptera : Stenomidae	1	1	1	2,12	10,12	90,00	12,83	2	51,58	0,17	3,66	89,80	2,14
Bb 9207	Risaralda (Colombia)	<i>Hypothenemus hampei</i> / Coleoptera : Scolytidae	3	1	1	2,61	11,73	86,65	8,86	3	58,90	0,17	14,96	74,00	3,93
Bb 9209	Antioquia (Colombia)	<i>Cyclocephalasp</i> / Coleoptera : Scarabeidae	2	1	1	2,44	10,66	64,98	39,63	7	83,69	0,28	18,77	75,40	4,83
Bb 9212	Risaralda (Colombia)	<i>Hypothenemus hampei</i> / Coleoptera : Scolytidae	2	1	1	2,39	12,46	86,63	12,58	5	80,65	0,35	8,01	93,60	3,51
Bb 9305	Huila (Colombia)	<i>Hypothenemus hampei</i> / Coleoptera : Scolytidae	2	1	1	2,37	9,30	53,30	10,26	22	64,07	0,20	11,72	85,80	8,29
Bb 9416	Risaralda (Colombia)	<i>Hypothenemus hampei</i> / Coleoptera : Scolytidae	2	2	1	2,53	10,05	65,00	15,38	21	32,76	0,37	18,15	27,60	13,21

\bar{x} : Promedio

CV: Coeficiente de variación

el fin de hacer el recuento de las esporas producidas. A los 8, 15, 21 y 30 días de incubación, con el contenido de las cajas de Petri se hicieron suspensiones en 5ml de una solución acuosa de Tween 80 al 1% y a partir de ésta, se realizaron diluciones sucesivas en un factor de 10 y se realizó el recuento de esporas por mililitro en el hemocitómetro. Se utilizaron diez repeticiones por aislamiento y para cada repetición se consideró el promedio de seis lecturas.

Crecimiento diametral. Este crecimiento se evaluó en cajas de Petri con medio SDA, inoculadas en el centro con 5ml de una suspensión de esporas de concentración de 1×10^6 esp/ml, para un total de 10 repeticiones por aislamiento. Posteriormente se llevaron las cajas a incubación, con una temperatura de 25°C. Los registros se llevaron a partir del quinto día después de la inoculación y al cabo de éste, se midió el diámetro de crecimiento cada dos días, por un período de 30 días para cada aislamiento. Para el análisis de la información se consideró la tasa promedio de crecimiento diario de cada uno de los aislamientos evaluados.

Prueba RAPD'S. De cada uno de los aislamientos sembrados en Agar Sabouraud Dextrosa se obtuvo micelio en medio líquido GYM (medio glucosa-extracto de levadura) incubando en agitación orbital (150rpm) a 25°C durante 6 días. El micelio se recuperó por filtración al vacío utilizando papel filtro Whatman No 1, lavando dos veces el micelio filtrado con agua ultrafiltrada estéril. Éste se liofilizó y se almacenó a -20°C hasta la extracción del ADN. Para tal propósito se utilizó una modificación del método de extracción con bromuro de acetil-trimetilbromuro de amonio (CTAB) (20). Se pesaron entre 50 y 100mg del micelio liofilizado y se homogeneizó adicionando nitrógeno líquido hasta obtener micelio pulverizado. A éste se le agregaron 5ml del buffer de extracción (700mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10mM EDTA; 2% (p/v) CTAB; 1% mercaptoetanol). Después de incubar 1 hora a 60°C, se realizaron dos

extracciones consecutivas con 5ml de cloroformo:isoamilalcohol (24:1). Después de centrifugar a 3.500rpm (15min) se recuperó el sobrenadante, se adicionaron 0,54V de isopropanol y se colectó el precipitado por centrifugación a 14.000rpm (15 min a 4°C). Éste fue disuelto en 500µl de buffer TE (10mM Tris-HCl pH=8,0; 1mM EDTA pH=8,0), se adicionaron 5µl de ARNasa A (10mg.ml⁻¹) y se incubó por 1 hora a 37°C. Después de la digestión del ARN se adicionaron 500µl de cloroformo: isoamilalcohol (24:1) y se recuperó el sobrenadante después de centrifugar a 3.500rpm durante 15 minutos. El ADN se precipitó con 2V de etanol absoluto, se colectó por centrifugación a 3.000rpm (2-3 min, a 4°C) y se disolvió en 100µl de buffer TE.

Las extracciones se almacenaron a -20°C hasta su uso. Se realizaron como mínimo dos extracciones de ADN por aislamiento que fueron utilizadas independientemente en las reacciones de amplificación (RAPD). Para determinar la pureza del ADN extraído se hizo por espectrofotometría un barrido entre $A_{220-320}$ nm, determinando la absorbancia a A_{260} nm con la que se halló la concentración de ADN y se calculó la relación A_{260}/A_{280} para detectar la contaminación con proteínas. La integridad del ADN se analizó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, se coloreó con bromuro de etidio (0,5µg.ml⁻¹) y se observó con luz ultravioleta (15).

Se evaluaron 3 iniciadores universales aleatorios MR (GAG GGT GGC GGT TCT), RY (CGG CTT GGGT) y 71 (CAG CAG CAG CAG CAG) (Gibco-BRL, Life Technologies). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en 25ml que contenían: 1,25 U *Taq* ADN polimerasa (Gibco-BRL); 200mM de cada uno de los desoxiribonucleótidos (dCTP, dATP, dGTP, dTTP); 20mM Tris-HCl pH=8,4; 50mM KCl; 1,75mM MgCl₂; 0,6mM iniciador; aproximadamente 50ng de ADN y agua ultrafiltrada. La amplificación se realizó en un termociclador

MJ-Research PTC-200 con el siguiente programa: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos; seguido por 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 36°C, 2 minutos a 72°C; y un último ciclo de extensión a 72°C por 5 minutos.

Los productos de la amplificación se analizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1,5% usando 1X del buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) y se corrió durante 2 horas a 60V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV.

Con las fotografías de los geles de electroforesis se verificó la capacidad de reproducción de las bandas y sólo se tomaron en cuenta bandas reproducibles y de fuerte intensidad. El polimorfismo del ADN se identificó cuando se presentaba una banda en un aislamiento, pero estaba ausente en otro. Se elaboró una matriz de datos asignando el valor de 1 cuando estuviera la banda presente y 0 cuando estuviera ausente. Con esta matriz se calculó el coeficiente de similitud de Jaccard (S) expresado como: $S_{ij} = a / a+b+c$. Donde S_{ij} es la similitud entre 2 aislamientos, i y j ; a es el número de bandas presentes en los dos aislamientos ij ; b es el número de bandas presentes en i y ausentes en j ; y c es el número de bandas presentes en j y ausentes en i . Este coeficiente de similitud excluye bandas ausentes en dos aislamientos, ya que la mutua ausencia no puede ser atribuida a una causa común y por consiguiente a similitud (11). Con este coeficiente se calculó la distancia genética D con la siguiente ecuación: $D_{ij} = 1 - S_{ij}$. Con base en la matriz de distancia genética se elaboró un dendrograma, usando el método de agrupamiento no ponderado para grupos pares UPGMA (16). Los cálculos de coeficientes de similitud, distancia genética y dendrogramas se realizaron con el programa Similit (SAS versión 6.12.).

Para el análisis de la información se identificaron las variables que determinan los aspectos morfológicos, fisiológicos y moleculares. Se

procedió a la separación de las variables en tres grupos: morfológicas, a través de la evaluación del tamaño de esporas; fisiológicas, mediante la evaluación de las variables porcentaje de patogenicidad a la broca del café, porcentaje de germinación, tasa de crecimiento diario, recuento de esporas y variables moleculares, mediante el empleo de la técnica RAPD'S utilizando primers universales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta el conjunto de variables fisiológicas evaluadas en los 17 aislamientos de *B. bassiana*, el análisis multivariado mostró que el componente principal No 1, conformado por las variables porcentaje de germinación y tasa de crecimiento diario, explicó el 36,77% de la variación total, mientras las otras dos variables (producción de esporas y patogenicidad sobre broca) del componente principal No 2, explicaron el 32,94% de la variación, para un total acumulado en los componentes principales de 69,71%.

Se amplificaron en total 39 bandas con los tres primers evaluados, de las cuales el 95% fueron bandas polimórficas. El dendrograma obtenido con base en el análisis de las variables moleculares permitió la clasificación de dos grandes grupos de aislamientos. El grupo 1 conformado por 16 aislamientos y el grupo 2 conformado por un sólo aislamiento (Bb 9023) (Figura 1). En el grupo 1 se destacan a su vez tres subgrupos de seis aislamientos, siete y tres, respectivamente.

El análisis de las variables fisiológicas: patogenicidad sobre la broca del café, porcentaje de germinación, producción de esporas y tasa de crecimiento diario, clasificó tres grupos de aislamientos en una forma descriptiva, según el dendrograma (Tabla 2). El grupo 1 conformado por 12 aislamientos, el grupo 2 conformado por

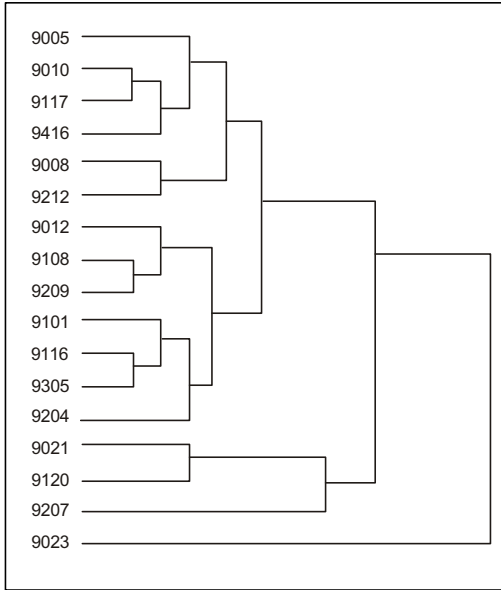


Figura 1. Dendrograma de los 17 aislamientos de *B. bassiana* evaluados según las variables moleculares (Distancias: Jackard, 1908 - Método cluster: UPGMA).

1 aislamiento y el grupo 3, por 4 aislamientos (Figura 2).

El grupo 2, con el mayor valor promedio de la variable tasa de crecimiento diario, el menor promedio de la variable porcentaje de germinación y el mayor valor promedio de la variable producción de esporas fue estadísticamente diferente a los grupos 1 y 3, y estos últimos a su vez, fueron iguales estadísticamente, según Duncan al 5% (Tabla 2).

El grupo 3, con el menor promedio de la variable porcentaje de patogenicidad sobre la broca del café, fue estadísticamente diferente a los grupos 1 y 2 y, éstos a su vez fueron iguales estadísticamente según Duncan al 5%, con el mayor valor promedio para los aislamientos del grupo 1 (Tabla 2).

El análisis molecular permitió identificar diferencias entre aislamientos según la distribu-

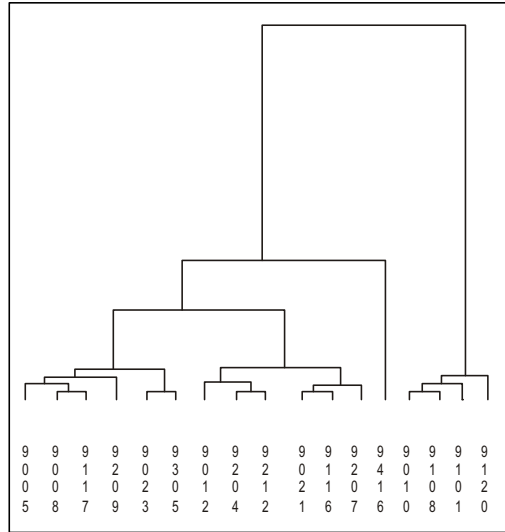


Figura 2. Dendrograma de los 17 aislamientos de *B. bassiana* evaluados según variables fisiológicas.

ción geográfica; fue así como el aislamiento Bb 9023 procedente de Filipinas se ubicó en un grupo aparte (Grupo 2), lo que puede atribuirse quizás al insecto del cual fue aislado *Leptocoris* sp. (Hemiptera:Coreidae); sin embargo, otro aislamiento procedente de insectos del mismo orden pero diferente familia (Bb 9008) se agrupó entre aislamientos provenientes en su mayoría del orden Coleoptera, familia Scolytidae (Grupo 1).

Los aislamientos pertenecientes al Grupo 1, según la clasificación molecular, son de Colombia con excepción del aislamiento Bb 9021 que procede del Ecuador. Teniendo en cuenta que aquellos aislamientos que comparten un grupo en particular poseen similitud en su origen genético, los aislamientos de este grupo podrían confirmar un mismo origen, en virtud del hospedante del cual fueron aislados (*H. hampei*) y de su distribución geográfica, Ecuador y Risaralda (Colombia). De esta manera es posible que en el proceso de dispersión de la broca a través de América Latina (Brasil, Ecuador, Colombia, Perú), aquellos insectos infectados por el hongo *B. bassiana* hayan colonizado nuevas

TABLA 2. Promedios y variación de los grupos de aislamientos clasificados según aspectos fisiológicos evaluados.

Aislamientos	Grupo	Patogenicidad a la broca (PPB) %		Producción de esporas (E) (10 ⁸)		Germinación (PG) %		Tasa diaria (TCD) (cm)	
		\bar{x}	CV	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV
Bb 9005, Bb 9008, Bb 9012, Bb 9021, Bb 9023, Bb 9116, Bb 9117, Bb 9204, Bb 9207, Bb 9209, Bb 9212, Bb 9305.	1	79,21a*	21.96	11b	98,19	82,37a	8,01	0,21b	31,54
Bb 9416	2	65,00a	15.38	21a	32,76	27,60b	13,21	0,37a	18,15
Bb 9010, Bb 9101, Bb 9108, Bb 9120	3	18,3b	65.36	13b	115,16	83,60a	9,68	0,18b	21,76

* Promedios seguidos por la misma letra en la misma columna, son iguales estadísticamente. Duncan al 5%
CV: Coeficiente de variación.

áreas geográficas. De esta premisa se deduce que quizás los aislamientos que se han registrado atacando la broca en Colombia, tengan un origen genético similar o igual a aquellos registrados en el Ecuador, si se considera el criterio de coevolución del entomopatógeno con el insecto, en la medida que éste alcanza nuevas áreas (6, 7, 13, 19). En esa medida sería lógico que se encontraran muchas características en común, morfológicas, fisiológicas y moleculares entre los aislamientos registrados en la broca en Colombia y en países de Sur y Centroamérica, tal como se ha registrado en trabajos previos de caracterización de aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* (10, 14).

Los grupos clasificados según el dendrograma de las variables moleculares fueron a su vez comparados en las variables fisiológicas y se observó que la única variable que mostró diferencias estadísticas entre éstos ($P=0,05$), fue la de producción de esporas. Con relación a las demás variables fisiológicas evaluadas según el análisis molecular, no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los dos grupos de aislamientos.

El análisis de la variable tamaño, utilizada como criterio de clasificación morfológica, mostró tres grupos de aislamientos según el siguiente criterio de selección: Grupo 1: aislamientos con esporas de tamaño menor de 2,3µm; Grupo 2: aislamientos con tamaño de esporas mayor o igual a 2,3µm y menor de 2,6µm; Grupo 3: aislamientos con tamaño de esporas mayor o igual a 2,6µm (Tabla 1).

El análisis de varianza de los grupos clasificados según el criterio técnico de selección mencionado, mostró diferencias estadísticas significativas entre éstos, según prueba de Duncan al 5%, con el mayor valor para los aislamientos del grupo 3 y el menor valor para los aislamientos del grupo 1, de donde se deduce que aquellos aislamientos correspondientes al Grupo 1 aportarían un mayor número de esporas en un volumen dado. Sin embargo, estudios realizados con el género *Beauveria* no sugieren la utilización de la característica morfológica tamaño para la selección de aislamientos puesto que está sujeta a variación según edad del cultivo y sustrato de crecimiento (8).

Los grupos clasificados según la variable morfológica fueron a su vez comparados en las variables fisiológicas evaluadas y se observó que el tamaño mostró diferencias entre éstos, con el mayor valor para los aislamientos del grupo 2 y el menor valor para los aislamientos del grupo 3.

Los resultados obtenidos permiten definir 3 grupos de aislamientos, según la clasificación fisiológica y morfológica. Los grupos clasificados según la variable morfológica fueron comparados en las variables moleculares evaluadas y se observaron diferencias entre éstos, con el mayor tamaño promedio para los aislamientos del grupo 1 y el menor valor para el aislamiento del grupo 2. El aislamiento Bb 9023, procedente de Filipinas y aislado de *Leptocorisa* sp. (Hemiptera, Coreidae) registrado en el grupo 2 de la clasificación molecular presentó a su vez el menor tamaño de esporas.

En el presente estudio la clasificación morfológica, fisiológica y molecular definió la separación de grupos de aislamientos. La mayor parte de los aislamientos comparten el mismo grupo fisiológico y molecular, a excepción de los aislamientos Bb 9010, Bb 9023, Bb 9101, Bb 9108, Bb 9120 y Bb 9416 (Tabla 1). Entre el grupo de aislamientos que comparten características fisiológicas y moleculares, se destacan 3 (Bb 9005, Bb 9117 y Bb 9204), que a su vez comparten el mismo grupo en la caracterización morfológica (grupo 1).

El 58,8% de los aislamientos comparten el mismo grupo fisiológico y molecular y han sido registrados en el orden Coleoptera. Un 70% de éstos han sido aislados de la familia Scolytidae, género *Hypothenemus* y especie *hampei* (12).

Para concluir, cabe destacar que en la clasificación de los grupos de aislamientos según criterios fisiológicos, ninguna de las variables consideradas permitió la separación de los tres grupos de aislamientos, mientras que la variable

fisiológica producción de esporas y la variable morfológica tamaño, definieron los dos grupos identificados en el dendrograma de la clasificación molecular.

Los resultados obtenidos no muestran una diferenciación evidente de grupos de aislamientos según los criterios fisiológicos considerados. Sin embargo, la clasificación molecular definió una separación de grupos de aislamientos basada también en criterios morfológicos y fisiológicos. Dicha separación considera la procedencia geográfica, teniendo en cuenta que el aislamiento Bb 9023 es foráneo con respecto a los aislamientos colombianos del grupo 1, y en el cual se incluye un aislamiento procedente del Ecuador, cuya cercanía geográfica permite considerarlo dentro del grupo de los aislamientos colombianos, teniendo en cuenta que probablemente a través de la frontera con el Ecuador pudo llevarse a cabo la introducción de la broca del café a Colombia y por ende, del hongo *B. bassiana* como enemigo natural, transportado a nuevas áreas, a través del insecto (2, 13).

Si bien, la clasificación molecular permitió definir una separación evidente de aislamientos, según la localidad, se sugiere considerar en términos de selección de aislamientos aspectos fisiológicos que determinan la eficiencia de estos agentes de control biológico en la regulación de poblaciones de la broca en el campo. De esta manera, deben seleccionarse entre los grupos de aislamientos clasificados según el dendrograma de las variables moleculares, aquellos aislamientos que presenten en forma individual altos porcentajes de patogenicidad a la broca, germinación, producción de esporas, tasa diaria de crecimiento y resistencia a la luz ultravioleta, entre otros (7, 18).

Una vez realizada la selección según aspectos fisiológicos cabría considerar, en términos de especificidad, la utilización de aislamientos del orden Coleoptera vs. la utilización de aislamientos de otros órdenes, que comparten las

mejores características fisiológicas, tal como lo sugiere la literatura (13). Así mismo, sería importante seleccionar aún dentro del mismo orden, aquellos aislamientos provenientes de *H. hampei* que comparten las mejores características fisiológicas (3, 7). La variable morfológica tamaño no debe ser considerada como criterio de selección de aislamientos, teniendo en cuenta su respuesta variable en estudios de caracterización realizados (1, 4, 8), tanto en aislamientos de la especie *B. bassiana* como en otras especies del género *Beauveria*.

Consecuentemente, como fruto de la caracterización realizada, se sugiere la utilización de los aislamientos Bb 9005 y Bb 9117, pertenecientes al grupo 1, en todas las clasificaciones realizadas y los aislamientos Bb 9021 y Bb 9116 correspondientes al grupo 1 de la clasificación molecular y fisiológica, teniendo en cuenta que comparten afinidad de hospedante (Coleoptera: Scolytidae, *Hypothenemus hampei*), a excepción del aislamiento Bb 9005 (hospedante desconocido) y procedencia geográfica (Colombia y Ecuador), considerando una situación climática similar en estos países.

En trabajos futuros de caracterización de aislamientos de *B. bassiana* debe considerarse la utilización de las variables evaluadas, teniendo en cuenta su alta contribución a la variación total de los aislamientos; sin embargo, en la selección de un agente biológico para el control de insectos en cultivos de importancia económica debe considerarse el criterio técnico de patogenicidad, esporulación y germinación del agente, ya que estas variables determinan finalmente su eficiencia en el control.

AGRADECIMIENTOS

A los auxiliares Miriam Giraldo y Silvio Marín por su apoyo en la preparación del material y en las evaluaciones de laboratorio.

La realización de este estudio fue posible gracias al soporte financiero brindado por el Instituto Colombiano de Ciencia y Tecnología, COLCIENCIAS y la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, a través de su centro de investigación, Cenicafé.

LITERATURA CITADA

1. BRIDGE, P. D.; ABRAHAM, Y. J.; CORNISH, M. C.; PRIOR, C. MOORE, D. The chemotaxonomy of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates from the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Mycopathologia* 111: 85-90. 1990.
2. BUSTILLO, A.E., POSADA, F.J. El desarrollo y uso de entomopatógenos en el control de la broca del café. *In: Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología*, 23. Cartagena, julio 17-19, 1996. *Memorias*. Cartagena, Socolen, 1996. p. 232-253.
3. CHARNLEY, A. K. Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: A speculative review. *In: ANDERSON, J.M.; RAYNER, A.D.M. ; WALTON, D.W.H. eds. Invertebrate microbial interactions*. Cambridge, Cambridge University Press. 1084. pp 229-270.
4. GLARE, T. R.; INWOOD, A. J. Morphological and genetic characterisation of *Beauveria* spp. from New Zealand. *Mycological Research* 102 (2):250-256. 1998.
5. GONZÁLEZ, M. T.; POSADA, F. J.; BUSTILLO, A. E. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. *Cenicafé* 44 (3): 93-102. 1993.
6. HAJEK, A. E.; ST. LEGER, R. J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology* 39, 293-322. 1994.
7. HOKKANEN, H. M. T., PIMENTEL, D. New approach for selecting biological control agents. *Canadian Entomologist* 116: 1109 - 1121. 1984.
8. MUGNAI, L.; BRIDGE, P. D.; EVANS, H. C. A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*. *Mycological Research* 92: 199 - 209. 1989.

9. MURPHY, S.; MOORE, D. Biological control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera, Scolytidae): previous programmes and possibilities for the future. *Biocontrol News and Information* 11(2):107-117. 1990.
10. NARVÁEZ, M. del P. ; GONZÁLEZ, M.T.; BUSTILLO, A.E.; CHAVES, B.; MONTOYA, E.C. Producción de esporas de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhiziumanisopliae* cultivados en arroz y sobre la broca del café. *Revista Colombiana de Entomología* 23 (2-3): 125-131.1977.
11. NEI, M.; LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science* 76:5269-5273. 1979.
12. POSADA, F. J.; VÉLEZ, P. E. Registro de hospederos y aislamientos de *Beauveria bassiana* en la colección de hongos entomopatógenos de Cenicafé, Colombia. *Manejo Integrado de Plagas* No. 46: 50 - 64. 1998.
13. PRIOR, C. Discovery and characterization of fungal pathogens for locust and grasshopper control. *In*: LOMER, C. J.; PRIOR, C. eds. *Biological control of locusts and grasshoppers*. Wallingford, CAB International, 1992. p. 230 - 238.
14. POPRAWSKI, T.J.; RIBA, G.; JONES, W.A.; AIOUN, A. Variation in isoesterase profiles of geografic populations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina:Hyphomycetes) isolates from *Sitona weevils* (Coleoptera:Curculionidae). *Environmental Entomology* 17: 275-279. 1988.
15. SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 3 vols.
16. SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. *Numerical taxonomy*. San Francisco, W. H. Freeman. 1973. 450 p.
17. VÉLEZ A., P.E.; POSADA F., F.J.; MARÍN 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- 37. 1997.
18. VILAS BOAS, A. M.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; LUNA-ALVES LIMA, E. A. Development and improvement of biological insecticides for pest control. *Arquivos Biologia Tecnologia* 35: 749 - 761. 1992.
19. WAAGE, J. Ecological theory and the selection of biological control agents. *In*: MACKAUER, M., EHLER, L.E.; ROLAND, J. eds. *Critical issues in biological control*. Andover, Intercept, 1990. p. 135 - 157.
20. ZOLAN, M.E.; PUKKILA, P.J. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Molecular and Cellular Biology* 6: 195-200. 1986.