

PROCEDIMIENTO PARA LA EVALUACIÓN ENZIMÁTICA CUALITATIVA DE LOS HONGOS *Beauveria bassiana* Y *Metarhizium anisopliae*.

Beatriz Elena Valdés-Duque*; Patricia Eugenia Vélez-Arango**

RESUMEN

VALDÉS D., B. E.; VÉLEZ A., P. E. Procedimiento para la evaluación enzimática cualitativa de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Cenicafé 51 (2): 151-168. 2000.

Se buscó estandarizar una metodología de evaluación enzimática de acuerdo con el sustrato, el tipo de preparación de *B. bassiana* y el tiempo de cultivo. Se utilizaron Caldo Sabouraud Dextrosa (CSD), agua destilada (AD) y agua destilada más macerado de broca adulta recién emergida (ADMB). Se usaron suspensiones del hongo (SH), extractos metabólicos (EM) y suspensiones sometidas a ultrasonido (SU) y se seleccionaron dos aislamientos con diferente nivel de patogenicidad a la broca del café. Para cada una de las preparaciones del hongo en los diferentes sustratos se inocularon tres medios con cada aislamiento. Las muestras se tomaron a los 3, 11 y 15 días de cultivo. La evaluación enzimática se realizó mediante la técnica de Api-zym sobre cultivos realizados a partir de una concentración de esporas conocida (2×10^6 esporas/ml). Una vez seleccionada la suspensión del hongo (SH), se evaluó el sustrato utilizando 3 aislamientos. La respuesta enzimática más alta se presentó en CSD, seguida por ADMB. Se seleccionó ADMB para las pruebas, ya que no hubo diferencias marcadas con CSD y simula el comportamiento natural del hongo. El tiempo de cultivo se evaluó con 4 aislamientos, a los 5, 8 y 12 días de cultivo, en el medio ADMB. Se escogió un tiempo entre 5 y 8 días para la evaluación enzimática. Con esta metodología se evaluó la actividad enzimática de 39 aislamientos de *B. bassiana* y 19 de *M. anisopliae*.

Palabras claves: Control biológico, *H. hampei*, *B. bassiana*, *M. anisopliae*, sustrato, suspensión celular y actividad enzimática.

ABSTRACT

The aim of the study was to standardize an enzymatic evaluation methodology according to substrate, type of preparation of *Beauveria bassiana*, and culture time. Sabouraud Dextrose Broth (SDB), Distilled Water (DW), and Distilled Water plus comminuted adult coffee berry borer (ADMB). Fungus suspension (FS), metabolic extracts (ME), and suspensions with ultrasound treatment were used, and two isolates with different level of pathogenicity against coffee berry borer were chosen. For every preparation and every substrate, three media were inoculated with every isolate. Samples were taken after 3, 11, and 15 days of culture. Enzymatic evaluation was performed by Api-zym technique on cultures grown from a known spore concentration (2×10^6 spores/ml). No differences were observed, so ADMB was selected. After selecting fungus suspension (FS), the substrate was evaluated using three isolates. The highest enzymatic response was shown in CSD, followed by ADMB. Culture time was evaluated with four isolates, after 5, 8, and 12 days, in ADMB. A time between 5 and 8 days was chosen for enzymatic evaluation. With this methodology, enzymatic activity of 39 isolates of *B. bassiana* and *Metarhizium anisopliae* was evaluated.

Keywords: Biological control, *Hypothenemus hampei*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, substrate, cell suspension, enzymatic activity.

* Bacterióloga.

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

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), insecto plaga que afecta la caficultura en casi todos los países productores es probablemente originaria del Africa Central de donde se ha diseminado a otros continentes desde principios de este siglo (3, 8). *B. bassiana* se ha registrado como enemigo natural de la broca del café, aislándose en todos los países a los cuales ha migrado este insecto, y su infección en *H. hampei* es predecible, teniendo en cuenta la particular susceptibilidad de éste al ataque del hongo (2). La infección puede ocurrir a través de dos formas: el hongo se disemina a medida que la broca coloniza nuevas áreas geográficas o puede ser transferido a la broca a través de otros insectos locales. Estas diferencias pueden ser de importancia en el desarrollo de un micoinsecticida ya que un patógeno que ha coevolucionado con el insecto hospedante puede diferenciarse en patogenicidad, respecto a aquel que no lo ha hecho (6).

Estudios recientes en la sistemática micológica han mostrado el valor de las técnicas quimiotaconómicas para diferenciar entre las poblaciones naturales de hongos; es así como la diferenciación de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* asociados con hospedantes específicos o regiones geográficas se ha realizado teniendo en cuenta patrones isoenzimáticos y reacciones fisiológicas específicas (7, 11). Cenicafé cuenta con una colección de aislamientos de estos hongos que está siendo caracterizada desde el punto de vista morfológico, bioquímico y molecular. Dichos aislamientos han sido objeto de trabajos para evaluar su actividad enzimática en forma cualitativa y cuantitativa, a partir de aislamientos previamente cultivados en medios sintéticos. Adicionalmente, la literatura registra una gran cantidad de estudios tendientes a evaluar la respuesta enzimática de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae*, y la relación de ciertas enzimas con la virulencia al hospedante; muchos de estos resultados se han obtenido en medios sintéticos con el sustrato que induce la producción de la enzima sin haber especializado pre-

viamente la acción del hongo, utilizando su cultivo en medios que incluyan el insecto de interés (4).

Teniendo en cuenta que el uso exitoso de un agente de control biológico puede estar relacionado con su grado de especialización hacia el insecto que se quiere controlar, debe evaluarse la actividad enzimática de estos hongos en sustratos que contengan el insecto, en los cuales se estimule la producción de enzimas específicas dirigidas a componentes particulares relacionados con el proceso de penetración e invasión del hongo.

El presente estudio tuvo como objeto estandarizar una metodología de evaluación enzimática cualitativa en diferentes sustratos, tipos de preparación del hongo y tiempo de cultivo, para proceder a la caracterización de otros aislamientos de estos hongos, teniendo en cuenta la metodología desarrollada.

MATERIALES Y MÉTODOS

La Tabla 1 describe los factores utilizados para la selección del sustrato, preparación del hongo y determinación del tiempo de cultivo.

MATERIALES

Sustratos. Caldo Sabouraud Dextrosa (CSD), Agua Destilada (AD) y Agua Destilada más macerado de brocas adultas recién emergidas (0,96g/100ml) (ADMB), suministradas por la unidad de cría de broca de Cenicafé.

Preparaciones del hongo. Se utilizaron suspensiones celulares (micelio y conidias) (SC), extractos metabólicos (EM), es decir, suspensiones celulares previamente filtradas a 0,2 μ , y suspensiones sometidas durante 10 y 30 minutos a ultrasonido (60 KHz) (SU).

Aislamientos. Se seleccionaron cinco aislamientos con diferente respuesta de patogenicidad a la broca del café, *Bb* 9014 (39,9%), *Bb* 9015 (50%), *Bb* 9116 (45%), *Bb* 9028 (76,6%) y *Bb* 9307 (18,3%).

Tiempo de cultivo. Se utilizaron tres tiempos en la primera y segunda actividad (3, 11 y 15 días) y 5, 8 y 12 días en la tercera actividad (Tabla 1).

Evaluación. Para cada uno de los aislamientos en los diferentes sustratos y preparaciones del hongo se realizaron tres repeticiones. Se hizo la agitación en un agitador orbital a 100rpm. En los días de cultivo señalados para cada etapa se procedió a la toma de las muestras, a partir de cada uno de los recipientes con el cultivo del hongo y una vez ajustada la concentración de esporas (2×10^6 esporas/ml), se obtuvieron las diferentes formas de cultivo del hongo para la evaluación enzimática extra e intra celular en el sistema comercial Api-zym (bioMérieux).

Caracterización. Con base en los criterios desarrollados para la evaluación enzimática (Tabla 1) se llevó a cabo la caracterización posterior de los demás aislamientos de estos hongos, evaluando la actividad en el sistema comercial Api-zym y en sustratos sólidos.

MÉTODOS

Estandarización de la metodología. Se empleó el sistema comercial Api-zym, método semicuantitativo que incluye 19 sustratos deshidratados de enzimas. La reacción enzimática se evidencia en una escala de color que provee el sistema; éste se trabajó según las instrucciones del fabricante (7).

Caracterización de los aislamientos. Se utilizaron medios de cultivo químicamente definidos en los cuales se incorporó la fuente de interés (citrato, quitina, glucosamina, N-acetil glucosamina, almidón, lactosa y lanolina, como

TABLA 1. Factores de selección en cada una de las actividades desarrolladas en el estudio de la evaluación enzimática del entomopatógeno *B. bassiana*.

ACTIVIDAD	AISLAMIENTO	SUSTRATOS	PREPARACIÓN	TIEMPO DE EVALUACIÓN (Días)
1	<i>Bb</i> 9014	Caldo Sabouraud Dextrosa	Suspensión Celular	3
	<i>Bb</i> 9015	Agua Destilada Estéril	Extracto Metabólico	11
		Agua Destilada más macerado de Broca	Suspensión sometida a Ultrasonido	15
2	<i>Bb</i> 9028	Caldo Sabouraud Dextrosa		3
	<i>Bb</i> 9116	Agua Destilada Estéril	Suspensión Celular	11
	<i>Bb</i> 9307	Agua Destilada más macerado de Broca		15
3	<i>Bb</i> 9014			5**
	<i>Bb</i> 9028	Agar Agua más	Suspensión Celular	8**
	<i>Bb</i> 9116	macerado de Broca*		12**
	<i>Bb</i> 9307			

* El agar agar se adicionó a este sustrato con el fin de proveer un medio de soporte sólido para el crecimiento del hongo.

** Estos tiempos se adoptaron con base en la respuesta obtenida en las actividades 1 y 2.

fuentes de carbono. Además, úrea y extracto de levadura, como fuentes de nitrógeno) y un indicador de pH, el compuesto púrpura de bromocresol. Se determinó la producción de lipasas, esterasas y proteasas mediante la metodología de Paterson y Bridge (10), modificada por Valdés (13), y su actividad mediante el sistema comercial Api-zym.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de la preparación del hongo. Se presentó una menor respuesta enzimática del extracto metabólico del hongo, lo cual puede atribuirse al efecto de los metabolitos presentes en éste, a diferencia de aquella observada en la suspensión celular en la cual y debido a la dinámica del crecimiento del hongo sobre un sustrato dado, se generan continuamente procesos enzimáticos. No se encontraron diferencias en la actividad enzimática de la suspensión celular y la suspensión sometida a ultrasonido, debido a que con los 2 tiempos de sonicación empleados (15 y 30 minutos) no se alcanzó la ruptura celular, lo cual se comprobó por el crecimiento posterior del hongo en el medio nutritivo. Por tal razón, se seleccionó la suspensión celular para la realización de las siguientes actividades:

Selección del sustrato. En la Tabla 2 se muestra la respuesta de las SC de los aislamientos en los diferentes tiempos de evaluación, según el sustrato. Aún cuando la mayor actividad enzimática se presentó en CSD, se seleccionó el medio ADMB como sustrato de crecimiento del hongo para la realización de las pruebas enzimáticas, en vista de que en ambos sustratos se presentó actividad de las mismas enzimas, pero la intensidad de la reacción fue mayor en el sustrato CSD. La selección del sustrato ADMB se realizó considerando las condiciones en las cuales se presenta el hongo en forma natural, es decir, las conidias o unidades infectivas de éste, que se asperjan en las diferentes formulaciones

para el control de la broca del café, deben expresar su potencial patogénico en presencia de agua libre.

Tiempo de cultivo del hongo. La Tabla 3 ilustra la respuesta de los diferentes aislamientos en los tres tiempos de evaluación. En general, se observó tanto en esta actividad como en las actividades anteriores que, a medida que aumenta el tiempo de incubación de los aislamientos disminuye su actividad enzimática. Por tal razón, se seleccionó como óptimo un tiempo de cultivo entre 5 y 8 días para la evaluación enzimática. Cabe anotar que sólo se observó actividad de las enzimas en cinco de los 19 sustratos evaluados, en diferentes condiciones para cada aislamiento (Tabla 3).

Los resultados permitieron desarrollar una metodología cualitativa sencilla y confiable para la evaluación enzimática de aislamientos del hongo *B. bassiana* en sustratos que incluyen la broca, insecto al cual se dirige el control, previa su utilización a la de las metodologías para la determinación cuantitativa de actividad enzimática en las cuales debe considerarse la determinación de masa molecular, el pH y la temperatura óptima, Km para el sustrato, velocidad del proceso de expresión, etc. Esta metodología puede hacerse extensiva a la caracterización enzimática cualitativa de otros entomopatógenos utilizados para el control de otras plagas en cultivos de importancia económica.

Valdés y Vélez, (14) estudiaron la respuesta enzimática de aislamientos de *B. bassiana* cultivado en sustratos sintéticos y a base de macerado de broca adulta recién emergida. Encontraron una mayor actividad enzimática en un menor tiempo de reacción cuando el hongo se cultivó en el sustrato basado en macerado de broca, lo que puede explicarse porque el contacto previo del hongo con los componentes presentes en el integumento del insecto activa su potencial enzimático, con una mayor eficiencia de ataque al insecto. Dicha afirmación coincide con los

hallazgos de Fargues y Remaudiere (5), en un estudio acerca de la especificidad de hospedante de estos hongos entomopatógenos, en el cual se concluye que las especializaciones más extremas entre un patógeno y su insecto hospedante resultan de su coevolución por un tiempo prolongado, lo que implica de parte del microorganismo que ejerce el control, el desarrollo de un sistema mecánico y enzimático de ataque específico a los componentes propios del insecto.

Woods y Gula (15) estudiaron la utilización de nutrimentos de la cutícula de larvas de *Heliothis zea*, por parte de *B. bassiana*. Para tal efecto se desarrolló una metodología de evaluación en la cual se presentaba una interacción directa del hongo sobre las larvas del insecto y sobre medios semisólidos que incluían extractos de éstas.

Bidochka y Khachatourians (1), estudiaron la producción de proteasas extracelulares de *B. bassiana* y su relación con la virulencia sobre la langosta migratoria *Melanoplus sanguinipes* en presencia de un macerado del insecto. La producción de proteasas se evaluaba en un medio artificial basado en gelatina, con el fin de establecer la respuesta del hongo en ambos sustratos. En oposición a los resultados encontrados en el presente estudio, el hongo mostró una mayor actividad proteolítica en el sustrato artificial que en el sustrato a base de cutícula, lo que fue atribuido a la poca disponibilidad y solubilidad de los nutrimentos presentes en este último.

Caracterización de aislamientos. Las Tablas 4, 5, 6 y 7 muestran la respuesta de los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en el sistema comercial Api-zym y mediante el uso de sustratos sólidos, respectivamente.

En cuanto a los aislamientos de *B. bassiana* que presentaron actividad enzimática en la mayor parte de los sustratos en el sistema comercial

Api-zym, se destacan *Bb* 9001, *Bb* 9020, *Bb* 9029, *Bb* 9203, *Bb* 9217, *Bb* 9316, *Bb* 9409 y *Bb* 9502 (Tabla 4).

Con relación a la caracterización enzimática de *B. bassiana* en la metodología de sustratos sólidos, cabe resaltar que se presentaron respuestas similares en la mayor parte de los aislamientos para la utilización de los sustratos Citrato, Quitina, N-acetil glucosamina, Urea y Extracto de levadura y para la producción de las enzimas Lipasas, Esterasas y Proteasa en el sustrato basado en caseína; la única diferencia se presentó para la producción de Proteasa en el sustrato a base de gelatina, en el cual sólo se evidenció reacción de los aislamientos *Bb* 9001, *Bb* 9007, *Bb* 9020 y *Bb* 9203 (Tabla 5). No se observó respuesta de ninguno de los aislamientos evaluados con los sustratos Almidón, Lactosa, Lanolina y Glucosamina.

En el hongo *B. bassiana* la rapidez de la reacción enzimática fue mayor en los aislamientos *Bb* 9001, *Bb* 9017, *Bb* 9020 y *Bb* 9217, para siete de los nueve sustratos evaluados, seguidos de los aislamientos *Bb* 9009, *Bb* 9024, *Bb* 9025, *Bb* 9409 y *Bb* 9506, para seis de los 9 sustratos evaluados (Tabla 8). Los aislamientos que presentaron la mayor rapidez en la respuesta enzimática en ambos sistemas fueron *Bb* 9001 (Coleoptera, Colombia) y *Bb* 9020 (Homoptera, Filipinas).

Los aislamientos *Ma* 9209, *Ma* 9220, *Ma* 9222 y *Ma* 9303 de *M. anisopliae* mostraron una mejor actividad enzimática con la mayor parte de los sustratos evaluados en el sistema comercial Api-zym. Dentro de este grupo se destaca el aislamiento *Ma* 9222 por presentar la mayor actividad (Tabla 6).

La caracterización enzimática de los aislamientos de *M. anisopliae* en la metodología de sustratos sólidos mostró una respuesta similar a la obtenida con los aislamientos de *B. bassiana*, excepto en la prueba de Citrato

TABLA 2. Respuesta de las suspensiones celulares de los aislamientos de *B. bassiana* en los diferentes tiempos de evaluación, según el sustrato de crecimiento del hongo.

Aislamiento	Días	Sustrato	Lipasas		Proteasas	Fosfatasa	
			C1	C8	Valina arilamidasa	Fosfatasa ácida	Na.-A-S-BI-f
			30' 16h	30' 16h		30' 16h	30' 16h
9028	3	AD	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0
		ADMB	0 - 1	0 - 1	0 - 0	3 - 3	1 - 1
		CSD	1 - 1	1 - 1	0 - 0	5 - 5	1 - 1
	11	AD	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0
		ADMB	0 - 0	0 - 0	0 - 0	2 - 3	1 - 1
		CSD	0 - 1	0 - 1	0 - 0	5 - 5	0 - 0
	14	AD	0 - 0	0 - 1	0 - 1	0 - 0	1 - 0
		ADMB	0 - 0	0 - 0	0 - 0	1 - 1	0 - 0
		CSD	0 - 0	0 - 0	0 - 0	4 - 4	0 - 0
	3	AD	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0
		ADMB	1 - 1	0 - 1	0 - 0	3 - 4	1 - 1
		CSD	1 - 1	1 - 1	0 - 0	5 - 5	0 - 0
9116	11	AD	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0
		ADMB	0 - 0	0 - 0	0 - 0	4 - 4	1 - 0
		CSD	0 - 0	0 - 0	0 - 0	3 - 4	0 - 0
	14	AD	0 - 0	0 - 0	0 - 1	0 - 0	0 - 0
		ADMB	0 - 0	0 - 0	0 - 0	1 - 1	1 - 1
		CSD	0 - 0	0 - 0	0 - 0	4 - 3	0 - 0
	3	AD	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0
		ADMB	0 - 1	0 - 1	0 - 0	3 - 4	1 - 1
		CSD	0 - 0	0 - 0	0 - 0	5 - 5	0 - 1
9307	11	AD	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	1 - 0
		ADMB	0 - 0	0 - 0	0 - 0	5 - 5	1 - 1
		CSD	0 - 0	0 - 0	0 - 0	5 - 5	1 - 0
	14	AD	0 - 0	0 - 0	0 - 0	0 - 0	1 - 1
		ADMB	0 - 0	0 - 1	0 - 0	1 - 1	1 - 1
		CSD	0 - 0	0 - 0	0 - 0	4 - 3	1 - 1

AD : Agua destilada

ADMB: Agua destilada más macerado de broca

CSD: Caldo Sabouraud Dextrosa

30' y 16h = Tiempos de reacción enzimática.

0 = reacción negativa; 1= reacción débil, 2, 3 y 4 = reacción moderada, 5 = reacción fuertemente positiva

TABLA 3. Respuesta enzimática de los diferentes aislamientos del hongo *B. bassiana* en tres tiempos de evaluación.

Aislamiento	Días	Lipasas				Fosfatasa				Glucosidasa			
		C1		C8		Fosfatasa Acida		Naftol-A-S-BI- fosfodrolasa		β Glucosidasa		β Glucosidasa	
		30'	16h	30'	16h	30'	16h	30'	16h	30'	16h	30'	16h
Bb 9014	5	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	8	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
	12	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0
Bb 9028	5	1	1	0	0	2	3	1	0	0	0	0	0
	8	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	12	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0
Bb 9116	5	1	1	1	1	2	2	1	1	1	0	1	1
	8	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	12	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0
Bb 9307	5	2	2	1	1	3	3	2	2	2	0	1	1
	8	1	1	1	1	3	3	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0

30' y 16h = Tiempos de reacción enzimática.

0 = reacción negativa; 1 = reacción débil, 2, 3 y 4 = reacción moderada, 5 = reacción fuertemente positiva

TABLA 4. Continuación ...

Enzima	Fosfatasa		Lipasas		Proteasas			Fosfatasas			Galactosidasa			Glucosidasas			Glucosaminidasa		
	Fosfatasa	Alcalina	Esterasa	CI	Esterasa lipasa	Leucina arilamidasa	Valina Arilamidasa	Fosfatasa ácida	Naftol. A-S-BI-hidrolasa	Fosfo-	Galacto-	Galactosidasa	α	β	β	α	β	N-ac-β	
	30'	16h	30'	16h	30'	16h	30'	16h	30'	16h	30'	16h	30'	16h	30'	16h	30'	16h	
Bb 9217	0	0	2	3	2	3	2	3	5	5	3	3	0	1	0	0	5	3	3
Bb 9305	0	1	1	2	1	2	0	1	2	2	2	2	0	0	0	0	2	2	0
Bb 9308	1	1	2	2	2	1	0	1	2	2	1	1	0	0	0	0	2	2	0
Bb 9312	0	0	2	2	2	0	1	2	2	2	1	1	0	0	0	0	2	2	0
Bb 9313	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bb 9316	5	2	2	2	3	5	0	1	5	5	5	5	0	1	0	0	5	2	1
Bb 9407	0	0	2	2	2	5	0	1	2	2	1	1	0	0	0	0	1	1	0
Bb 9409	0	1	3	3	3	1	0	1	3	3	2	2	0	0	0	0	1	2	0
Bb 9417	0	0	1	2	1	2	0	2	2	3	1	1	0	0	0	0	1	2	0
Bb 9501	0	0	2	2	1	0	0	3	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bb 9502	2	3	2	2	2	0	1	3	3	3	3	3	0	0	0	0	2	3	0
Bb 9503	0	0	1	2	1	2	0	1	2	1	1	1	0	0	0	0	1	2	0
Bb 9504	0	1	2	3	2	2	3	0	1	3	2	2	0	0	0	0	1	2	0
Bb 9506	0	0	2	2	1	0	0	4	4	2	3	3	0	0	0	0	3	3	0
Bb 9508	0	0	2	2	2	2	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Bb 9509	0	0	2	2	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	2	3	0
Bb 9511	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bb 9604	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

30' y 16h = Tiempos de reacción enzimática.

0 = reacción negativa, 1 = reacción débil, 2,3 y 4 = reacción moderada, 5 = reacción fuertemente positiva.

TABLA 5. Caracterización enzimática de aislamientos de *B. bassiana* reactivados sobre la broca del café, mediante el uso de sustratos sólidos.

AISLAMIENTO	FUENTES DE				ENZIMAS				ORIGEN	PPB	HOSPEDANTE
	CARBONO		NITRÓGENO		Esterasa	Proteasa Caseína	Proteasa Gelatina				
	Citrato	Quitina	Urea	Extracto levadura				Lipasa			
Bb 9001	+	+	+	+	+	+	+	+	Colombia	57,73	Coleoptera
Bb 9003	+	+	+	+	+	+	+	v	Colombia	71,95	Coleoptera
Bb 9004	+	+	+	+	+	+	+	v	Colombia	72,57	Coleoptera
Bb 9005	+	+	+	+	+	+	+	v	Colombia	78,04	Desconocido
Bb 9006	+	+	+	+	+	+	+	-	Colombia	52,16	Coleoptera
Bb 9007	+	+	+	+	+	+	+	+	Colombia	94,97	Coleoptera
Bb 9008	+	+	+	+	+	+	+	-	Colombia	77,43	Hemiptera
Bb 9016	+	+	+	+	+	+	+	-	Tailandia	87,71	Desconocido
Bb 9018	+	+	+	+	+	+	+	-	Italia	81,79	Lepidoptera
Bb 9020	+	+	+	+	+	+	+	+	Filipinas	24,58	Homoptera
Bb 9024	+	+	+	+	+	+	+	-	Canadá	77,43	Coleoptera
Bb 9025	+	+	+	+	+	+	+	v	Canadá		Coleoptera
Bb 9029	+	+	+	+	+	+	+	-	Colombia	66,71	Coleoptera
Bb 9103	+	+	+	+	+	+	+	+	Colombia		Coleoptera
Bb 9107	+	+	+	+	+	+	+	-	Colombia	47,45	Lepidoptera
Bb 9108	+	+	+	+	+	+	+	-	Colombia	14,84	Coleoptera
Bb 9112	+	+	+	+	+	+	+	-	Colombia	100	Lepidoptera
Bb 9203	+	+	+	+	+	+	+	+	Colombia	82,29	Coleoptera
Bb 9210	+	+	+	+	+	+	+	-	Desconocido		Desconocido
Bb 9217	+	+	+	+	+	+	+	*	Desconocido	85,16	Desconocido
Bb 9305	+	+	+	+	+	+	+	-	Colombia	53,30	Coleoptera

TABLA 5. Continuación ...

AISLAMIENTO	FUENTES DE						ENZIMAS				ORIGEN	PPB	HOSPEDANTE
	CARBONO			NITRÓGENO			ENZIMAS						
	Citrato	Quitina	N-acetil glucosamina	Urea	Extracto levadura	Lipasa	Esterasa	Proteasa Caseína	Proteasa Gelatina				
Bb 9308	+	+	+	+	+	+	+	+	-	Colombia	59,72	Hemiptera	
Bb 9312	+	+	+	+	+	+	+	+	-	Colombia	54,86	Coleoptera	
Bb 9313	+	+	+	+	+	+	+	+	d+	Colombia	67,43	Lepidoptera	
Bb 9316	+	+	+	+	+	+	+	+	-	Colombia	67,15	Coleoptera	
Bb 9407	+	+	+	+	+	+	+	+	-	Desconocido	80,28	Coleoptera	
Bb 9409	+	+	+	+	+	+	+	+	-	Colombia	65,16	Desconocido	
Bb 9417	+	+	*	+	+	+	+	+	-	Colombia	86,0	Hymenoptera	
Bb 9501	+	+	+	+	+	+	+	+	v	Guatemala	72,5	Desconocido	
Bb 9502	+	+	+	+	+	+	+	+	-	Guatemala	91,25	Desconocido	
Bb 9503	+	+	+	+	+	+	+	+	-	Guatemala	91,25	Desconocido	
Bb 9504	+	+	+	+	+	+	+	+	d+	Guatemala	91,25	Desconocido	
Bb 9506	+	+	+	+	+	+	+	+	-	Colombia	72,57	Coleoptera	
Bb 9508	+	+	+	+	+	+	+	+	-	Colombia	74,84	Coleoptera	
Bb 9509	+	+	+	+	+	+	+	+	-	Colombia	64,58	Coleoptera	
Bb 9511	+	+	+	+	+	+	+	+	v	Colombia			
Bb 9604	+	+	+	+	+	+	+	+	-	Colombia			

PPB = Porcentaje de patogenicidad a la broca del café
 + = respuesta positiva, - = respuesta negativa, * = no se realizó la prueba; v = variable; d+ = débilmente positivo.

TABLE 6. Caracterización enzimática de aislamientos de *M. anisopliae* reactivados sobre la broca del café, mediante el sistema comercial Api-zym

Enzima	Fosfatasa		Lipasas		Proteasas		Fosfatasa		Galactosidasa		Glucosidasas		Glucosa-minidasa									
	Fosfatasa	Alcalina	Esterasa	CI	Esterasa	lipasa	Leucina arilamidasa	Valina Arilamidasa	Fosfatasa ácida	Naftol. A-S-BI-Fosfohidrolasa	α Galactosidasa	β Glucosidasa	β Glucosidasa	N- acetil- β Glucosaminidasa								
Aislamiento	30'	16h	30'	16h	30'	16h	30'	16h	30'	16h	30'	16h	30'	16h								
Ma 9003	0	0	2	2	1	2	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0					
Ma 9004	2	2	2	2	2	2	1	1	3	3	3	3	0	0	0	3	2	0	0			
Ma 9201	1	1	2	2	1	2	0	1	0	1	2	2	0	0	0	1	1	1	0			
Ma 9206	1	1	1	1	1	1	0	0	1	2	2	2	1	0	0	0	5	3	2	1		
Ma 9208	0	0	2	2	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0		
Ma 9209	3	3	3	3	3	3	1	3	0	1	4	5	4	0	1	0	1	5	2	3	1	
Ma 9210	0	0	2	1	1	1	0	0	1	1	1	3	1	0	0	0	1	1	0	0	0	
Ma 9212	0	1	3	3	3	3	1	1	0	1	3	3	1	0	0	0	3	3	1	1	1	
Ma 9220	3	4	2	3	2	3	2	2	3	3	3	2	3	0	1	2	2	3	3	4	4	
Ma 9222	5	4	3	4	3	4	3	5	5	5	5	5	5	1	1	1	1	5	4	2	3	
Ma 9223	4	4	2	3	2	3	2	2	3	3	4	4	4	0	0	0	1	5	3	4	4	
Ma 9227	1	1	2	2	1	2	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	
Ma 9230	0	0	2	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ma 9234	0	2	3	3	2	3	1	2	0	1	1	1	2	0	0	0	1	2	0	0	0	
Ma 9235	0	1	3	3	1	2	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	
Ma 9236	0	0	2	0	1	2	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ma 9237	2	3	1	2	1	2	3	3	3	2	3	2	2	0	0	0	1	2	0	0	0	
Ma 9303	2	4	2	3	2	4	1	1	0	0	4	5	3	4	1	1	2	1	4	2	3	3
Ma 9601	0	0	2	3	1	3	0	1	0	1	3	4	2	3	0	0	0	2	3	0	0	0

30' y 16h = Tiempos de reacción enzimática.
 0= reacción negativa, 1 = reacción débil, 2, 3 y 4 = reacción moderada, 5 = reacción fuertemente positiva.

TABLA 7. Caracterización enzimática de aislamientos de *M. anisopliae* reactivados sobre la broca del café, utilizando sustratos sólidos

AISLAMIENTO	FUENTES DE			ENZIMAS			ORIGEN	PPB	HOSPEDANTE	
	CARBONO		NITRÓGENO	Lipasa	Esterasa	Proteasa Caseína				Proteasa Gelatina
	Citrato	Quitina N-acetil glucosamina								
Ma 9003	+	+	+	+	+	+	Colombia	92,5	Coleoptera	
Ma 9004	-	+	+	+	+	+	Colombia	87,5	Coleoptera	
Ma 9201	+	+	+	+	+	+	E.U	87,5	Coleoptera	
Ma 9206	-	+	+	+	+	+	Colombia	85,0	Homoptera	
Ma 9208	+	+	+	+	+	+	Colombia	82,5	Desconocido	
Ma 9209	+	+	+	+	+	+	Colombia	85,0	Desconocido	
Ma 9210	+	+	+	+	+	+	Colombia	97,5	Desconocido	
Ma 9212	+	+	+	+	+	+	Nueva Zelanda	90,0	Coleoptera	
Ma 9220	+	+	+	+	+	+	Australia	55,0	Coleoptera	
Ma 9222	-	+	+	+	+	+	Australia	92,5	Coleoptera	
Ma 9223	-	+	+	+	+	+	Australia	85,0	Coleoptera	
Ma 9227	-	+	+	+	+	+	Australia	82,5	Coleoptera	
Ma 9230	+	+	+	+	+	+	Brasil	92,5	Homoptera	
Ma 9234	+	+	+	+	+	+	Belice	92,5	Homoptera	
Ma 9235	+	+	+	+	+	+	Belice	87,5	Homoptera	
Ma 9236	v	+	+	+	+	+	Desconocido	87,5	Desconocido	
Ma 9237	-	+	+	+	+	+	Colombia	90,0	Coleoptera	
Ma 9303	+	+	+	+	+	+	Colombia	85,0	Coleoptera	
Ma 9601	+	+	+	+	+	+	Colombia	100	Hymenoptera	

+ = respuesta positiva, - = respuesta negativa, * = No se realizó la prueba; v = variable

TABLA 8. Tiempos medios de reacción enzimática de aislamientos de *B. bassiana* en diferentes sustratos evaluados

PRUEBA	UREA		EXTRACTO DE LEVADURA		ESTERASA		N-ACETIL GLUCOSAMINA		LIPASA		QUITINA		PROTEASA (G)		PROTEASA (C)		CITRATO	
	MEDIA	CV	MEDIA	CV	MEDIA	CV	MEDIA	CV	MEDIA	CV	MEDIA	CV	MEDIA	CV	MEDIA	CV	MEDIA	CV
Bb 9001	2,0e	0	4,0d	15,6	2,0e	0	2,0e	0,0	2,0e	0,0	8,0b	9,2	10a	0	2,0e	0	6,0c	0
Bb 9003	2,0d	0	5,0b	0	4,0bc	0	3,0cd	0,0	2,0d	0,0	9,0a	23,8	*	*	2,3cd	22,1	10,0a	19,7
Bb 9004	2,0e	0	5,0c	0	3,0d	0	3,0d	0,0	2,0e	0,0	7,0b	21,2	v	*	3,0d	0	7,0b	0
Bb 9005	2,0f	0	5,0c	0	4,0d	10,7	3,0e	0,0	2,0f	0,0	6,0b	15,9	v	*	3,0e	14,4	5,0c	0
Bb 9006	3,0e	0	6,0b	0	4,0d	9,8	3,0e	15,5	2,0f	0,0	5,0c	0	*	*	3,0e	0	7,0a	0
Bb 9007	2,0f	0	4,0c	0	3,0d	12,9	3,0de	0,0	2,0f	0,0	8,0b	7,3	10a	0	3,0fe	21,9	7,0b	0
Bb 9008	2,0eg	0	5,0b	0	4,0cd	15,6	3,0dfg	0,0	2,0ef	0,0	4,0bc	9,8	v	*	4,0bd	0	10,0a	14,5
Bb 9009	2,0c	0	5,0b	11,1	3,0c	0	3,0c	0,0	2,0c	0,0	6,0b	25,1	v	*	3,0c	30,6	6,0b	10,0
Bb 9010	2,0f	0	6,0c	7,0	4,0d	0	3,0e	0,0	2,0f	0,0	8,0b	10,7	*	*	2,0f	0	17a	0
Bb 9016	4,0b	0	4,0b	9,8	4,0b	0	4,0b	0,0	2,0b	0,0	13,0a	36,7	*	*	2,0b	18,8	13,0a	7,5
Bb 9017	2,0f	0	4,0d	0	3,0e	0	3,0e	0,0	2,0f	0,0	7,0b	20,5	10a	0	2,0f	0	6,0c	10,0
Bb 9018	2,0e	0	6,0b	0	4,0c	0	3,0d	0,0	2,0e	0,0	6,0b	6,6	*	*	3,0d	0	10,0a	0
Bb 9020	2,0c	0	3,0bc	0	2,0c	0	3,0bc	0,0	2,0c	0,0	10,0a	17,3	10a	0	2,0c	0	4,0b	0
Bb 9024	2,0c	0	4,0b	9,8	2,0c	0	3,0bc	0,0	2,0c	18,8	10,0a	19,7	10a	0	2,0c	0	10,0a	5,3
Bb 9025	2,0e	0	4,0c	11,9	3,0d	0	3,0d	0,0	2,0e	0,0	9,0a	4,6	*	*	2,0e	0	8,0b	7,3
Bb 9026	5,0c	0	5,0c	7,9	4,0d	0	3,0e	0,0	2,0f	0,0	7,0b	8,4	*	*	3,0e	0	12,0a	3,3
Bb 9029	7,0b	0	6,0b	6,6	4,0c	0	3,0cd	0,0	2,0d	0,0	9,0a	28,1	*	*	3,0cd	0	10,0a	4,0
Bb 9103	2,0e	0	4,0c	11,9	2,0e	0	3,0d	0,0	2,0e	0,0	8,0b	9,2	*	*	3,0de	19,4	10,0a	8,8
Bb 9107	3,0e	0	7,0b	6,0	5,0c	0	4,0d	0,0	3,0e	0,0	7,0b	10,5	*	*	3,0e	0	14,0a	0
Bb 9108	3,0e	0	5,0c	17,9	4,0d	0	5,0c	0,0	2,0f	0,0	7,0e	11,0	*	*	2,0f	0	11,0a	9,1
Bb 9112	2,0e	0	7,0c	7,7	5,0d	12,2	3,0de	0,0	9,0b	11,9	8,0bc	21,3	*	*	3,0e	21,9	15,0a	5,8
Bb 9203	3,0d	0	5,0c	12,2	3,0d	0	3,0d	0,0	3,0d	0,0	8,0b	14,9	10a	0	3,0d	0	10,0a	4,0
Bb 9209	2,0f	0	6,0c	0	4,0d	0	3,0e	0,0	3,0e	12,9	7,0b	11,1	*	*	3,0ef	21,9	11,0a	0
Bb 9210	2,0d	0	4,0c	0	4,0c	0	3,0cd	0,0	2,0d	0,0	6,0b	18,2	*	*	3,0d	19,4	9,0a	12,2
Bb 9217	2,0d	0	27b	4,0	3,0cd	19,4	3,0c	0,0	2,0d	0,0	5,0a	7,9	*	*	2,0d	0	4,0ab	11,9
Bb 9305	2,0g	0	6,0c	0	4,0d	0	3,0de	0,0	4,0de	14,1	8,0b	14,0	*	*	3,0fg	19,4	11,0a	3,8
Bb 9308	5,0c	0	7,0b	0	4,0d	9,8	3,0e	0,0	2,0f	0,0	8,0a	6,7	*	*	3,0e	0	8,0a	5,0

TABLA 8. Continuación ...

PRUEBA	UREA		EXTRACTO DE LEVADURA		ESTERASA		N-ACETIL GLUCOSAMINA		LIPASA		QUITINA		PROTEASA (G)		PROTEASA (C)		CITRATO	
	MEDIA	CV	MEDIA	CV	MEDIA	CV	MEDIA	CV	MEDIA	CV	MEDIA	CV	MEDIA	CV	MEDIA	CV	MEDIA	CV
Bb 9312	4,0c	0	6,0b	10	3,0d	15,5	3,0d	0,0	2,0e	0,0	6,0b	7,0	*	*	3,0d	0	12,0a	4,8
Bb 9313	2,0e	0	4,0c	9,8	4,0cd	15,6	3,0de	0,0	2,0e	0,0	8,0b	17,0	*	*	3,0de	19,4	10,0a	5,0
Bb 9316	2,0e	0	5,0c	12,6	4,0d	15,6	4,0d	15,6	2,0e	0,0	7,0b	11,1	v	*	2,0e	0	5,0c	0
Bb 9401	2,0e	0	6,0bc	9,1	4,0cd	0	3,0de	0,0	6,0b	40,8	7,0b	11,0	*	*	2,0e	0	18,0a	5,8
Bb 9403	4,0d	0	6,0c	10,0	4,0d	9,8	3,0e	0,0	2,0f	0,0	10,0b	5,3	*	*	3,0ef	21,9	17,0a	4,9
Bb 9407	6,0b	0	6,0b	14,9	4,0c	0	4,0c	0,0	2,0e	0,0	6,0b	6,6	*	*	3,0d	0	11,0a	0
Bb 9409	2,0d	0	5,0c	0	3,0d	0	3,0d	0,0	2,0d	0,0	6,0b	12,9	*	*	2,0d	0	9,0a	18,8
Bb 9416	4,0cd	0	8,0b	12,4	5,0c	7,9	3,0d	0,0	8,0b	13,5	7,0b	14,1	*	*	4,0cd	0	18,0a	13,6
Bb 9417	3,0e	0	5,0c	0	4,0d	0	*	*	3,0e	0,0	8,0b	12,4	*	*	3,0e	0	10,0a	0
Bb 9501	2,0c	0	5,0b	0	3,0c	0	3,0c	0,0	2,0c	0,0	6,0b	6,6	v	*	5,0b	56,2	10,0a	0
Bb 9502	2,0d	0	6,0b	0	4,0c	0	3,0cd	0,0	2,0d	0,0	6,0b	12,9	*	*	3,0d	21,9	18,0a	9,0
Bb 9503	3,0d	0	6,0b	6,6	4,0c	0	3,0d	0,0	3,0d	21,9	6,0b	16,3	*	*	3,0d	21,9	18,0a	3,1
Bb 9504	2,0f	0	6,0d	0	4,0e	14,1	3,0e	0,0	9,0c	14,0	7,0d	7,7	10b	0	2,0f	0	17,0a	0
Bb 9506	2,0d	0	6,0a	0	4,0b	9,8	3,0c	0,0	2,0d	0,0	6,0a	0	*	*	2,0d	0	6,0a	6,6
Bb 9508	3,0de	0	5,0c	12,6	4,0cd	0	4,0cd	0,0	2,0e	0,0	9,0b	21,2	*	*	2,0e	0	15,0a	12,8
Bb 9509	2,0c	0	7,0b	12,8	3,0c	0	3,0c	0,0	9,0b	27,6	8,0b	7,3	*	*	3,0c	19,4	13,0a	3,2
Bb 9510	2,0f	0	5,0c	0	3,0de	0	3,0de	0,0	2,0ef	22,1	6,0b	21,1	*	*	3,0d	15,5	10,0a	0
Bb 9511	2,0f	0	6,0c	0	4,0d	0	3,0e	0,0	2,0f	0,0	7,0b	14,4	*	*	3,0e	0	10,0a	4,2
Bb 9604	3,0d	0	5,0b	0	4,0c	0	3,0d	0,0	3,0d	0,0	7,0a	14,4	*	*	3,0d	0	8,0a	7,3

Letras diferentes en la misma columna (enzima) para cada aislamiento, corresponden a tratamientos diferentes estadísticamente, Tukey al 5%
 * = Respuesta negativa o variable

en la cual no hubo respuesta de los aislamientos *Ma* 9004, *Ma* 9206, *Ma* 9222, *Ma* 9223, *Ma* 9227 y *Ma* 9237; variable para el aislamiento *Ma* 9236, es decir, reacción positiva en algunos casos y negativa en otros y positiva para los demás aislamientos. No hubo actividad de proteasa G en los aislamientos evaluados excepto con *Ma* 9234 y *Ma* 9235 en los cuales mostró una respuesta variable. Tampoco se observó respuesta de ninguno de los aislamientos evaluados en Almidón, Lactosa, Lanolina y Glucosamina (Tabla 7).

De los aislamientos de *M. anisopliae* la reacción más rápida para 7 sustratos la presentó el *Ma* 9208, seguido de *Ma* 9003, *Ma* 9212 y *Ma* 9601 para seis de los 9 sustratos evaluados (Tabla 9). Los aislamientos que presentaron la mayor actividad enzimática en ambos sistemas fueron *Ma* 9209, *Ma* 9220 y *Ma* 9303, sin embargo, dicha actividad no correspondió a los menores tiempos de inicio de la reacción (Tabla 9).

En cuanto a la diferenciación de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae*, basada en el criterio de actividad enzimática y tiempo de reacción, se destaca una mayor actividad para *B. bassiana* y un menor tiempo de inicio de la reacción para *M. anisopliae* en la mayor parte de los sustratos evaluados, excepto la N-acetil glucosamina, la úrea y el citrato.

En general, no se presentó una asociación evidente entre la actividad enzimática de los aislamientos y su grado de patogenicidad a la broca del café, por cuanto aquellos aislamientos con la mayor actividad enzimática no mostraron los mayores porcentajes de patogenicidad, tal como se ha registrado en estudios previos (14).

La caracterización realizada presenta un potencial de aislamientos con una buena asimila-

ción de sustratos como fuentes de carbono y nitrógeno, y una buena actividad enzimática cualitativa, para ser usados en estudios sobre el control biológico de la broca del café. Las fuentes de carbono y nitrógeno son necesarias en los procesos de germinación y crecimiento de las hifas de estos hongos entomopatógenos y su capacidad de utilizar diversos sustratos presentes en forma natural les asegura una mayor supervivencia (10, 12).

En los aislamientos que presentaron la mayor actividad enzimática en un menor tiempo de inicio de reacción no se observa una característica en particular que permita diferenciarlos teniendo en cuenta su origen y la región geográfica. Tampoco se observa una tendencia definida en la patogenicidad de éstos; es así como se tienen porcentajes que fluctúan entre el 4,9% y el 85%, con los mayores porcentajes para los aislamientos *Bb* 9217 (85%) y *Ma* 9208 (82,5%). Cabe resaltar que el aislamiento *Bb* 9001, procedente de *H. hampei*, se destaca por su mayor actividad enzimática en un menor tiempo de reacción, aún con porcentajes no muy altos de patogenicidad a la broca (59,9%).

La producción de esporas por gramo de sustrato de estos aislamientos, muestra diferencias con la mayor producción para el aislamiento *Bb* 9217, sin embargo, no se tienen registros de este último parámetro en los aislamientos *Bb* 9001 y *Ma* 9208 (9)¹. El mayor rendimiento del hongo en un sustrato dado podría explicarse por su mayor capacidad de asimilación de los compuestos presentes en éste, tal como se observó en los aislamientos mencionados; sin embargo, no se observó esta misma tendencia en los aislamientos seleccionados.

1 González, M. T. 1998. Comunicación personal.

TABLA 9. Tiempos medios de reacción enzimática de aislamientos de *M. anisopliae* en diferentes sustratos evaluados.

PRUEBA	UREA		ESTERASA		N-ACETIL GLUCOSAMINA		LIPASA		QUITINA		EXTRACTO DE LEVADURA		PROTEASA (C)		CITRATO	
	MEDIA	CV %	MEDIA	CV %	MEDIA	CV %	MEDIA	CV %	MEDIA	CV %	MEDIA	CV %	MEDIA	CV %	MEDIA	CV %
Ma 9003	5,0c	11,1	2,0f	0	3,0E	0,0	2,0f	0,0	6,0b	9,1	4,0d	0	2,0f	0	7,0a	0
Ma 9004	9,0a	6,4	2,0e	0	4,0D	0,0	2,0e	0,0	5,0c	11,1	7,0b	8,4	2,0e	0	*	*
Ma 9201	4,0cb	10,7	3,0c	14,4	3,0C	0,0	2,0c	0,0	9,0a	60,5	4,0bc	0	3,0c	0	7,0ab	7,7
Ma 9206	9,0a	0	3,0d	0	5,0c	11,1	2,0e	0,0	7,0b	9,0	7,0b	14,4	3,0d	0	*	*
Ma 9208	3,0d	0	2,0e	0	3,0d	0,0	2,0e	0,0	5,0b	11,1	4,0c	0	2,0e	0	10,0a	4,2
Ma 9209	9,0b	0	2,0e	0	4,0d	0,0	2,0e	0,0	6,0c	0	7,0c	15,5	2,3e	22,1	27,0a	7,0
Ma 9210	8,0b	5,2	3,0cd	14,4	4,0c	0,0	2,0d	0,0	6,0b	6,6	7,0b	13,7	3,0cd	0	28,0a	8,5
Ma 9212	5,0b	11,1	2,0d	0	3,0c	0,0	2,0d	0,0	5,0b	11,1	5,0b	11,1	2,0d	0	7,0a	7,0
Ma 9220	5,0c	17,9	3,0e	0	4,0de	15,6	2,0f	0,0	7,0b	0	4,0d	0	2,0f	0	20,0a	2,0
Ma 9222	11,0a	10,5	3,0d	0	5,0c	0,0	3,0d	21,9	6,0b	0	5,0bc	7,9	2,0d	18,8	*	*
Ma 9223	5,0a	0	2,0e	0	4,0c	14,1	3,0d	0,0	4,0b	11,9	4,0bc	0	2,0e	0	*	*
Ma 9227	**	*	2,0c	22,1	4,0bc	9,8	2,0c	0,0	7,0a	6,0	6,0ab	0	2,0c	0	v	*
Ma 9230	8,0b	15,8	4,0c	0	4,0c	11,9	2,0d	0,0	6,0b	8,2	8,0b	13,7	2,0d	0	15,0a	14,1
Ma 9234	10,0b	7,9	4,0cde	0	4,0cde	0,0	2,0e	0,0	7,0bc	11,1	6,0cd	0	3,0de	29,8	25,0a	22,1
Ma 9235	6,0b	10,5	3,0e	0	4,0d	0,0	2,0f	0,0	7,0a	6,0	5,0c	12,6	2,0f	0	7,0a	7,0
Ma 9236	8,0a	13,7	4,0bd	0	5,0bc	8,4	2,0d	0,0	8,0a	16,3	6,0ab	6,6	3,0cd	36,5	v	*
Ma 9237	8,0a	26,2	3,0bc	0	5,0acde	0,0	3,0bd	19,4	7,0a	11,1	5,0ab	7,9	2,0be	0	v	*
Ma 9303	7,0b	15,6	3,0b	0	5,0b	0,0	3,0b	0,0	8,0b	15,8	6,0b	9,1	4,0b	0	18,0a	43,2
Ma 9601	4,0bc	15,6	3,0dc	14,4	3,0bcd	0,0	2,0d	0,0	8,0a	17,8	4,0b	0	2,0d	0	7,0a	6,0

Letras diferentes en la misma columna (enzima) para cada aislamiento, corresponden a tratamientos diferentes estadísticamente. Tukey al 5%
* = Respuesta negativa o variable

AGRADECIMIENTOS

Al Dr Alex Bustillo P., por su valiosa contribución a la revisión del presente documento y a la Dra. Esther Cecilia Montoya, por su asesoría en el análisis estadístico.

Este trabajo se realizó gracias al apoyo financiero de Colciencias, Proyecto No 2251-12-330-95 "Caracterización y obtención de cepas mejoradas de hongos entomopatógenos"

LITERATURA CITADA

1. BIDOCHKA, M.J. ; KHACHATOURIANS, G.G. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the Migratory Grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. Journal of Invertebrate Pathology 56:362-370. 1990.
2. BUSTILLO P., A. E.; POSADA F., 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 de Indias, Julio 17-19, 1996. Memorias. p 232-253.
3. CÁRDENAS M., R. La broca del café *Hypothenemus hampei* en Colombia. Bogotá. Sociedad Colombiana de Entomología - SOCOLEN. 1991. p. 106-118 (miscelánea N° 18).
4. CHANG, T.T.; YANG, X.Y.; KO, W.H. A sensitive method for detecting production of extracellular enzymes by fungi on solid media. Mycologia 84(6): 923-926. 1992.
5. FARGUES, J.; REMAUDIERE, G. Considerations on the specificity of entomopathogenic fungi. Mycopathology 62 (1): 31 - 37. 1977.
6. MOORE, D.; PRIOR, C. The potential of mycoinsecticides. Biocontrol News and Information. 14(2): 31N-40N. 1993.
7. MUGNAI, L.; BRIDGE, P. D.; EVANS, H. C. A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*. Mycology 92(2): 199 - 209. 1989.
8. MURPHY, S. T.; 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: 107-117. 1990.
9. NARVÁEZ 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 la broca del café. Manizales, Universidad Católica de Manizales. Facultad de Bacteriología, 1996. 66 p. (Tesis: Bacterióloga y Laboratorista Clínica).
10. PATERSON R, R.M.; BRIDGE, P.D. Biochemical techniques for filamentous fungi. Wallingford, CAB International, 1994. 125p. (IMI Technical Handbooks N° 1).
11. POPRAWASKY, T.J.; RIBA, G.; JONES, W. A.; AIOUN, A. Variation in isoesterase profiles of geographical populations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from *Sitona weevils* (Coleoptera: Curculionidae). Environmental Entomology 17: 275-279. 1988.
12. SMITH, R.J.; GRULA, E.A. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology 37:222-230. 1981.
13. VALDÉS D., B. E. Utilización de fuentes de carbono y nitrógeno y evaluación enzimática de aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, patogénicos a la broca del café y con patogenicidad menor del 80%. Manizales, Universidad Católica de Manizales. Facultad de Bacteriología, 1996. 80 p. (Tesis: Bacterióloga).
14. VALDÉS D., B.E.; VÉLEZ A., P. E. Caracterización bioquímica cualitativa de aislamientos de *Beauveria bassiana* de la colección de hongos entomopatógenos de Cenicafe. Revista Colombiana de Entomología 24 (1-2): 61- 66. 1998
15. WOODS, S. P.; GRULA, E. A. Utilizable surface nutrients on *Heliothis zea* available for growth of *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology 43: 259 - 269. 1984.