

Efecto de subcultivos sucesivos de *Beauveria bassiana* sobre sus características y actividad contra *Premnotrypes vorax*

Magda X. García¹
Laura F. Villamizar¹
Lisette A. Torres¹
Alba M. Cotes¹

RESUMEN. Se seleccionó el aislamiento Bv025 de *Beauveria bassiana* por presentar en un trabajo previo un porcentaje de control del 100% sobre adultos de gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* bajo en condiciones de laboratorio. Dado que posteriormente este aislamiento presentó cambios en sus características microbiológicas y de actividad entomopatogénica, los cuales podrían atribuirse al efecto de la composición de medios de cultivo, condiciones de crecimiento, sistema de conservación y subcultivos sucesivos en medio semisintético, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de subcultivos sucesivos del aislamiento en medio agar papa sacarosa sobre las características macroscópicas, germinación, velocidad de crecimiento y actividad entomopatogénica del microorganismo. Los resultados mostraron un efecto de los subcultivos sucesivos sobre las características macroscópicas de las colonias y sobre la actividad entomopatogénica, pero no sobre la viabilidad del hongo. Esto se evidenció por un aumento del crecimiento vegetativo, así como por una disminución en la esporulación y en la actividad entomopatogénica a mayor número de subcultivos, mientras que la viabilidad de las conidias no fue afectada. Las conidias provenientes del tercer subcultivo presentaron la mayor actividad entomopatogénica, con un porcentaje de mortalidad del 96%, sugiriendo que dicho subcultivo es el adecuado para realizar las producciones masivas de conidias, con miras al desarrollo de un bioplaguicida seguro, eficaz y confiable.

Palabras clave: características microbiológicas, subcultivos sucesivos, esporulación, viabilidad.

ABSTRACT. *Effects of successive Beauveria bassiana cultures on its characteristics and activity against Premnotrypes vorax.* The *Beauveria bassiana* isolate Bv025 was selected due to its high biocontrolling activity against the Andean weevil *Premnotrypes vorax* in previous research. However, this strain presented variability in its physiological and entomopathogenic characteristics in different evaluations; the changes are commonly attributed to the effect of culture media composition, growth conditions, conservation systems and successive subcultures on semisynthetic media. We studied the effect of successive subcultures of this fungus on potato sucrose agar on conidia production, germination, and growth rate and biocontrolling activity. The greatest growth rate (5.88 mm day⁻¹) was obtained with the third subculture. Abundant vegetative growth with less sporulation was obtained when the fungus was subcultivated more than four times, while conidia viability was not affected, remaining at over 95% in all treatments.

Keywords: microbiological characteristics, successive subcultures, sporulation, viability.

Introducción

Entre los problemas fitosanitarios que afectan el cultivo de la papa se encuentra el gusano blanco de la papa, *Premnotrypes vorax* (Hustache) (Coleoptera: Curculionidae), considerado una de las plagas más importantes, no sólo por su amplia distribución, sino por su persistencia y por la dificultad de ejercer un control eficiente y económico (Herrera et ál. 2000).

Entre los métodos empleados para el control de esta plaga, el uso de hongos entomopatógenos ha mostrado un alto potencial, destacándose los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* (Torres 1998). Con microorganismos de este tipo es posible el desarrollo de bioplaguicidas, para lo cual es necesario tener en cuenta sus características microbiológicas, sus requerimientos nutricionales y su susceptibilidad a condiciones ambientales, factores

¹ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Corpoica. Centro de Biotecnología y Bioindustrias. Colombia. mgarcia@corpoica.org.co, lvillamizar@corpoica.org.co lissettetorres@yahoo.es, acotes@corpoica.org.co

que pueden afectar su actividad entomopatogénica (Samsinakova y Kalalova 1981).

Diferentes estudios han demostrado el efecto del medio de cultivo sobre algunas características microbiológicas de los hongos entomopatógenos. Se ha encontrado que existe una tendencia de los microorganismos a perder su capacidad de germinación, de crecimiento, de formación de apresorios, de producción de enzimas y de infectar insectos. Además, se ha demostrado que los subcultivos sucesivos sobre los medios de cultivo, sus constituyentes, el pH, la temperatura, la humedad relativa y el pase del patógeno sobre insectos no específicos, causan una pérdida gradual de sus características, repercutiendo en su patogenicidad y virulencia (Lezama 1994).

En trabajos realizados en el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica, Colombia, se seleccionó el aislamiento de *B. bassiana* Bv025 por presentar un porcentaje de control del 100% sobre adultos de gusano blanco de la papa, luego de 24 días de haber sido inoculado sobre el insecto bajo condiciones de laboratorio (Torres y Cotes 1999). Posteriormente se desarrollaron preformulados granulados a partir de esta cepa. Todos ellos causaron mortalidades acumuladas superiores al 89% en condiciones de casa de malla, después de 20 días de haber sido aplicado el tratamiento en el suelo (Valencia 2000).

Otros trabajos desarrollados en el Laboratorio de Control Biológico con dicha cepa han producido resultados variables e inconsistentes en cuanto a los porcentajes de mortalidad del insecto; además, se han observado cambios en la morfología del microorganismo y en su capacidad de esporular y germinar. Por esta razón surgió la necesidad de determinar las posibles causas que han dado origen a un descenso en la actividad biocontroladora de *B. bassiana* Bv025 sobre el gusano blanco de la papa.

Materiales y métodos

Microorganismo y medios de cultivo

Se empleó el aislamiento de *B. bassiana* codificado como Bv025, el cual fue originalmente aislado de un adulto de gusano blanco de la papa *P. vorax* proveniente del Municipio de Motavita (Boyacá, Colombia). Esta cepa ha sido conservada en el Banco de Germoplasma de Microorganismos con Potencial en Control Biológico de Corpoica, refrigerada a 5 °C en viales con medio agar papa sacarosa recubiertos con aceite mineral.

Recuperación y reactivación de la cepa

Para la recuperación de la cepa se emplearon cajas de Petri con medio PSA, en las cuales se sembró el hongo a partir de material proveniente del banco de germoplasma y se incubó durante 10 días a 25 °C.

La reactivación de la cepa de *B. bassiana* Bv025 se realizó sobre un grupo de insectos adultos de *P. vorax* recolectados en el campo, los cuales se desinfectaron e inocularon con el microorganismo siguiendo la metodología citada por Torres (1998).

Subcultivos sucesivos en medio semisintético

Luego de la recuperación y reactivación del microorganismo, se realizó un cultivo en caja de Petri que contenía medio agar papa sacarosa (PSA) y, a partir de este, se realizaron subcultivos sucesivos en este mismo medio cada ocho días hasta llegar al subcultivo número 13. El hongo creció durante 8 días a 24 °C con luz constante. Cada semana se realizó un subcultivo a partir del insecto y a partir de éste se generó una nueva serie de subcultivos sucesivos, de manera tal que la serie de subcultivos generada cada semana fue codificada con letras hasta llegar a la letra M en la semana

Cuadro 1. Cronograma desarrollado para la elaboración de los subcultivos de *Beauveria bassiana* Bv025 sobre medio semisintético

Semana	Subcultivo												
1	Subcultivo en caja a partir del material del banco de germoplasma												
2	Reactivación en insecto												
3	1A												
4	2A	1B											
5	3A	2B	1C										
6	4A	3B	2C	1D									
7	5A	4B	3C	2D	1E								
8	6A	5B	4C	3D	2E	1F							
9	7A	6B	5C	4D	3E	2F	1G						
10	8A	7B	6C	5D	4E	3F	2G	1H					
11	9A	8B	7C	6D	5E	4F	3G	2H	1I				
12	10A	9B	8C	7D	6E	5F	4G	3H	2I	1J			
13	11A	10B	9C	8D	7E	6F	5G	4H	3I	2J	1K		
14	12A	11B	10C	9D	8E	7F	6G	5H	4I	3J	2K	1L	
15	13A	12B	11C	10D	9E	8F	7G	6H	5I	4J	3K	2L	1M

15. Siguiendo esta metodología se contó en la misma semana con los subcultivos 2, 3, 4, 7, 10 y 13 sobre medio semisintético, todos con ocho días de edad (Cuadro 1).

Porcentaje de germinación

Se evaluó el porcentaje de germinación de las conidias de los subcultivos número 2, 3, 4, 7, 10 y 13. Para ello, se tomó una muestra de 0,05 g de conidias del hongo y se colocó en tubos con 9 mL de Tween® 80 al 0,1%. Luego de homogeneizar las muestras se sembraron 0,1 mL en tres cajas de Petri con agar extracto de malta, consistiendo cada una en una unidad experimental. Las cajas se incubaron a 25 °C durante 20 horas. Se contaron las conidias germinadas y sin germinar en 10 campos ópticos por cada unidad experimental (caja de Petri), mediante observación al microscopio. Con estos resultados se calculó el porcentaje de germinación utilizando la fórmula germinación (%) = conidias germinadas × 100/conidias no germinadas + conidias germinadas.

El diseño experimental fue completamente al azar, con tres repeticiones por tratamiento, y los resultados fueron analizados con el programa Statistic mediante un análisis de varianza ANAVA ($P = 0,05$).

Tasa de crecimiento diametral y características morfológicas

A partir de los pases 1, 2, 3, 6, 9 y 12 se realizó el subcultivo siguiente sobre medio semisintético. Para tal fin, se cortaron con un sacabocados de 0,5 cm de diámetro fragmentos de medio colonizado por el hongo de ocho días de edad, los cuales se ubicaron individualmente en el centro de tres cajas de Petri con medio agar papa sacarosa. El crecimiento diametral de la colonia fue medido a los 5, 8 y 10 días después de haberse realizado la inoculación. Conjuntamente con la evaluación del crecimiento diametral, se observaron las características morfológicas macroscópicas de las colonias formadas. El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento y los resultados fueron analizados con el programa Statistic mediante un análisis de varianza ANAVA ($P = 0,05$) y una prueba de comparación de medias de Kruskal-Wallis ($P = 0,05$).

Evaluación de la virulencia de diferentes subcultivos del aislamiento Bv025 de *B. bassiana* sobre *P. vorax*

Los adultos de *P. vorax* previamente desinfectados se sumergieron durante un minuto y medio en una suspensión de conidias correspondiente a cada uno de los tratamientos por evaluar ajustada a una concentración de 1×10^8 conidias mL⁻¹, utilizando las conidias provenientes de los subcultivos número 2, 3, 4, 7, 10 y 13 crecidos en medio

semisintético. Cada tratamiento contó con tres unidades experimentales, cada una de ellas de diez adultos inoculados y ubicados conjuntamente en una caja de Petri estéril con una servilleta húmeda y foliolos de *Solanum tuberosum* para su alimentación. Las hojas y las servilletas fueron renovadas cada vez que se evaluó el ensayo, es decir, en los días 2, 5, 8, 9, 10, 11, 12 y 15. Las cajas se mantuvieron en condiciones de laboratorio, a una temperatura ambiente promedio de 18 °C. Los insectos que murieron se ubicaron en cámaras húmedas para corroborar que su muerte hubiese sido ocasionada por el hongo en estudio. Se determinó el porcentaje de eficacia de cada uno de los tratamientos mediante la fórmula de Schneider-Orelli (Zar 1999). El diseño experimental fue completamente al azar, con tres repeticiones por tratamiento, y los resultados se analizaron con el Programa Statistic mediante un análisis de varianza ANAVA y a una prueba de comparación de medias de Tukey ($P = 0,05$).

Resultados y discusión

Germinación de conidias

Las conidias de todos los tratamientos superaron el 95% de germinación a las 20 horas de incubación, resultados que indicaron que las conidias provenientes de todos los subcultivos presentaron una alta capacidad de germinación, la cual no se vio influenciada por los subcultivos sucesivos en medio semisintético. Este valor de germinación es adecuado considerando que se ha establecido como un parámetro de calidad de bioplaguicidas una germinación superior al 90% a las 24 horas de incubación (Velez et ál. 1997).

El análisis de varianza ($P > 0,05$) no detectó diferencias significativas entre los porcentajes de germinación de las conidias de los diferentes tratamientos, lo que significa que el comportamiento de los porcentajes de germinación obtenidos en el presente estudio podría deberse a que las conidias de Bv025 provenientes de todos los subcultivos evaluados tenían la misma edad cuando se evaluó este parámetro, considerando que la edad de las células ha demostrado ser un factor determinante en la capacidad de desarrollo de las mismas, como informan Dillon y Charnley (1990). Adicionalmente, la germinación de las conidias de todos los tratamientos se produjo de manera sincronizada, posiblemente porque todos las conidias eran jóvenes y de la misma edad (8 días), no habiéndose generado estados de latencia en los propágulos del microorganismo (Milner et ál. 1991).

Milner et ál. 1991 demostraron que la germinación de las conidias también se puede ver influenciada por otros factores, como la composición del medio de cultivo en el cual se evalúa dicho parámetro, fenómeno que no se

evidenció en el presente estudio, dado que la germinación de las conidias de todos los tratamientos fue evaluada en medio agar extracto de malta, razón por la que no se presentaron diferencias entre las germinaciones de las conidias de todos los subcultivos. El medio semisintético empleado para evaluar la germinación probablemente proporcionó al hongo todos los requerimientos nutricionales para germinar, debido a que sus componentes principales son sacarosa y peptona, fuentes de carbono y nitrógeno adecuadas para este microorganismo que no tiene requerimientos complejos, como demostraron Smith y Grula (1980).

Resultados similares a los obtenidos en el presente estudio fueron reportados por Brownbridge et ál. (2001), quienes evaluaron el efecto de los subcultivos sucesivos uno, cinco, diez y quince sobre la germinación de un aislamiento de *B. bassiana*, encontrando una germinación de conidias superior al 95% en todos los casos luego de 16 horas de incubación, permitiendo concluir que los subcultivos sucesivos de este aislamiento no afectaron su germinación.

Características morfológicas

El crecimiento del aislamiento Bv025 de *B. bassiana* en los subcultivos dos y tres fue plano, con poco crecimiento micelial y abundante esporulación de apariencia pulverulenta y de color crema (*Atlas de los colores*: N00 – C00 – A20; Koppers 1996) (Figura 1). El crecimiento de estas colonias fue circular, regular y con bordes definidos.

Al avanzar en el número de subcultivos se observó un cambio de estas características: el crecimiento de las colonias fue elevado sobre la superficie del medio, con apariencia algodonosa y abundante crecimiento micelial de color blanco (*Atlas de los colores*: N00 – C00 – A00; Koppers 1996). La



Figura 1. Características de las colonias de los subcultivos 2, 3, 4, 7, 10 y 13 del aislamiento de *Beauveria bassiana* Bv025 en medio semisintético (foto: Arias).

esporulación en estos últimos subcultivos fue menor a la encontrada en los subcultivos dos y tres y las colonias nunca presentaron apariencia pulverulenta (Figura 1).

Los resultados obtenidos indican que los subcultivos sucesivos de este aislamiento afectaron sus características morfológicas cuando el hongo fue cultivado consecutivamente en medio semisintético, fenómeno que podría estar relacionado con el origen multiespórico de cada subcultivo, considerando que cada espora posee varios núcleos con información genética diferente (Estrada et ál. 1997), lo cual podría haber generado la variabilidad.

El efecto de los subcultivos sucesivos ha sido reportado para hongos como *Metarhizium anisopliae* y *Verticillium lecanii*, para los cuales se ha concluido que a medida que se avanza en los subcultivos sucesivos, disminuye la esporulación y aumenta la producción de micelio estéril (Hall 1980). Sin embargo, al hacer pases sobre insectos hospederos, el hongo puede recuperar sus características morfológicas iniciales, como observó Hall (1976) para *V. lecanii*.

En contraste con los resultados obtenidos en el presente trabajo, Brownbridge et ál. (2001) no encontraron diferencias en la apariencia de las colonias de un aislamiento de *B. bassiana* luego de ser subcultivado sucesivamente durante 15 veces, lo que sugiere que la estabilidad morfológica del microorganismo con respecto a los subcultivos sucesivos depende de las características propias de cada aislamiento.

Ya que en el presente estudio el aislamiento de *B. bassiana* Bv025 presentó cambios en sus características morfológicas iniciales a medida que se avanzó en los cultivos sucesivos, sería recomendable evaluar el efecto de los pases del hongo en su hospedero sobre la morfología de las colonias del microorganismo.

Tasa de crecimiento diametral

Los subcultivos sucesivos afectaron la tasa de crecimiento diametral del aislamiento Bv025, obteniéndose los mayores diámetros de colonia con los primeros subcultivos. Este parámetro disminuyó a medida que se avanzó en los subcultivos sucesivos. En el tercer subcultivo se observaron los mayores diámetros de colonia en todos los tiempos evaluados, los cuales correspondieron a valores de 32,7 mm, 47,3 mm y 66 mm en los días 5, 8 y 10 de inoculación, respectivamente, sugiriendo que durante este subcultivo el hongo presentó una mayor tasa de crecimiento. Al realizar un análisis de regresión que correlacionó los datos de diámetro de la colonia contra los diferentes tiempos de evaluación, se calculó la velocidad de crecimiento expresada como la pendiente de la recta obtenida. Todas las líneas presentaron un coeficiente de correlación superior a 0,90, resultado que

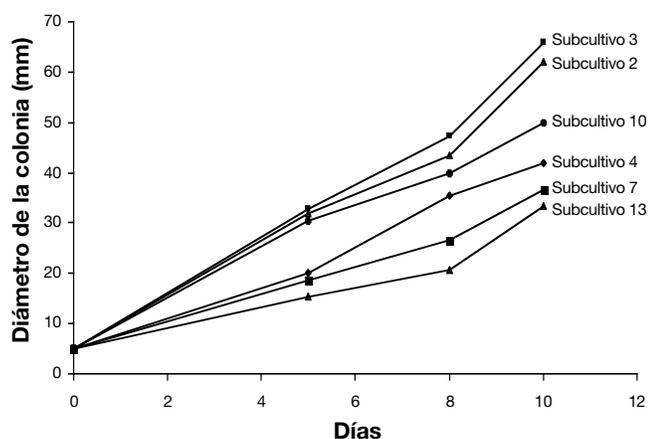


Figura 2. Tasa de crecimiento diametral de los subcultivos 2, 3, 4, 7, 10 y 13 del aislamiento de *Beauveria bassiana* Bv025 en medio semisintético.

indica que la correlación de los datos de diámetro y tiempo tienen una tendencia lineal y se ajustaron a la ecuación de una línea recta. La mayor tasa de crecimiento se obtuvo con el pase número 3 con un valor de 5,88 mm día⁻¹ (Figura 2, Cuadro 2). Estos resultados indican que los tratamientos que presentaron el mayor y más rápido crecimiento corresponden a los pases 2 y 3, permitiendo recomendarlos para realizar la producción masiva de *B. bassiana* con miras a la manufactura eficiente de un bioplaguicida a escala industrial.

El análisis estadístico de Kruskal-Wallis ($P > 0,05$) no detectó diferencias entre la tasa de crecimiento diametral correspondiente a los subcultivos 2, 3, 4, 7, y 10, ni tampoco entre las velocidades de crecimiento de los pases 2, 4, 7, 10 y 13, pero sí entre la del pase 3 y 13 (Cuadro 2). A pesar de no encontrarse diferencias significativas entre la mayoría de los tratamientos, se observó una tendencia numérica hacia la disminución de la tasa de crecimiento a medida que se avanzó con el número de subcultivos sucesivos, fenómeno que podría atribuirse al silenciamiento de genes que codifican para proteínas como nanoproteínas, quitina y glucano sintetasas implicadas en el proceso de crecimiento hifal como consecuencia de las transferencias seriadas (Fall 2003). Este efecto fue determinado para *Blastomyces dermatitidis* después de haber sido subcultivado en un rango de 8 a 49 años (Ferreti y Morales 2001). Las mutaciones generadas como consecuencia de los subcultivos también han sido reportadas para hongos como *Neurospora crassa*, ubicándose principalmente en el ADN mitocondrial (Sandrock et ál. 1998) y originando una pérdida de genes como *NhKINI*, que codifica para la proteína Kinesina, implicada en la elongación apical de las hifas. En este estudio los autores observaron que con la pérdida de este gen la tasa de crecimiento disminuyó en un 50%, concluyendo que esta proteína es fundamental para el desarrollo fisiológico de *N. crassa*.

El origen multiespórico del aislamiento Bv025 pudo haber dado lugar a un cultivo heterogéneo, en el que pueden ocurrir variaciones celulares que implican cambios en las propiedades físicas, fisiológicas y bioquímicas de los microorganismos según reportaron Estrada et ál. 1997. Este tipo de variaciones pudieron haber ocurrido a través de los subcultivos sucesivos, generando variaciones en las características de crecimiento del microorganismo.

Evaluación de la virulencia de diferentes subcultivos del aislamiento de Bv025 sobre *P. vorax*

Los subcultivos sucesivos del microorganismo afectaron su patogenicidad a medida que se avanzó en ellos. A pesar de no encontrarse diferencias significativas entre los pases 2, 3, 4, 7 y 10, ni entre los pases 2, 4, 7, 10 y 13 según los resultados de la prueba de comparación de medias de Tukey ($P > 0,05$), se observó una tendencia numérica a un mayor porcentaje de eficacia con las conidias de los primeros pases, el cual fue disminuyendo a medida que se avanzaba en las transferencias seriadas (Fig. 3). Se observó que los mayores porcentajes de eficacia se obtuvieron con las conidias del pase número 3, con un 96,4%, seguido por los obtenidos con el subcultivo 2, con un 92,8%. A partir de estos tratamientos el porcentaje de eficacia del microorganismo disminuyó a medida que se avanzó en el número de transferencias, obteniéndose el menor porcentaje de control con las conidias provenientes del subcultivo 13, con un valor del 57,1%

El mayor porcentaje de eficacia fue obtenido con las conidias del subcultivo 3, los cuales no presentaron diferencias estadísticas con el porcentaje de eficacia de las conidias provenientes de los pases 2, 4, 7 y 10, pero sí con los resultados obtenidos con las conidias del subcultivo 13, tratamiento con el cual se alcanzaron los menores porcentajes de eficacia para el control del gusano blanco de la papa.

La variación observada en los porcentajes de mortalidad a través de los subcultivos pudo deberse a que

Cuadro 2. Velocidad de crecimiento de los subcultivos 2, 3, 4, 7, 10 y 13 del aislamiento de *B. bassiana* Bv025 en medio semisintético (PSA)

Tratamiento	Velocidad de crecimiento
	mm.día ⁻¹
Subcultivo 3	5,88 a
Subcultivo 2	5,43 ab
Subcultivo 10	4,42 ab
Subcultivo 4	3,77 ab
Subcultivo 7	3,05 ab
Subcultivo 13	2,60 b

Nota: los resultados seguidos por la misma letra no presentaron diferencias significativas según la prueba de prueba de comparación de medias de Kruskal-Wallis ($P = 0,05$).

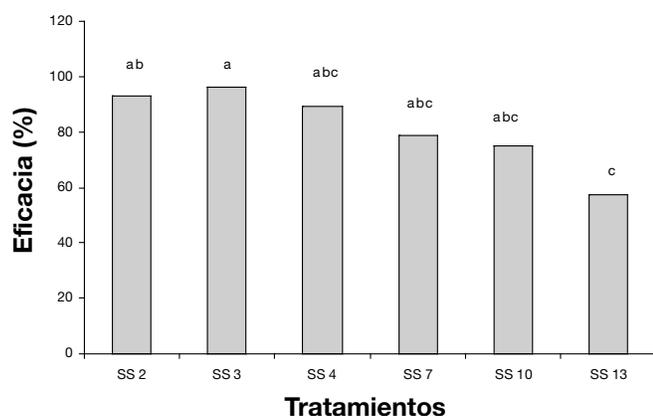


Figura 3. Virulencia de *Beauveria bassiana* Bv025 provenientes de los subcultivos 2, 3, 4, 7, 10 y 13 en medio semisintético sobre adultos de *Premnotrypes vorax*. Los resultados acompañados de la misma letra no presentaron diferencias estadísticas según la comparación de medias de Tukey ($P > 0,05$).

se trabajó con cultivos multiespóricos, es decir provenientes del cultivo de varias esporas, cada una con un contenido genético diferente, debido al fenómeno de heterocariosis (varios núcleos) que presenta este microorganismo (Estrada et ál. 1997). Giraldo et ál. (2001) demostraron que se obtenían niveles más altos y constantes de patogenicidad al realizar cultivos monoespóricos de *M. anisopliae* sobre la broca del café *Hypothenemus hampei* en comparación con los multiespóricos.

La virulencia de los hongos entomopatógenos está determinada por diferentes factores que dependen del material genético, como la producción de enzimas y toxinas (Estrada et ál. 1997). Por tal razón, una posible causa de la disminución de la patogenicidad del aislamiento Bv025 a medida que se avanzó en los subcultivos sucesivos podría ser el silenciamiento de genes determinantes en el desarrollo de las diferentes etapas del mecanismo de infección, como aquellos que codifican para enzimas como la N-acetil glucosaminidasa y quimolastasa proteasa PR1 (Clarkson y Charnley 1996). Este efecto fue reportado por Bosa (2001), quien encontró una pérdida de la actividad biocontroladora de *Serratia marscecens* contra la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*, a medida que se avanzaba en los subcultivos sucesivos. Dicha pérdida estuvo correlacionada con la disminución en la actividad de las enzimas mencionadas anteriormente.

Al igual que en este trabajo, algunos autores han reportado una pérdida de la patogenicidad de los microorganismos debido al efecto de los subcultivos sucesivos. Morrow et ál. (1989) observaron que la virulencia de *N. rileyi* sobre larvas de primer instar de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) se mantuvo alta hasta el quinto subcultivo, llegando a una pérdida total de

la patogenicidad en el pase número 16. Esta atenuación en la virulencia fue asociada con una pérdida de la capacidad de formar cuerpos hifales, tal vez inducida por subcultivos sucesivos del hongo. Este efecto también ha sido observado en *B. bassiana* luego de ser cultivado siete veces en sustrato de arroz, observándose una reducción del 93 al 37% en la virulencia del microorganismo sobre *H. hampei*, razón por la cual los autores recomiendan realizar cultivos del hongo sobre adultos de broca de café (Cenicafé 1993).

Ignoffo et ál. (1982) reportaron resultados similares a los obtenidos en el presente estudio, ya que tras evaluar el efecto de los subcultivos sucesivos sobre las características de un aislamiento de *N. rileyi*, determinaron que su actividad biocontroladora de larvas de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae), se mantuvo estable hasta el subcultivo 12 tanto en medio de cultivo semisintético como en insectos hospederos, presentando una disminución de la actividad a partir de este subcultivo y obteniéndose el menor porcentaje de mortalidad en el pase 15.

En otro trabajo realizado por Hall (1980), se observaron cambios fisiológicos y morfológicos pero no atenuación de la virulencia de *V. lecanii* sobre el áfido *Macrosiphoniella sanborni* (Homoptera: Aphididae) luego de 98 subcultivos sucesivos del hongo en diferentes medios. La patogenicidad del microorganismo permaneció estable luego de sus subcultivos sobre medio semisintético y sobre áfidos, a pesar de lo reportado por otros autores, quienes han observado un aumento en la virulencia de los microorganismos entomopatógenos luego de su crecimiento sobre sus insectos hospederos. Brownbridge et ál. (2001) tampoco encontraron un efecto de los subcultivos sucesivos en la virulencia de *B. bassiana* luego de ser evaluados los pases 1, 5, 10 y 15 sobre ninfas de *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae), fenómeno que fue atribuido a que los factores genéticos que controlan la patogenicidad en el hongo son bastante estables para la cepa evaluada.

Como se puede observar, no es posible generalizar una conclusión referente al efecto de los subcultivos sucesivos en la virulencia y las características morfológicas y fisiológicas de estos microorganismos, ya que dicho efecto depende de las características genéticas propias de cada aislamiento, como reportaron Ignoffo et ál. (1982) y Daust y Roberts (1983), quienes afirman que la actividad insecticida de algunos aislamientos depende principalmente de las características genéticas de cada cepa, el origen geográfico, el hospedero de origen, su capacidad de esporulación, su actividad enzimática y la viabilidad de las conidias. Brownbridge et ál. (2001) atribuyen el efecto diferencial de los subcultivos sucesivos en los microorganismos a una

variación inter e intraespecífica de la estabilidad genética de características como la patogenicidad, a diferencias en las metodologías usadas, a atenuaciones ocurridas al azar (mutaciones) o al efecto de las condiciones de cultivo.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten concluir que los subcultivos sucesivos de este aislamiento afectaron sus características morfológicas, fisiológicas y su patogenicidad. Los mejores resultados se obtuvieron con las conidias provenientes de los subcultivos dos y tres, en los cuales se observó la mayor velocidad de crecimiento y actividad biocontroladora del gusano blanco de la papa, permitiendo sugerir el uso de estos subcultivos en procesos de producción masiva del aislamiento Bv025 con miras a la manufactura eficiente y rentable de bioplaguicidas de alta calidad.

Agradecimientos

A Pronatta por el apoyo financiero para el desarrollo del presente trabajo y a los investigadores del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica por sus orientaciones y aportes científicos para el cumplimiento de los objetivos propuestos.

Literatura citada

- Bosa, C. 2001. Efecto de la composición del medio de cultivo, los pases sucesivos y la actividad enzimática de *Serratia marcescens* sobre su actividad biocontroladora hacia *Tecia solanivora* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae). Tesis de maestría en Ciencias Agrarias. Bogotá, CO, Universidad Nacional de Colombia. 130 p.
- Brownbridge, M; Costa, S; Jaronski, S. 2001. Effects of *in vitro* passage of *Beauveria bassiana* on virulence to *Bemisia argentifolii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 77:280-283.
- Centro Nacional de Investigaciones de Café-Cenicafé. 1993. Pérdida de virulencia del hongo *Beauveria bassiana* cultivado sucesivamente en sustrato de arroz. *Brocarta* 14:2.
- Clarkson, J; Charnley, B. 1996. New insight into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology* 4:197-201.
- Daust, R; Roberts, D. 1983. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effects of growth substrate conidia survival and virulence against mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology* 41:161-170.
- Dillon, R; Charnley, A. 1990. Initiation of germination in conidia of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research* 94:299-304.
- Estrada, V; Vélez, A; López, J. 1997. Estandarización de una metodología para obtener cultivos monospóricos del hongo *Beauveria bassiana*. *Cenicafé* 48:59-65.
- Fall 2003. *Mycology. Fungal Growth* (en línea). Consultado 20 septiembre 2003. Disponible en <http://www.towson.edu/~wubah/mycology/Growth.htm>.
- Ferreti, R; Morales, C. 2001. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. *Review of Iberoamerican Mycology* 18:191-196.
- Giraldo, E; López, Y; Delgado, F; Vélez, P. 2001. Actividad lipolítica y proteolítica de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* y su relación con la patogenicidad sobre *Hypothenemus hampei*. *Revista Colombiana de Entomología* 27:61-65.
- Hall, R. 1976. *Verticillium lecanii* on the aphid *Macrosiphoniella saborni*. *Journal of Invertebrate Pathology* 28:389-391.
- _____. 1980. Effect of subculturing on agar and passing through an insect host on pathogenicity morphology, and growth rate of *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 36:216-222.
- Herrera, C; Fierro, L; Moreno, J. 2000. Manejo Integrado del Cultivo de la Papa. Manual Técnico. Tibaitatá, CO, Produmendios, Corpoica C.I. 117 p.
- Ignoffo, C; Mcintosh, A; Garcia, C; Kroha, M; Johnson, J. 1982. Effects of successive *in vitro* and *in vivo* passages on the virulence of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Entomophaga* 27:371-378.
- Kuppers, H. 1996. Atlas de los colores. Barcelona, ES, Editorial Blume. 69 p.
- Lezama, R. 1994. Patogenicidad de hongos parásitos de insectos. Primer Seminario de Patología. FCBA. Colombia, Universidad de Colima. p. 47-82.
- Milner, R; Huppatz, R; Swaris, S. 1991. A new method for assessment of germination of *Metarhizium* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology* 57:121-123.
- Morrow, B; Boucias, D; Heath, M. 1989. Loss of virulence in an isolate of an entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*, after serial *in vitro* passage. *Journal Economic Entomology* 82:404-407.
- Sandrock, T; Wu, Q; Turgeon, B; Yoder, O; Wirsal, S; Aist, J. 1998. A fungal kinesin required for organelle motility, hyphal growth, and morphogenesis. *Mol Biol Cell* 9:89-101.
- Samsinakova, A; Kalalova, S. 1981. Mass production of *Beauveria bassiana* for regulation of *Leptinotarsa decemlineata* populations. *Journal of Invertebrate Pathology* 38:169-174.
- Smith, R; Grula, E. 1981. Nutritional requirements for conidia germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 37:222-230.
- Torres, L. 1998. Evaluación de la actividad biocontroladora de cepas nativas de hongos entomopatógenos contra el gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Hustache) mediante su utilización individual o combinada. Trabajo de pregrado. Bogotá, CO, Universidad Javeriana. p. 68.
- _____; Cotes, A. 1999. Evaluación de la actividad biocontroladora de cepas nativas de hongos entomopatógenos contra el gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Hustache) mediante su utilización individual o combinada. *Revista Colombiana de Entomología* 25:121-129.
- Valencia, C. 2000. Control de calidad físico, biológico y microbiológico de preformulados a base del hongo *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin. Trabajo de pregrado. Bogotá, CO, Universidad Javeriana. 33 p.
- Vélez, P; Posada, FJ; Marín, P; Bustillo, AE; González, MT; Osorio, E. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Colombia, Cenicafé, Boletín Técnico no. 17. 37 p.
- Zar, J. 1999. *Bioestatistical analysis*. 4 ed. Nueva Jersey, US, Prentice-Hall. 663 p.