

Evaluación de la estabilidad de *Paecilomyces* sp. y *Beauveria bassiana* frente a la radiación ultravioleta

Evaluation of the stability of *Paecilomyces* sp. and *Beauveria bassiana* under ultraviolet radiation

ERIKA PAOLA GRIJALBA¹, LAURA VILLAMIZAR R.² y ALBA MARINA COTES P.³

Resumen: Se desarrollaron dos prototipos de bioplaguicida formulados como polvos mojables a partir de dos aislamientos nativos de *Paecilomyces* sp. y *Beauveria bassiana* previamente seleccionados por su alta actividad biocontroladora de *Bemisia tabaci*. Dado que la radiación ultravioleta (UV) es uno de los factores más limitantes al emplear microorganismos en campo, el presente trabajo determinó la estabilidad de conidios formulados y sin formular de estos dos hongos, frente a la luz ultravioleta (UV). Se evaluó la germinación de los microorganismos en agar extracto de malta, antes y después de ser expuestos durante tres, seis y 24 horas a radiación ultravioleta C (UVC) bajo condiciones de laboratorio. Adicionalmente se evaluó el efecto de la radiación solar sobre conidios de los dos hongos durante seis horas de exposición directa al sol en el municipio de El Espinal (Tolima). La radiación UVC no afectó la germinación de conidios de *Paecilomyces* sp. sin formular, en tanto que la radiación solar redujo su germinación en 43% y en 42% para los conidios sin formular y formulados, respectivamente. La radiación UVC y la luz solar disminuyeron la germinación de conidios sin formular de *B. bassiana* en 43% y 46% respectivamente. Para los conidios formulados, la radiación solar redujo en 26% la germinación. La formulación evaluada protegió los conidios de *B. bassiana* de la radiación solar pero no los de *Paecilomyces* sp., siendo necesario para este último evaluar filtros solares que puedan incluirse en la formulación.

Palabras clave: Radiación solar. Bioplaguicida. Formulación.

Abstract: Two biopesticide prototypes were developed, formulated as wettable powders by using two native isolates of *Paecilomyces* sp. and *Beauveria bassiana* previously selected for their high biocontrol activity on *Bemisia tabaci*. Considering that ultraviolet (UV) radiation is one of the most limiting factors when microorganisms are applied under field conditions, the aim of this study was to determine the stability of formulated and unformulated conidia of these fungi when exposed to UV light. Germination of the microorganisms was evaluated in malt extract agar before and after three, six and 24 hours of exposure to UV "C" radiation, under laboratory conditions. In addition, the effect of solar radiation under field conditions was evaluated during six hours of direct exposure to sun in the municipality of El Espinal (Tolima). The UVC radiation did not affect germination of unformulated *Paecilomyces* sp. conidia, while solar radiation reduced germination by 43 and 42% for unformulated and formulated conidia, respectively. UVC and solar radiation reduced germination of unformulated *B. bassiana* conidia by 43 and 46%, respectively. For formulated conidia, solar radiation reduced germination by 26%. The evaluated formulation protected conidia of *B. bassiana* against solar radiation, but not those of *Paecilomyces* sp., making it necessary for the latter to evaluate sunscreens that might be included in the formulation.

Key words: Solar radiation. Biopesticide. Formulation.

Introducción

Los hongos entomopatógenos *Paecilomyces* sp. y *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin son comúnmente empleados en el control biológico de insectos de la familia Aleyrodidae (Eyal *et al.* 1994). Dentro de las 1200 especies de moscas blancas, *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) se destaca debido a las pérdidas ocasionadas en diferentes cultivos y a las dificultades para su control mediante métodos químicos (López 1994). Estudios realizados por López y García (2000), mostraron que los departamentos de Tolima, Cundinamarca, Santander y Cesar tienen mayor incidencia de esta plaga, con pérdidas que oscilan entre el 25 y el 100% en cultivos de tomate, algodón, frijol, melón y varias plantas ornamentales. Por otra parte, en los departamentos de Magdalena, Guajira y Atlántico, *B. tabaci* se presentó de manera aislada en algunos municipios, aunque su incidencia fue elevada y causó pérdidas hasta del 100% en diversos cultivos.

La eficacia de los microorganismos utilizados como principio activo de bioplaguicidas está directamente relacionada con su viabilidad y puede ser afectada por diferentes factores ambientales. La persistencia de los conidios de los hongos entomopatógenos en campo, es afectada principalmente por la radiación ultravioleta proveniente del sol (Smits *et al.* 2004). Por ejemplo, de acuerdo con los estudios realizados por Moore *et al.* (1996), la germinación de conidios de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorok expuestos a la radiación solar disminuyó su viabilidad a la mitad después de dos horas de exposición.

La radiación solar de acuerdo con su longitud de onda, se ha clasificado en tres tipos, entre 100 a 280 nm se denomina UVC, de 280 a 320 nm correspondiente a UVB y UVA desde 320 a 400 nm, siendo estas dos últimas capaces de atravesar la atmósfera terrestre y de ocasionar diversos efectos sobre los seres vivos. La radiación UVC es absorbida por parte de las moléculas de ozono y oxígeno molecular presentes en la estrato-

¹ Investigadora. Q.F. CORPOICA. A.A 240142 Parque Central Bavaria Las Palmas, Bogotá. egrijalba@corpoica.org.co. Autor para correspondencia.

² Investigadora. M. Sc. Microbiología. CORPOICA. A.A 240142 Parque Central Bavaria Las Palmas, Bogotá. lvillamizar@corpoica.org.co.

³ Investigadora. Ph. D. Fitopatología. CORPOICA. A.A 240142 Parque Central Bavaria Las Palmas, Bogotá. acotes@corpoica.org.co.

tosfera (Ribera y Paradelo 1997). La acción de la radiación ultravioleta sobre los microorganismos, se debe a la presencia de grupos cromóforos en diferentes estructuras celulares, tales como ácidos nucleicos, lípidos y proteínas capaces de absorber ciertas longitudes de onda que ocasionan daños directos o indirectos sobre las macromoléculas. Los daños directos se refieren a la formación de fotoproductos generalmente a nivel del ADN, donde se forman dímeros de bases pirimidínicas adyacentes sobre la misma cadena de ADN tipo timina - timina, timina - citosina y citosina - citosina, por acción de la radiación UVC o UVB (Nicholson *et al.* 2005). Sin embargo, la radiación UVA puede también generar dímeros de timina (Young *et al.* 1998; Kielbassa y Epe 2000).

En segundo lugar, la radiación UVA causa daños directos debido a la formación de especies reactivas de oxígeno tales como peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo o superóxidos, capaces de oxidar las pentosas del ADN y de romper la doble cadena de la molécula (Diffey 1991). También puede producir peroxidaciones lipídicas al reaccionar con los ácidos grasos de los fosfolípidos, lo cual afecta la fluidez de la membrana celular (Gutteridge y Halliwell 1990; Aikens y Dix 1991; Choe *et al.* 1995). Además de los daños que a nivel del ADN nuclear puede causar el estrés oxidativo, el ADN mitocondrial también puede sufrir alteraciones considerando que los mecanismos de reparación de los ácidos nucleicos en la mitocondria son menos eficaces (Krutmann 2001). Estos daños se traducen en retraso en el crecimiento, mutaciones o muerte celular de los hongos (Braga *et al.* 2001).

Para asegurar la eficacia de los microorganismos empleados para el control de plagas bajo condiciones de campo, se pueden utilizar cepas tolerantes a la radiación ultravioleta, las cuales emplean mecanismos de defensa tales como la secreción de pigmentos de absorción (Hullo *et al.* 2001; Saxene *et al.* 2002) o la reparación de los daños del ADN (Setlow 1988). También es posible tener en cuenta en el diseño de formulaciones, el uso de adyuvantes que actúen como protectores solares. Los filtros solares absorben selectivamente la radiación UV incidente. Otros protectores solares pueden dispersar o reflejar la radiación (pantallas solares), entre los que se destacan el óxido de zinc (ZnO) y el dióxido de titanio (TiO₂) (Mulero 2004). En un trabajo desarrollado por Villamizar *et al.* (1997), se evaluó el efecto de la radiación UVC y de la luz solar sobre conidios de *M. anisopliae* formulados y sin formular. La formulación incluía pantallas solares que protegieron al microorganismo, ya que se encontró que la viabilidad de los conidios sin formular expuestos a los dos tipos de radiación, disminuyó significativamente con respecto a los tratamientos no expuestos. En el caso de los conidios formulados, la viabilidad no presentó pérdidas significativas después de la exposición a la luz, confirmando la eficacia de los protectores utilizados contra la luz UV.

En trabajos previos realizados en el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica, se seleccionaron por su alto potencial biocontrolador de *B. tabaci*, un aislamiento de *Paecilomyces* sp. y uno de *B. bassiana* codificados como Pc013 y Bv056, obtenidos a partir de este insecto en un cultivo de tomate en Ciénaga (Magdalena) y en un cultivo de algodón en Prado (Tolima), respectivamente. Con estos microorganismos se desarrollaron dos prototipos de bioplaguicidas formulados como polvos mojables. Teniendo en cuenta que en el desarrollo de nuevas formulaciones a base de hongos, bacterias o virus, se hace necesario conocer el efecto que la radiación ultravioleta ejerce sobre los mismos y llevar a cabo pruebas que permitan

seleccionar el protector solar más adecuado en cada caso, se planteó como objetivo del presente estudio, determinar la estabilidad de los conidios de *Paecilomyces* sp. y de *B. bassiana* formulados y sin formular frente a la luz ultravioleta.

Materiales y Métodos

Este trabajo se dividió en dos etapas: en la primera se determinó el efecto de la radiación UVC sobre los conidios sin formular de *Paecilomyces* sp. y de *B. bassiana* bajo condiciones de laboratorio y en la segunda fase se estableció el efecto de la radiación solar sobre los conidios formulados y sin formular de cada hongo, en condiciones de campo.

Radiación UVC sobre conidios sin formular. El efecto de la radiación UVC se determinó mediante pruebas realizadas en el Laboratorio de Control Biológico de CORPOICA. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. La unidad experimental consistió en una caja de Petri estéril sobre la que se colocaron 0,1 g de conidios puros y secos de *Paecilomyces* sp. Pc013 o de *B. bassiana*, Bv056, los cuales se extendieron cubriendo la superficie de la caja.

Las cajas se cubrieron con una película plástica de polivinileno (Vinipel) que permite el paso de la radiación UV y se expusieron a una distancia de 20 cm de una lámpara (Silvana T8G30) que emite radiación ultravioleta monocromática tipo C con una longitud de onda de 254 nm (95 $\mu\text{watt}/\text{cm}^2/\text{seg}$). Se evaluó la germinación de los conidios en cuatro momentos: antes de iniciar la exposición y pasadas tres, seis y 24 horas de exposición. Para tal fin, los conidios se suspendieron en una solución de Tween 80 al 0,1% y a partir de esta suspensión se realizó una dilución decimal. De cada dilución se tomaron 0,1 ml y se inocularon en una caja de Petri con agar extracto de malta por triplicado. Las cajas se incubaron durante 24 horas a 25°C, tiempo después del cual, se cortó un cuadrado de agar de 1 cm² que se colocó sobre una lámina portaobjetos. Sobre el agar se adicionó una gota de azul de lactofenol y posteriormente, utilizando un microscopio con el objetivo de 40X, se realizó la lectura de los conidios germinados y sin germinar en 10 campos ópticos por réplica. Los resultados se analizaron mediante un ANAVA y una comparación de medias de los valores de germinación de los conidios no formulados (Tukey, $\alpha = 0,05$).

Radiación solar sobre conidios formulados y sin formular. La segunda parte de este trabajo se realizó en el municipio de El Espinal (Tolima), debido a que en esta región se presenta una alta incidencia de *Bemisia tabaci*. Este municipio se encuentra ubicado a 04°09'19"N y 74°53'19"W, a una altitud de 320 msnm, con una temperatura media de 27,1°C (Instituto Geográfico Agustín Codazzi 1996) y un promedio diario de radiación solar global en el mes de agosto año 2005 (época en la que se llevó a cabo este estudio) de 4,5 - 5,0 KWh/m² (IDEAM, UPME 2005). La unidad experimental consistió en una caja de Petri con agar agua y un foliolo de tomate previamente desinfectado con una solución de hipoclorito de sodio al 3%, sobre el que se colocaron muestras de 0,1 g de los conidios formulados o sin formular. Las unidades experimentales se expusieron a la radiación solar durante seis horas, entre las 9:00 a.m. y las 3:00 p.m., retirando cada hora, una muestra por tratamiento a la cual se le determinó la germinación de los conidios, siguiendo la metodología descrita previamente.

Teniendo en cuenta que el valor de germinación en el tiempo cero para los conidios formulados y sin formular era diferente, los resultados se expresaron como reducción en la germinación con respecto a la germinación original (tiempo cero) de cada tratamiento y cada una de las seis horas de exposición a la radiación solar. El análisis estadístico se realizó con el programa SAS versión 9.1.3. La normalidad de los datos se determinó mediante la prueba de Shapiro – Wilk ($\alpha = 0,05$) y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene ($\alpha = 0,05$). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para cada uno de los tiempos (una, dos, tres, cuatro, cinco y seis horas) y una comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0,05$) para establecer diferencias significativas entre conidios formulados y no formulados.

Resultados y Discusión

Efecto de la radiación UVC. Los conidios de *Paecilomyces* sp. sin formular expuestos a la radiación monocromática UVC (254 nm), no presentaron una reducción significativa de su capacidad de germinación aún después de 24 horas de exposición ($P > 0,001$) (Fig. 1). Contrario a lo que ocurrió con los conidios sin formular de *B. bassiana*, los cuales redujeron significativamente su germinación después de las tres primeras horas de exposición ($P < 0,001$), presentando una germinación final del 42,7% a las 24 horas de exposición (Fig. 1).

La radiación UVC tiene menor longitud de onda que la tipo A y tipo B, por lo que posee mayor energía y causa un daño mayor que el originado por los otros dos tipos de radiación UV. Sin embargo, esta radiación no causó un efecto significativo sobre los conidios de *Paecilomyces* sp. (Pc013), sugiriendo que estos no son sensibles a la misma durante el tiempo de exposición evaluado. Este comportamiento podría atribuirse a que los conidios de *Paecilomyces* sp. posiblemente utilizan algún mecanismo de reparación del ADN como la escisión de nucleótidos, o la acción de la enzima fotoliasa, que en presencia de la luz visible, rompe los dímeros de pirimidina evitando el daño letal causado por la radiación. Esta enzima ha sido reportada en varios organismos procariotas y eucariotas (Britt 1996; Thoma 1999; Sinha *et al.* 2002). Un segundo mecanismo de protección empleado por algunos microorganismos, consiste en la acumulación de pigmentos de absorción, generalmente en la capa externa de la membrana (Riesenman y Nicholson

2000; Saxene *et al.* 2002). Macroscópicamente la colonia de la cepa de *Paecilomyces* sp. estudiada presenta una ligera coloración violeta, sugiriendo la presencia de un pigmento, el cual podría absorber la radiación con una longitud de onda de 254 nm protegiendo al microorganismo. Algunas cepas de microorganismos como *Bacillus thuringiensis*, poseen un pigmento de melanina que las hace significativamente más resistentes a la radiación UVC (Saxene *et al.* 2002). Así mismo, estudios realizados por Riesenman y Nicholson (2000) establecieron que algunas de las cepas esporuladas de *B. thuringiensis* más sensibles a la radiación UVB y UVA son resistentes a la radiación UVC.

Los conidios de *B. bassiana* muestran susceptibilidad a la radiación UVC, que aumentó directamente con el tiempo de exposición, lo que se evidenció por una reducción significativa de la germinación. La reducción de la germinación posiblemente se debió a que la longitud de onda empleada, interfirió con la replicación normal del ADN, superó los mecanismos de reparación de la célula y produjo mutaciones o la muerte celular dependiendo de la cantidad de energía recibida (Cerdá-Olmedo *et al.* 1996). Resultados similares fueron obtenidos por Moore *et al.* (1993) quienes observaron que algunos géneros de los hongos entomopatógenos *Metarhizium* sp., *Beauveria* sp. y *Nomuraea* sp. expuestos a radiación UVC redujeron su germinación conforme aumentó el tiempo de exposición a la misma, con un tiempo letal medio entre uno y cuatro horas de exposición. De igual forma, Devotto y Gerding (2003) establecieron que para los conidios de dos aislamientos de *M. anisopliae*, se redujo la germinación a menos del 5% después de 40 segundos de exposición a la radiación UVC. Al comparar estos resultados con los obtenidos aquí, se evidencia que la cepa de *B. bassiana* Bv056 soporta mayores tiempos de exposición a la luz UVC. Esto puede deberse a diferencias genéticas entre los aislamientos (Morley *et al.* 1996; Tobar *et al.* 1996), además de las diferencias metodológicas entre los estudios, ya que en el presente trabajo se expusieron conidios puros y secos a la radiación, en tanto que en el trabajo realizado por Devotto y Gerding (2003) se utilizó una suspensión de conidios, inoculada sobre la superficie de una caja Petri con agar (Devotto y Gerding 2003).

A partir de este trabajo se estableció que *B. bassiana* Bv056 fue sensible a la radiación UVC (254 nm), mientras que *Paecilomyces* sp. Pc013 toleró esta radiación. Sin embargo, la radiación UVC no es ecológicamente relevante debido a que es absorbida por el oxígeno y el ozono atmosféricos como se mencionó anteriormente, por lo tanto las longitudes de onda tipo UVA y tipo UVB son las que pueden producir efectos sobre la biota y las que deben ser consideradas con mayor atención (Mckenzie *et al.* 2003).

Radiación solar y conidios formulados y sin formular. Los conidios formulados y sin formular de *B. bassiana* (Bv056) y *Paecilomyces* sp. (Pc013) expuestos a la radiación solar disminuyeron su germinación conforme se incrementó el tiempo de exposición a la radiación solar, indicando que el efecto que ejerce este factor sobre la viabilidad de dichos microorganismos depende de la exposición a la misma (Tabla 1). En el caso de *B. bassiana* se observó que a partir de la primera hora de exposición a la radiación solar, la reducción en la germinación de los conidios formulados fue menor en comparación con la de los conidios no formulados. Durante la primera hora, los conidios no formulados presentaron una reducción de 24% en su germinación, mientras que para los conidios formulados, la

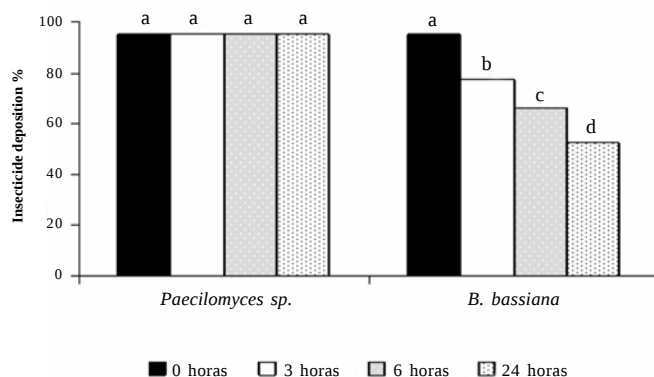


Figura 1. Porcentaje de germinación de los conidios de *B. bassiana* y *Paecilomyces* sp. expuestos a la radiación monocromática UVC 254nm por diferentes tiempos. Tratamientos con letras iguales no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$).

disminución fue de sólo el 12%. Durante la segunda hora de exposición, los conidios no formulados mostraron una reducción en la germinación del 40%, en comparación con 13% para los conidios formulados. Esta tendencia continuó en cada uno de los tiempos evaluados. Finalmente, después de seis horas de exposición, los conidios sin formular mostraron una reducción en la germinación de 46%, mientras que los conidios formulados sólo perdieron el 26,37% (Tabla 1).

En el caso de *Paecilomyces* sp. Pc013 se observó el comportamiento contrario, ya que durante todo el tiempo de exposición a la radiación solar, los conidios sin formular mostraron una menor reducción en la germinación o muy similar a la de los conidios formulados. Después de una hora de exposición a la luz solar, los conidios formulados redujeron su germinación en un 43% y los no formulados en un 35%. Después de seis horas de exposición, los conidios no formulados presentaron una reducción en su germinación del 43% en tanto que para los formulados se alcanzó una pérdida de la germinación de un 42% (Tabla 1).

Para *B. bassiana* se presentaron diferencias significativas entre la pérdida de germinación de los conidios formulados y no formulados en cada tiempo de exposición, siendo menor la reducción en la germinación de los conidios formulados ($P < 0.001$). Por el contrario, para *Paecilomyces* sp., no se detectaron diferencias entre los dos tratamientos. Este resultado sugiere que la formulación desarrollada para *B. bassiana* protegió eficientemente los conidios del hongo frente a la radiación solar, mientras que para *Paecilomyces* sp., el prototipo de formulación no ejerció ningún tipo de protección.

Los prototipos de formulación incluyen un filtro solar ampliamente utilizado en la industria farmacéutica, el cual consiste en una mezcla de dos sales azoicas, una de ellas con un máximo de absorción a los 308 nm y mínimos a los 270 nm y 348 nm y la otra con máximos de absorción a los 252 nm y 287 nm y mínimos a los 231 nm y 266 nm. Por lo tanto, el filtro solar empleado presenta una mejor absorción de longitudes de onda que pertenecen a la radiación UVC y UVB. Por tales razones, se puede deducir que los conidios formulados fueron protegidos de la radiación UVB del sol, pero el UVA que no fue absorbido, probablemente causó un efecto deletéreo en las células, debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (Friedberg *et al.* 1995). Por tal razón, se puede sugerir que los conidios de *Paecilomyces* sp. (Pc013) probablemente son más sensibles a la radiación UVA en comparación con los conidios de *B. bassiana* (Bv056) y por tanto, a pesar de ser la misma formulación no se preservó la viabilidad del microorganismo.

Tabla 1. Reducción porcentual en la germinación de los conidios de *B. bassiana* y *Paecilomyces* sp.

Tiempo exposición (horas)	Formulados*	No formulados*	Formulados	No formulados*
1	12,00 a	24,45 a	43,57 a	35,87 a
2	13,21 a	40,26 b	40,27 a	35,49 a
3	22,12 a	41,39 b	39,83 a	40,33 a
4	25,89 a	49,48 b	40,57 a	49,42 a
5	21,84 a	39,46 a	36,72 a	36,51 a
6	26,37 a	46,52 b	42,28 a	43,12 a

* Los números seguidos de la misma letra dentro de cada fila no presentan diferencias significativas (Tukey $\alpha = 0.05$).

Los filtros solares consisten en su mayoría en químicos orgánicos aromáticos que están conjugados con un grupo carbonilo, los cuales pueden absorber generalmente un tipo de radiación UVA ó UVB, de acuerdo con su estructura química, el solvente y el pH del medio en el que se encuentran (Serra 1994). Es conveniente al desarrollar una formulación incluir un filtro físico o pantalla solar que pueda bloquear los dos tipos de radiación UVA/UVB al reflejar y dispersar la luz, o una mezcla de dos filtros solares químicos que provean una mayor protección contra todo el rango de radiación solar (Serpone *et al.* 2007).

Los resultados mostraron que la reducción en la germinación de los conidios de *Paecilomyces* sp. fue mayor que la obtenida para *B. bassiana* (Tabla 1, Figura 1). Este resultado sugiere que los conidios de *Paecilomyces* sp. son más susceptibles a la radiación solar, lo que probablemente se deba a la pigmentación (mecanismo hipotético 1) ligeramente amarilla de los conidios de *B. bassiana* Bv056, en comparación con la coloración púrpura de los conidios de *Paecilomyces* sp. Un ejemplo de este mecanismo de protección fue reportado por Braga *et al.* (2006), quienes evaluaron la importancia de la pigmentación de cepas de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* como mecanismo de tolerancia frente a la radiación solar, comparando el nivel de inactivación y la cinética de germinación de conidios de una cepa silvestre (conidios de color verde oscuro) y tres mutantes que producían conidios de color blanco, amarillo y púrpura, respectivamente. Los resultados evidenciaron la importancia de la pigmentación como mecanismo de protección frente a la radiación UV, ya que los conidios blancos fueron los más sensibles, seguidos de los de color púrpura, los de color amarillo y finalmente, los más resistentes fueron los de color verde oscuro.

La mejor tolerancia de *Paecilomyces* sp. también podría estar relacionada con una posible mayor producción de enzimas que controlen el estrés oxidativo (mecanismo hipotético 2) generado por acción de la radiación UVA, tales como la superóxido dismutasa, la catalasa y glutatión reductasa, entre otras. La primera enzima, cataliza la reducción del anión superóxido, transformándolo en un producto menos reactivo (peróxido de hidrógeno) y la segunda, cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular, reduciendo sus efectos dañinos (Mulero 2004). La existencia de distintos genes que codifican para catalasas vegetativas y conidiales, ha sido demostrada en hongos filamentosos (Chary y Natvig 1989; Bussnink y Oliver 2001; Kawasaki y Aguirre 2001). En un trabajo realizado por Miller *et al.* (2004) se estableció que la exposición de los conidios de *M. anisopliae* a la radiación UVA y UVB, incrementó la intensidad de una de las bandas de glutatión reductasa en una de las cepas estudiadas, sugiriendo que esta enzima puede proveer protección contra la acción de la radiación. Sin embargo, estos mecanismos no han sido estudiados para *B. bassiana* y *Paecilomyces* sp.

A partir de este trabajo se puede concluir que la inactivación que la luz ultravioleta produce sobre los conidios de Pc013 y Bv056 depende del tipo de radiación, de la presencia de adyuvantes y del tiempo de exposición. La radiación UVC afectó a los conidios sin formular de Bv056, pero no a los de Pc013. La radiación solar inactivó los conidios sin formular de Bv056 y Pc013, confirmando este resultado la importancia de desarrollar una formulación en la cual se incluyan antioxidantes, filtros y pantallas solares, o la elaboración de encapsulados o prototipos oleosos, que protejan de la luz solar bajo condiciones de campo (Shah *et al.* 1998; Ragaei 1999).

Dentro del desarrollo de un producto, posterior a la formulación, se realiza una etapa de optimización en la cual se debe ajustar la composición con el fin de mejorar la eficacia, la estabilidad y la calidad del producto. Teniendo en cuenta los resultados, se hace necesario reemplazar el filtro utilizado en el prototipo a base de *Paecilomyces* sp. por un filtro o pantalla solar que provea a los conidios una adecuada protección en el rango de radiación de 280 a 400 nm, el cual debe ser compatible con el hongo y con los demás auxiliares de formulación.

Literatura citada

- AIKENS, J.; DIX, T. 1991. Peroxy radical (HOO.) initiated lipid peroxidation: the role of fatty acid hydroperoxides. *Journal of Biology and Chemistry* (266): 15091-15098.
- BRAGA, G.; FLINT, S.; MESSIAS, C.; ANDERSON, A.; ROBERTS, D. 2001. Variability in response to UV - B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61° N to 54° S. *Journal of Invertebrate Pathology* 78: 98-108.
- BRAGA, G.; RANGEL, D.; FLINT, S.; ANDERSON, A.; ROBERTS, D. 2006. Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology* (82): 418-422.
- BRITT, A. B.; 1996. DNA damage and repair in plants. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular* 47: 75-100.
- BUSSNINK, H. J.; OLIVER, R. 2001. Identification of two highly divergent catalase genes in the fungal tomato pathogen, *Cladosporium fulvum*. *European Journal of Biochemistry* 268: 15-24.
- CERDA-OLMEDO, E.; ROJAS, M.; CUBERO, B. 1996. Causes of cell death following ultraviolet B and C exposures and the role of carotenoids. *Photochemical Photobiology* 64: 547-551.
- CHARY, P.; NATVIG, D. 1989. Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock and development. *Journal of Bacteriology* 171: 2646-2652.
- CHOE, M.; JACKSON, C.; YU, B. 1995. Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. *Free Radical Biology Medical* 18: 977-984.
- DEVOTTO, L.; GERDING, M. 2003. Respuesta de dos aislamientos chilenos de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) sorokin a la adición de un protector solar. *Agricultura Técnica* 63: 339-346.
- DIFFEY, B. 1991. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Physics in Medicine and Biology* 36: 299-328.
- EYAL, J.; MABUD, M.; FISCHBEIN, K.; WALTER, J.; OSBORNE, L.; LANDA, Z. 1994. Assessment of *Beauveria bassiana* Nov. EO-1 strain, which produced a red pigment for microbial control. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 44: 65-80.
- FRIEDBERG, E. C.; WALKER, G. C.; SIEDE, W. 1995. DNA repair and mutagenesis. *American Society for Microbiology*. Washington, D. C. 698 p.
- GUTTERIDGE, J.; HALLIWELL, B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochemistry Science* 15: 129-135.
- HULLO, M.; MOSZER, I.; DANCHIN, A.; MARTIN, I. 2001. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper - dependent laccase. *Journal of Bacteriology* 183: 5426-5430.
- IDEAM; UPME 2005. Atlas de Radiación Solar de Colombia. Instituto de meteorología, hidrología y estudios ambientales; Unidad de planeación minero energética (eds.) Bogotá, Colombia 175 p.
- INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI. 1996 Diccionario Geográfico de Colombia. Colombia. 2.504 p.
- KAWASAKI, I.; AGUIRRE, J. 2001. Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* 183: 1434-1440.
- KIELBASSA, C.; EPE, B. 2000. DNA damage induced by ultraviolet and visible light and its wavelength dependence. *Methods in Enzymology* 319: 436-445.
- KRUTMANN, J. 2001. New developments in photoprotection of human skin. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* 14: 401-407.
- LÓPEZ, A. 1994. Avance y perspectivas del control biológico de las moscas blancas. En: *Memorias del seminario manejo integrado de mosca blanca y técnicas de aplicación de pesticidas*. SOCOLEN. Bogotá, pp. 42-53.
- LÓPEZ, A.; GARCÍA, J. 2000. Manejo integrado sostenible de moscas blancas como plagas y vectores de virus en los trópicos. 1. Reconocimiento, diagnóstico y caracterización de moscas blancas como plagas en el trópico alto de América Latina. Informe final. Convenio DANIDA-CORPOICA. CIAT. 43 p.
- MCKENZIE, R.; BJÖRN, L.; BAIS, A.; ILYAS, M. 2003. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the earth's surface. *Photochemical Photobiology Science* 2: 5-15.
- MILLER, CH; RANCEL, D.; BRAGA, G.; FLINT, S.; KWON, S.; MESSIAS, C.; ROBERTS, D.; ANDERSON, A. 2004. Enzyme activities associated with oxidative stress in *Metarhizium anisopliae* during germination, mycelial growth, and conidiation and in response to near-UV irradiation. *Journal of Microbiology* 50: 41-49.
- MOORE, D.; BRIDGE, P. D.; HIGGINS, P.; BATEMAN, R.; PRIOR, C. 1993. Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. *Annals of Applied Biology* 122: 605-616.
- MOORE, D.; HIGGINS, P. M.; LOMER, C. J. 1996. Effects of simulated and natural sunlight on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviride* Gams and rozsygal and interactions with temperature. *Biocontrol Science and Technology* 6: 63-76.
- MORLEY, D.; MOORE, D.; PRIOR, C. 1996. Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. spores with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. *Mycological Research* 100: 31-38.
- MULERO, M. 2004. Efecto de la radiación ultravioleta (RUV) sobre los procesos de estrés oxidativo e inmunosupresión cutánea. Efecto protector de los filtros solares. Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Rovira I Virgili. 174 p.
- NICHOLSON, W.; SCHUERGER A.; SETLOW P. 2005. The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for earth - to Mars transport by natural processes and human spaceflight. *Mutation Research* 571: 249-264.
- RAGAEI, M. 1999. Radiation protection of microbial pesticides. *Journal of Applied Entomology* 123: 381-384.
- RIBERA, P.; PARADELO, C. 1997. El sol y la piel: Fotoprotección y filtros solares. *Medicina Integral* 30 (2): 64-71.
- RIESENMAN, P.; NICHOLSON W. 2000. Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UVC, UVB and solar UV radiation. *Applied Environment Microbiology* 66: 620-626.
- SAXENE, D.; BEN-DOV, E.; MANSHEROB, R.; BARAK, Z.; BOUSSIBA, S.; ZARITSKY, A. 2002. A UV tolerant mutant of *Bacillus thuringiensis* spp. *Kurstaki* producing melanin. *Microbiology* 44: 25-32.
- SERPONE, N.; DONDI, D.; ALBINI, A. 2007. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and sun care products. *Inorganica Chimica Acta* 360: 794-802.
- SERRA, N. 1994. Fotoprotectores y bronceadores. *Actualidad Dermatológica* 33: 447-458.
- SETLOW, P. 1988. Resistance of bacterial spores to ultraviolet light. *Comments Molecular Cell Biology Biophysics* 5: 253-264.
- SHAH, P. A.; DOURO-KPINDOU, O. K.; SIDIBE, A.; DAFIE, C. O.; PAUW, H.; LOMER, C. J. 1998. Effects of the sunscreen oxybenzone on field efficacy and persistence of *Metarhizium flavoviride* conidia against *Kraussella amabile* (Orthoptera:

- Acrididae) in Mali, West Africa. *Biocontrol Science Technology* 8: 357-364.
- SMITS, N.; SINOQUET H. 2004. Fungal bioinsecticide survival in response to UVB in 3D digitized grapevine canopies: a simulation study, pp. 187-189. En: Godin, C. (ed). 4th International workshop on functional-structural plant models. 7-11 june 2004. Montpellier. France. 201 p.
- THOMA, F. 1999. Light and dark in chromatin repair: repair of UV - induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair. *EMBO Journal* 18: 6585-6598.
- TOBAR, S.; VÉLEZ, P.; MONTOYA, E. 1996. Selección de aislamientos patogénicos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* por resistencia a la luz ultravioleta. Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología (SOCOLEN). Cartagena - Colombia. 17 - 19 de julio de 1996, p. 76.
- VILLAMIZAR, L.; COTES, A.; GÓMEZ, M. 1997. Producción masiva y preformulación de *Metarhizium* spp. (Metschnikov) para el control biológico de la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides* (Rhen). *Revista Colombiana de Entomología* 23 (3-4): 119-124.
- YOUNG, A.; POTTE, C.; NIKAIDO, O.; PARSONS, P.; BOENDERS, J.; RAMSDEN, J. 1998. Human melanocytes and keratinocytes exposed to UVB or UVA in vivo show comparable levels of thymine dimers. *Journal Investigation Dermatology* 111: 936-940.

Recibido: 29-ene-2007 • Aceptado: 14-dic-2008