

PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DEL AISLADO DE LA CEPA NATIVA DE *Isaria* spp. Y DOS HONGOS ENTOMOPATOGENOS COMERCIALES¹

José A Lezcano B² ; Edwilcar Saldaña³; Ronal Ruíz³; Sindy Caballero⁴

RESUMEN

Los hongos entomopatógenos han demostrado ser una alternativa promisoriosa para el control de la broca del café. En este estudio se evaluó la patogenicidad y virulencia de un aislado de la cepa nativa de *Isaria* spp., y dos aislados de cepas comerciales de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, sobre adultos de broca del café. Los bioensayos de dosis-mortalidad se realizaron con suspensiones de esporas ($1,92 \times 10^8$ a $1,12 \times 10^{10}$ UFC.ml⁻¹). Se evaluó la mortalidad de adultos de *Hypothenemus hampei* y se calculó la concentración letal media (CL₅₀) para el aislado de *Isaria* spp. A los siete días, la mortalidad de adultos de la broca estuvo entre 80,5% y 100% en los rangos de concentración de $4,48 \times 10^9$ a $1,12 \times 10^{10}$ UFC.ml⁻¹. La muerte de la broca se presentó entre 1,91 y 6,5 días, en concentraciones de $2,22 \times 10^8$ a $3,64 \times 10^9$ UFC.ml⁻¹. La CL₅₀ de *Isaria* fue de $0,11 \times 10^9$ UFC.ml⁻¹. Los aislados de las cepas comerciales de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, mostraron una baja mortalidad de brocas. El aislado de la cepa nativa de *Isaria* demostró ser patogénica y altamente virulenta sobre la broca del café bajo condiciones de laboratorio.

PALABRAS CLAVE: Control biológico, bioensayo, *Hypothenemus hampei*, broca del café.

¹Recepción: 1 de enero de 2015. Aceptación: 17 de abril de 2015. Este trabajo pertenece al proyecto para el Manejo Integrado del Cultivo de Café (501.F.2.9), con el financiamiento Nacional.

²M.Sc. en Parasitología. IDIAP. Centro de Investigación Agropecuaria Occidental (CIAOc).
e-mail: jlezcano@idiap.gob.pa

³Ing. Agr. Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA). Universidad de Panamá.

⁴Agr. IDIAP. Centro de Investigación Agropecuaria Occidental (CIAOc).

PATHOGENICITY AND VIRULENCE OF THE NATIVE ISOLATED STRAIN OF *Isaria* spp. AND TWO ENTOMOPATHOGENIC COMMERCIAL OF FUNGI

ABSTRACT

Entomopathogenic fungi have been shown to be a promising alternative to control the coffee berry borer. This study evaluated the pathogenicity and virulence of an isolate native strain was evaluated *Isaria* spp., And two isolates of commercial strains of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on CBB adults. The dose-mortality bioassays were performed with spore suspensions ($1,92 \times 10^8$ to $1,12 \times 10^{10}$ CFU.ml⁻¹). Adult mortality of *Hypothenemus hampei* was evaluated and the medial lethal concentration (LC₅₀) was calculated for the isolate *Isaria* spp. After seven days, adult mortality of the coffee berry was between 80,5 and 100%. For the concentration ranges of $4,48 \times 10^9$ to $1,12 \times 10^{10}$ CFU.ml⁻¹. The death of the coffee berry borer ranged from 1,91 to 6,5 days, for concentrations of $2,22 \times 10^8$ to $3,64 \times 10^9$ CFU.ml⁻¹. The LC₅₀ of *Isaria* was $0,11 \times 10^9$ CFU.ml⁻¹. Isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae* commercial strains, showed low mortality. The isolated native strain *Isaria* proved pathogenicity on CBB and virulencet the coffee berry borer under laboratory conditions.

KEY WORDS: Biological control, bioassay, *Hypothenemus hampei*, coffee berry borer.

INTRODUCCIÓN

En Panamá la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferrari, se ha convertido junto con *Hemileia vastatrix*, en las principales plagas de la caficultura, debido a los graves daños que causa en los frutos, disminuyendo el rendimiento y calidad del grano, ocasionando una reducción en el volumen de café para exportar y un aumento en el costo de producción, causando pérdidas económicas al caficultor, debido a la inversión que se debe realizar en las labores de control de estas plagas.

En muchos de los Centros de investigación del mundo se han dedicado esfuerzos relacionados a estudios sobre la biología y patogenicidad de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, los cuales han mostrado gran potencial para el control de insectos plaga en cultivos de importancia económica (Delgado *et al.* 2001).

Estudios realizados por Castellanos 1997, Patersen *et al.* 1994, Smith *et al.* 1981, St. Leger *et al.* 1986, Zimmermann 1993, González *et al.* 2001,

coinciden sobre entomopatógenos que atacan al insecto a través de la cutícula, donde germinan las esporas, produciendo hifas invasoras que penetran los tejidos del hospedante. Las hifas se ramifican, colonizan y llegan hasta la cavidad hemocélica, donde se produce una masa micelial, debido al crecimiento del hongo y se liberan toxinas que están implicadas en el proceso de bloquear el desarrollo fisiológico del insecto.

Existe una posible relación entre la actividad enzimática de estos hongos y su patogenicidad al insecto sobre el cual se dirige el control. Estudios ultraestructurales e histoquímicos sugieren que en el proceso infectivo del hongo hacia el insecto existe degradación de la cutícula donde se encuentran implicadas varias enzimas (fenoloxidasa, proteasa, lipasa, quitinasa y N-acetilglucosaminidasa o nagasa). Algunas partes de la cutícula del insecto son más susceptibles al ataque enzimático producido por los entomopatógenos, siendo importante, no sólo por su actividad catalítica del complejo enzimático producido sino por el sitio específico de la acción de las enzimas sobre la cutícula (Castellanos 1997, Patersen *et al.* 1994).

El integumento de los insectos, según Andersen 1979, formado por la epidermis y la cutícula, tiene gran

importancia en relación con su defensa y protección, al crear barreras contra la desecación y enfermedades. Además de proteínas y quitina, contiene otros compuestos menores como precursores fenólicos de quinonas, ácidos grasos, esterres de alcaloides y alcoholes grasos. El estudio es importante para entender los mecanismos de virulencia de los distintos hongos entomopatógenos (Willis 1987, Khachatourians 1991). La composición del integumento de los insectos se ha explorado como fuente de nutrición de algunos hongos (Smith y Gula 1981), por ejemplo *Isaria* spp. puede germinar, penetrar la cutícula e invadir el hemocelo de muchos insectos, lo que sugiere que las condiciones necesarias para estos procesos están presentes en los insectos susceptibles (Ferrón 1981, Khachatourians 1991).

La producción a escala y la obtención de una formulación eficaz de hongos entomopatógenos como *B. bassiana*, *M. anisopliae* o *Isaria* spp. como agentes de control biológico, requiere profundizar en el conocimiento de aspectos genéticos, bioquímicos, fisiológicos, factores de virulencia y estudios ecoambientales donde los entomopatógenos ejercen su espectro de acción (Delgado *et al.* 2001).

Estudios realizados por Delgado *et al.* (2001) se evaluaron aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* para cuantificar la actividad catalítica de cinco enzimas y determinar su relación con la patogenicidad sobre la broca del café. Castellanos (1997) y Smith *et al.* (1981) señalan que es necesario cuantificar la actividad catalítica de las enzimas producidas por *B. bassiana*, *M. anisopliae* o *Isaria* spp. patogénicos a *H. hampei* y relacionarla con la patogenicidad como uno de los parámetros a evaluar dentro de los mecanismos de infección de *Isaria* spp., *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre insectos plaga.

Para el control de *H. hampei* dentro de un esquema de manejo integrado se ha recomendado el uso de *B. bassiana* (Bustillo *et al.* 1998), el cual se ha convertido en un importante factor de mortalidad en los cafetales (Ruíz 1996). En Panamá, a partir del 2011, aparece un aislamiento efectivo contra la broca del café, lo que representa una alternativa biológica y disponible para los caficultores (Lezcano 2014).

El control biológico de insectos plaga mediante hongos entomopatógenos ofrece un método alternativo para el control de las poblaciones de *H. hampei* en los sistemas agroforestales del café, siendo una estrategia integrada

satisfactoriamente en los programas de manejo integrados de la broca del café (Ruíz *et al.* 2013, Kim *et al.* 2008).

Los hongos entomopatógenos, *Isaria farinosa* y *Isaria fumosorosea* (Wise) Brown y Smith (Hypocreales: Clavicipitaceae) eran conocidos como *Paecilomyces farinosus* y *Paecilomyces fumosoroseus*, durante más de 30 años (Zimmermann 2008). Ambos hongos tienen una distribución mundial y una relativa amplia gama de huéspedes, mientras que *I. farinosa* es de menor importancia en la investigación y como agente de biocontrol, *I. fumosorosea* es considerado como un complejo de especies, y varias cepas se utilizan con éxito para el biocontrol de algunas plagas de insectos, principalmente moscas blancas, de los cuales se han publicado numerosos artículos científicos en ambas especies de hongos, durante los últimos 40 años, que cubren diversas áreas de investigación.

Dentro de las especies de hongos entomopatógenos más virulentas, Ruíz *et al.* (2013) mencionan a *I. fumosorosea*, considerada una de las especies más promisorias para el control biológico de *Bemisia tabaci* y otros insectos plaga.

Entre los ácaros e insectos plaga sobre los cuales se ha desarrollado

exitosamente un control biológico utilizando *I. fumosorosea* están *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) (Ali *et al.* 2010), *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) (Avery *et al.* 2004), *Tetranychus urticae* (Acari:Tetranychidae) (Kim *et al.* 2008) y *B. tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) (Cabanillas y Jones 2009).

En este estudio se propuso como objetivo determinar la patogenicidad y virulencia del aislado de la cepa nativa de *Isaria* spp. y dos cepas comerciales de hongos entomopatógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en los laboratorios de biocontroladores ubicado en Río Sereno, distrito de Renacimiento con las coordenadas de latitud norte 08°49'21,5" y longitud oeste 082°50'45,4" y en el laboratorio de parasitología del IDIAP, en el distrito de Boquete con las coordenada de latitud Norte 8°43'14,5" y longitud Oeste 82°26'18", de la provincia de Chiriquí. El experimento se realizó en el periodo comprendido de 4 de febrero de 2011 al 25 de septiembre de 2014.

Aislamientos y medio de cultivo:

Se utilizaron aislamientos de la cepa nativa de *Isaria* spp. (antes *Paecilomyces* spp.), proveniente de la colección de cepas nativas del laboratorio

de biocontroladores del IDIAP, ubicado en Río Sereno, Renacimiento, provincia de Chiriquí y cepas comerciales de *B. bassiana* y *M. anisopliae* provenientes de un laboratorio ubicado en el distrito de Boquete. Los aislamientos de las cepas comerciales de *B. bassiana* y *M. anisopliae* y el aislamiento de la cepa nativa de *Isaria* spp. se reactivaron sobre adultos de broca del café y se colocaron en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) (Vélez *et al.* 1997). Se deben hacer pases sobre el insecto cada veinte días para mantener la patogenicidad del hongo (González *et al.* 1993). El medio con los adultos inoculados y con los aislamientos, se incubaron a temperatura ambiente. Finalmente, cuando el hongo alcanzó su máximo crecimiento y esporulación en el medio, se inició la producción masiva, a partir de este aislamiento (Figura 1).



Figura 1. Adultos de broca del café, con el hongo *Isaria* spp. esporulada en medio PDA. Boquete, 2012.

Producción de *Isaria* spp.:

Una vez activado el hongo en medio PDA, se procedió a preparar una suspensión de conidias y micelio del hongo para la producción masiva, utilizando como sustrato arroz entero.

El procedimiento que se utilizó fue el siguiente: Se inició con 2,27 kg de arroz, que se lavó con agua hasta eliminarle la semolina, se esterilizó con hipoclorito de sodio comercial (6,15%) al 0,5% por 30 min, y se lavó con agua limpia, para remover el exceso de hipoclorito de sodio. Para escurrirlo, se colocó sobre una malla en bastidor, entre 30 min a 60 min. Una vez

escurrido, se tomaron 200 g de arroz y se colocaron en un envase de polipropileno de 500 cc con tapa, en cuyo centro se perforó un orificio y se cerró con algodón.

El sustrato de arroz se esterilizó en autoclave por 15 min, a 121°C y 101325 Pa de presión. Transcurrido este proceso, se inoculó con 20 cc por envase de la suspensión del hongo previamente preparado, girando el envase para distribuir lo más uniforme la suspensión sobre el arroz. El sustrato inoculado fue colocado en un cuarto de incubación por 20 días (Figura 2).



Figura 2. Pasos en la producción de hongos sobre sustrato de arroz: Dilución del medio que contiene el hongo esporulado (a); inoculación del sustrato (b); incubación del sustrato inoculado (c); sustrato después de los 20 días de incubación (d).

Concentración de esporas:

La cuantificación de la concentración de esporas permitió determinar el número de unidades infectivas por unidad de peso o volumen existente en la suspensión madre o diluciones y sirvió de base para establecer la dosificación de un producto (Vélez *et al.* 1997).

Se prepararon suspensiones madre de *Isaria* spp., *B. bassiana* y *M. anisopliae* en 500 ml de agua destilada estéril y Tween 80 al 0,1%. Se realizaron diluciones seriadas, se tomaron cuatro submuestras de 1 ml y se depositaron en tubos de 9 ml de agua destilada estéril (ADE), quedando preparada una dilución 10^{-1} ; se repitió este procedimiento llevando 1 ml de esta solución (10^{-1}) a tubos con 9 ml de ADE para obtener una dilución de 10^{-2} , y así sucesivamente hasta obtener una dilución de 10^{-4} , o la dilución que permitiera el conteo para estimar el número de esporas por mililitro de la suspensión.

Para el recuento de esporas o conidias se utilizó la cámara de Neubauer o Hematócmetro. La concentración se estimó: $C = N \times \text{Dilución empleada} \times \text{Factor de cámara}$ (10^4), donde N es el número promedio de esporas por cuadrante.

Bioensayos de patogenicidad:

La prueba de patogenicidad se diseñó para proporcionar condiciones ideales en el momento de la exposición al patógeno, para que ocurra la germinación e invasión del hospedante y la conidiogénesis (desarrollo de las conidias), para favorecer la esporulación del hongo sobre el insecto muerto y poder confirmar que la mortalidad se debió al tratamiento con el hongo (Vélez *et al.* 1997).

Para esta prueba se utilizó la metodología propuesta por Vélez *et al.* (1997); González *et al.* (1993), que consistió en la selección de adultos de la broca del café de menos de ocho días de edad provenientes de una cría libre de patógenos. Se desinfectaron previamente con una solución de hipoclorito de sodio comercial (6,15%) al 0,5% durante un minuto y se lavaron en ADE usando mallas de tul esterilizadas, que sirvieron de colador. De estas brocas se prefirieron las que mostraron mayor actividad.

Se realizó una prueba de patogenicidad con los aislamientos de las cepas de los tres entomopatógenos, se prepararon suspensiones madres, de concentración $1,41 \times 10^9$ UFC.ml⁻¹ (*M. anisopliae*), $9,58 \times 10^8$ UFC.ml⁻¹ (*B. bassiana*) y $1,12 \times 10^{10}$ UFC.ml⁻¹

(*Isaria* spp.). De estas suspensiones se prepararon las diluciones (Cuadro 1). Para la evaluación de cada hongo se tomaron 20 brocas al azar por tratamiento y tres repeticiones, donde la unidad

experimental fue la caja de Petrí. En cada evaluación se utilizó un testigo compuesto de adultos de broca que no entraron en contacto con los hongos.

CUADRO 1. TRATAMIENTOS UTILIZADOS EN LA PRUEBA DE PATOGENICIDAD DE *Isaria* spp., *B. bassiana* y *M. anisopliae*. BOQUETE.

Tratamientos	% de dilución	Concentración UFC.ml ⁻¹		
		<i>M. anisopliae</i>	<i>B. bassiana</i>	<i>Isaria</i> spp.
1	100	1,41E+09	9,58E+08	1,12E+10
2	80	1,13E+09	7,66E+08	8,96E+09
3	60	8,46E+08	5,75E+08	6,72E+09
4	40	5,64E+08	3,83E+08	4,48E+09
5	20	2,82E+08	1,92E+08	2,24E+09

A la cepa de *Isaria* spp., se le realizaron dos pruebas de patogenicidad, en la primera, se preparó una suspensión de $3,64 \times 10^9$ UFC.ml⁻¹, de la cual se realizaron diluciones con las siguientes concentraciones: $2,93 \times 10^9$, $2,0 \times 10^9$,

$1,30 \times 10^9$ UFC.ml⁻¹. En la segunda prueba de patogenicidad la suspensión presentó una concentración de $5,51 \times 10^9$ UFC.ml⁻¹, de la cual se realizaron diluciones de $1,87 \times 10^9$, $2,85 \times 10^9$, $3,81 \times 10^9$, $5,34 \times 10^9$ UFC.ml⁻¹ (Cuadro 2).

CUADRO 2. CONCENTRACIONES EVALUADAS EN LA PRUEBA DE PATOGENICIDAD DE *Isaria* spp. SOBRE LA BROCA DEL CAFÉ, 2011-2013.

No.	Concentración (UFC.ml ⁻¹)
1	$1,30 \times 10^9$
2	$1,87 \times 10^9$
3	$2,00 \times 10^9$
4	$2,85 \times 10^9$
5	$2,93 \times 10^9$
6	$3,64 \times 10^9$
7	$3,81 \times 10^9$
8	$5,34 \times 10^9$

Se utilizó la técnica de inmersión de las brocas en la dilución del hongo durante 30 segundos, la cual se mantiene en agitación manual. Luego, se colocaron las brocas tratadas en plato de Petri que contenían un disco de papel toalla previamente humedecido con ADE y antibiótico. Cumplidas las 24 horas se adicionó como sustrato a cada plato, granos de café en pergamino seco (45% de humedad), es decir, sin ningún proceso de secado mecánico.

Diariamente y durante 10 días se evaluó la mortalidad causada por el hongo en estudio, se observaron al estereoscopio los síntomas y signos de enfermedad en las brocas.

Las brocas vivas o muertas se debieron mantener confinadas en los platos de Petri, para evitar que se interrumpiera el desarrollo normal del hongo en el insecto. Con una jeringa desechable diariamente se adicionó ADE, hasta humedecer el disco de papel evitando la presencia de agua libre. La humedad puede ser considerada como el factor más importante en el desarrollo de una micosis en las etapas de germinación de las esporas y conidio génesis.

Se registró diariamente la mortalidad para cada aislamiento de los hongos estudiados, y para el caso

del hongo *Isaria* spp. se estableció el ciclo del hongo sobre la broca. Se estimó el porcentaje de mortalidad y el promedio del tiempo de mortalidad, lo que se constituyeron en otros criterios de importancia en la calidad biológica de los hongos en estudio. El tiempo de evaluación varió para cada hongo entomopatógeno estudiado, dependiendo del ciclo biológico del hongo en el insecto y de la sobrevivencia del insecto sin tratar bajo condiciones del ensayo. Los productos comerciales deben causar una mortalidad superior al 80% en esta prueba.

Variables evaluadas: Mortalidad, número de días a la mortalidad, crecimiento micelial, esporulación, CL_{50} y sus Límites de Confianza al 95%, CL_{95} .

Análisis estadístico:

Los datos de mortalidad debido al hongo (patogenicidad) se transformaron con raíz cuadrada de $X+0,5$ y se sometieron a un análisis de varianza y las medias a la prueba de rangos de Tukey ($P=0,05$).

Los datos de mortalidad de las ocho concentraciones de esporas de *Isaria* se sometieron a un análisis Probit, (Camacho 1990), se obtuvo la CL_{50} y su límite de confianza al 95%; y la CL_{95} .

Los datos de los tres bioensayos de la prueba de patogenicidad, se sometieron a la prueba de Chi cuadrado (X^2) para obtener la bondad de ajuste con los valores obtenidos, se estimó el coeficiente de determinación (r^2), y la probabilidad de ocurrencia del evento, a través de una regresión lineal, obteniendo la ecuación de predicción de la forma $y = a + bx$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número de adultos muertos después de la aplicación de las concentraciones, con cubrimiento de micelio y esporulado, indican que hubo diferencias altamente significativas ($P < 0,01$) entre las concentraciones para esta variables (Cuadro 3).

CUADRO 3. CUADRADO MEDIO DE DÍAS A MUERTE, CUBRIMIENTO DE MICELIO Y ESPORULACIÓN; NÚMERO DE ADULTOS MUERTOS, CON CUBRIMIENTO DE MICELIO Y ESPORULACIÓN, BOQUETE.

F de V	gl	Días			Número de adultos		
		Muerte	Cubrimiento	Esporulación	Muertos	Cubrimiento de micelio	Esporulación
Error	30	0,4093	1,1677	4,0388	3,1333	6,0722	1,9777
Conc.	14	3,2538**	6,6097**	25,4388**	58,6285**	41,3388**	52,088**
R ²		0,7876	0,7253	0,7461	0,8972	0,7605	0,9247
CV (%)		13,58	26,92	47,34	13,01	28,46	30,42

*,**=Se refiere a diferencias estadísticas al 1% y 5%, respectivamente.

Al adulto de *H. hampei*, se ha descrito como susceptible a concentraciones superiores de $1,0 \times 10^9$ UFC.ml⁻¹ de *B. bassiana* (Bustillo *et al.* 1998). En este estudio, los días a esporulación del hongo sobre el cuerpo de la broca del café en el aislado de *Isaria*

spp. se presentó un rango entre 2,5 y 2,8 días; mientras que las concentraciones de *B. bassiana*, se mostraron en un rango entre 5,0 y 5,3 días. Para *M. anisopliae*, el rango fue amplio de 1,7 a 8,7 días (Cuadro 4).

CUADRO 4. MEDIAS DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE CONCENTRACIONES DE *Isaria* spp., *M. anisopliae* Y *B. bassiana* SOBRE ADULTOS DE *H. hampei* EN DÍAS A MUERTE, A CUBRIMIENTO DE MICELIO Y A ESPORULACIÓN, BOQUETE.

Aislamiento	Concentración UFC.ml ⁻¹	Días		
		Muerte	Cubrimiento de micelio	Esporulación
<i>Isaria</i> spp.	2,24X10 ⁹	6,5	2,2	2,7
<i>Isaria</i> spp.	8,96X10 ⁹	6,0	2,5	2,5
<i>Isaria</i> spp.	6,72X10 ⁹	6,0	2,2	2,5
<i>B. bassiana</i>	9,58X10 ⁸	5,7	3,8	8,0
<i>Isaria</i> spp.	4,48X10 ⁹	5,5	2,2	2,5
<i>B. bassiana</i>	7,66X10 ⁸	5,1	5,5	5,3
<i>Isaria</i> spp.	1,12X10 ¹⁰	5,0	2,2	2,8
<i>B. bassiana</i>	3,83X10 ⁸	4,5	6,4	5,8
<i>B. bassiana</i>	1,92X10 ⁸	4,3	5,5	0,0
<i>M. anisopliae</i>	1,13X10 ⁹	3,9	5,1	6,5
<i>B. bassiana</i>	5,75X10 ⁸	3,9	5,5	0,0
<i>M. anisopliae</i>	8,46X10 ⁸	3,7	4,1	8,0
<i>M. anisopliae</i>	1,41X10 ⁹	3,5	4,9	6,7
<i>M. anisopliae</i>	2,82X10 ⁸	3,5	3,7	8,7
<i>M. anisopliae</i>	5,64X10 ⁸	3,4	4,3	1,7

La muerte de *H. hampei*, utilizando hongo entomopatógenos se dió entre 3,4 y 6,5 días, se presentó en el aislado de *Isaria* un rango de 5,0 a 6,5 días, a pesar de estos resultados, las concentraciones de este hongo mostraron un rango bajo de cubrimiento del micelio de 2,2 días (Cuadro 5).

Los valores del número de adultos de broca muertos, con crecimiento de micelio y esporulados, que se presentan en el Cuadro 5, indican alta virulencia

del aislado de *Isaria*, el cual presentó el mayor valor de adultos muertos de 8 a 11 adultos, estos valores se observan en la columna de adultos esporulados. También, *M. anisopliae* presentó de 2 a 4 adultos muertos con la presencia del hongo esporulado, seguido de *B. bassiana*, 1 a 2 adultos. Bustillo 2006, indica que el hongo pierde gran parte de su virulencia cuando pasa de tres generaciones en medios artificiales, por lo cual es necesario reactivarlo mediante inoculaciones en brocas.

CUADRO 5. MEDIA DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE CONCENTRACIONES DE *Isaria* spp. *M. anisopliae* Y *B. bassiana* SOBRE ADULTOS DE *H. hampei* PARA EL NÚMERO DE ADULTOS MUERTOS, CON CUBRIMIENTO DE MICELIO Y ESPORULACIÓN. BOQUETE.

Aislamiento	Concentración UFC.ml ⁻¹	Número de adultos		
		Muertos	Cubrimiento de micelio	Esporulación
<i>Isaria</i> spp.	2,24X10 ⁹	12	11	11
<i>Isaria</i> spp.	8,96X10 ⁹	10	10	10
<i>Isaria</i> spp.	6,72X10 ⁹	11	10	10
<i>B. bassiana</i>	9,58X10 ⁸	13	6	2
<i>Isaria</i> spp.	4,48X10 ⁹	11	10	10
<i>B. bassiana</i>	7,66X10 ⁸	11	4	1
<i>Isaria</i> spp.	1,12X10 ¹⁰	8	8	8
<i>B. bassiana</i>	3,83X10 ⁸	10	4	1
<i>B. bassiana</i>	1,92X10 ⁸	12	2	0
<i>M. anisopliae</i>	1,13X10 ⁹	19	10	4
<i>B. bassiana</i>	5,75X10 ⁸	8	4	0
<i>M. anisopliae</i>	8,46X10 ⁸	20	13	2
<i>M. anisopliae</i>	1,41X10 ⁹	19	10	3
<i>M. anisopliae</i>	2,82X10 ⁸	19	12	4
<i>M. anisopliae</i>	5,64X10 ⁸	20	15	2

En otra prueba de patogenicidad dirigida al aislado de *Isaria* spp. (Cuadro 6), se encontraron variaciones con respecto a la prueba anterior. En esta oportunidad, se ensayó con algunas concentraciones entre 1,3 x10⁹ y 3,64 x10⁹ UFC.ml⁻¹. Los días a muerte de la broca se mostraron entre 1,91 y 2,39 y los días a esporulación entre 5,19 y 5,82. La patogenicidad se presentó entre 84%, 74% y 91,09%, con un promedio de 87,51%.

En Panamá este es primer informe de mortalidad de broca por *Isaria* spp.; es otros insectos plaga, Scorsetti *et al.* 2008, informó la presencia de *Isaria* infectando especies de *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*.

La última prueba de patogenicidad al aislado de *Isaria* spp. se realizó en el 2013 (Cuadro 7), se encontró una suspensión madre que contenía 5,51x10⁹ UFC.ml⁻¹, a esta concentración se encontró un 100% de patogenicidad sobre la

CUADRO 6. MEDIA DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE CONCENTRACIONES DE *Isaria* spp., SOBRE ADULTO DE LA BROCA DEL FRUTO DEL CAFÉ, EN LA PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA. BOQUETE, MAYO-ABRIL, 2011.

Concentración (UFC.ml ⁻¹)	Días					
	Muerte	Micelio			Esporas	
		Crecimiento	Cubrimiento	Formación	Esporulación	Patogenicidad (%)
1,3 x 10 ⁹	2,39	2,33	3,34	4,16	5,31	85,55
2,0 x 10 ⁹	2,22	2,39	3,21	3,97	5,19	91,09
2,9 x 10 ⁹	2,19	2,10	3,58	4,27	5,39	88,69
3,64 x 10 ⁹	1,91	2,59	3,78	4,11	5,82	84,74
Promedio						87,51

población de broca tratada. Las diluciones de esta suspensión, se presentaron en concentraciones entre 1,87x10⁹ y 5,34x10⁹ UFC.ml⁻¹, con una patogenicidad que estuvo entre 84,91% y 98,14%.

Estos resultados confirman la patogenicidad de *Isaria* spp. bajo condiciones de laboratorio sobre *H. hampei*; mientras que los resultados obtenidos utilizando dos cepas comerciales, se pueden explicar por un excesivo número de generaciones

producidas en medios artificiales utilizados por el laboratorio comercial, que da como resultado una disminución significativa en la virulencia del hongo.

La concentración letal media (CL₅₀) del aislado de *Isaria* spp. se considera que los valores son significativamente diferentes cuando no se traslapan los intervalos de confianza (Cabanillas y Jones 2009). El aislado de *Isaria* spp. es de mayor patogenicidad al obtener una CL₅₀ menor con 0,11x10⁹ UFC.ml⁻¹ (Cuadro 8).

CUADRO 7. MEDIA DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE CONCENTRACIONES DE *Isaria* spp., SOBRE ADULTO DE LA BROCA DEL FRUTO DEL CAFÉ, EN LA PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA. BOQUETE, SEPTIEMBRE, 2013.

Dilución (%)	Concentración (UFC.ml ⁻¹)	Patogenicidad (%)
0	5,51 x 10 ⁹	100,00 a
80	5,34 x 10 ⁹	98,14 a
60	3,81 x 10 ⁹	95,00 ab
40	2,85 x 10 ⁹	92,96 ab
20	1,87 x 10 ⁹	84,91 b
CV (%) = 5,29	r ² = 0,6320	

CUADRO 8. VALOR DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL₅₀), SUS LÍMITES DE CONFIANZA AL 95% Y CL₉₅ DEL AISLADO DE *Isaria* spp. SOBRE *H. hampei*. BOQUETE, 2014.

Aislamiento	Límites Fiduciales al 95%				
	CL ₅₀	Inferior	Superior	CL ₉₅	
<i>Isaria</i> spp.	0,11 X 10 ⁹	(0,000020	--	0,413)	5,94 X 10 ⁹

Las pruebas de patogenicidad realizadas al aislado de *Isaria* spp., se ajustaron al obtener una X² calculada menor que la tabulada, lo que indicó

que los datos se ajustaron (Cuadro 9). Presentando una ecuación de predicción cuya forma es $y = 5,89 + 0,9669x$

CUADRO 9. VALOR DE CHI CUADRADA, COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN Y LA ECUACIÓN DE PREDICCIÓN, PARA LA EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DEL AISLADO DE LA CEPA NATIVA DE *Isaria* spp. SOBRE ADULTOS DE BROCA DEL CAFÉ. BOQUETE, 2013.

Aislamiento	X ²	r ²	gl	Pr > F	Ecuación de predicción
<i>Isaria</i> spp.	0,14808	0,5238	6	0,0659	$y = 5,89 + 0,9669x$

Hernández y Garza (1994), informa que *Isaria fumosorosea* es utilizada en el control de *Bemisia tabaci*, presentando una CL₅₀ de $4,3 \times 10^8$ conidios.ml⁻¹, mientras que Vidal *et al.* (1997) encontraron una CL₅₀ en rangos de $2,6 \times 10^4$ a $2,3 \times 10^6$ conidios.ml⁻¹ de *I. fumosorosea* sobre ninfas de *B. tabaci*. Zimmermann (2008); Kim *et al.* (2008) y Ruíz *et al.* 2013, mencionan que *I. fumosorosea* es un hongo con mayor especificidad hacia *B. tabaci*, ya que los valores obtenidos de CL₅₀ son menores comparados con las CL₅₀ de otros hongos entomopatógenos u otras especies de *Isaria*.

Los datos obtenidos utilizando una concentración de esporas de *Isaria* spp. de $1,12 \times 10^{10}$ UFC.ml⁻¹, permitió identificar

las fases patogénica y saprofita del hongo (Figura 3). La fase patogénica va desde la inoculación del insecto con las esporas del hongo hasta su muerte, esto ocurre en promedio de 45 días. La fase saprofita, contempla cuatro etapa de desarrollo del hongo, inicia con un crecimiento del micelio del hongo que se presenta en promedio a 1,1 días después de la muerte de la broca, un cubrimiento de micelio sobre el insecto a los dos días después de la muerte de la broca, luego la formación de esporas se presenta un días después del cubrimiento de micelio y dos días después la esporulación. La fase saprofita en promedio se da en 6,1 días después de la muerte de la broca.

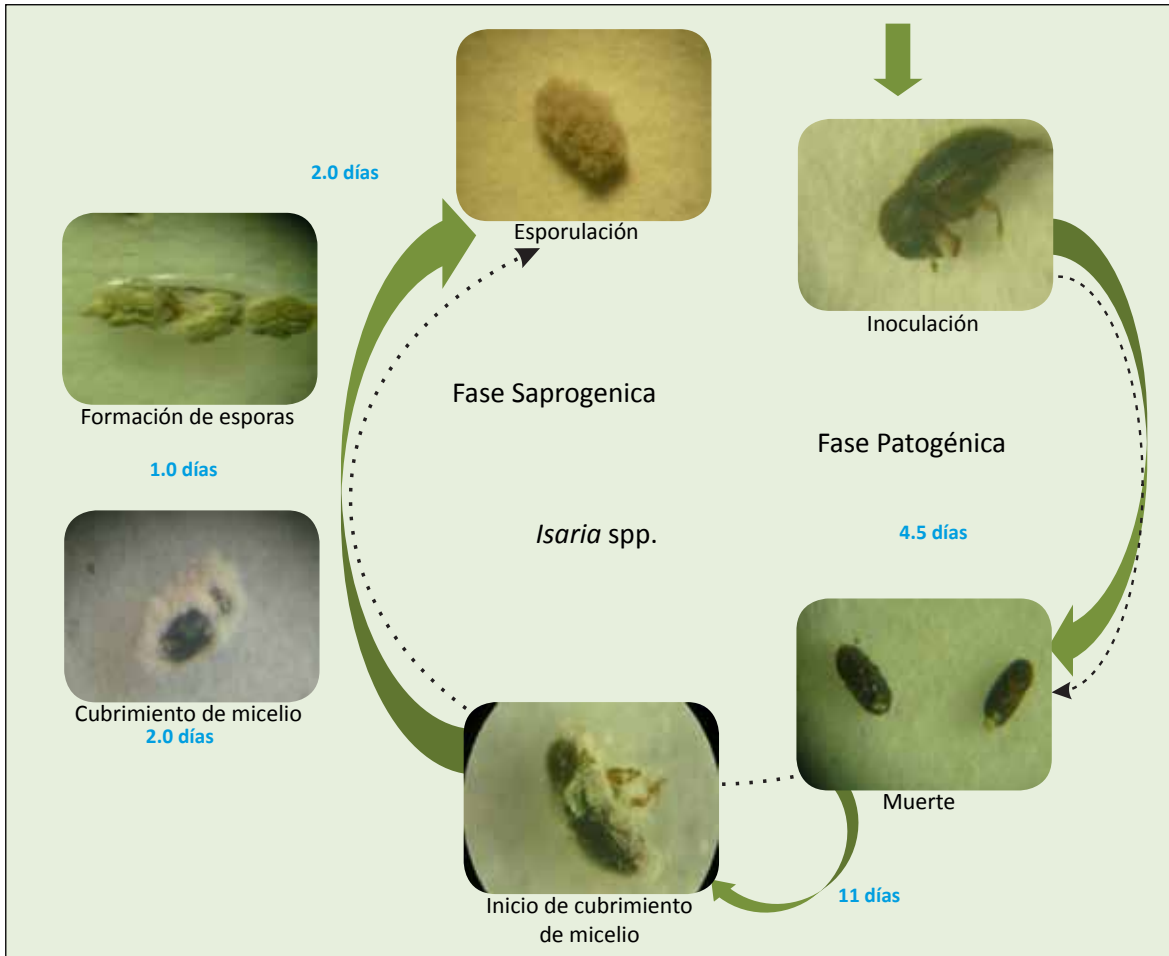


Figura 3. Fases: patogénica y saprofita del aislamiento de la cepa nativa de *Isaria* spp. sobre *H. hampei*, obtenido en las pruebas de patogenicidad.

CONCLUSIONES

- El aislado de la cepa de *Isaria* spp. en todas las pruebas de patogenicidad realizadas resultó con una alta virulencia, también se demostró ser patogénico sobre adultos hembras de la broca del café procedentes de las tierras altas de Chiriquí.
- La cepa nativa de *Isaria* spp. confirmó ser de mayor virulencia que aquellas

introducidas de otras regiones y potencialmente candidata para el desarrollo de bioplaguicida a base de hongo entomopatógeno para el control de *H. hampei* en la región cafetalera de la provincia de Chiriquí.

RECOMENDACIONES

- Continuar pruebas similares con adultos de broca procedentes de regiones donde se produce la especie

Coffea canephora, para validar el efecto sobre individuos procedentes de alturas menores a 1000 msnm.

- Estudiar su eficacia biológica en parcelas de café bajo condiciones de campo, en dos sistemas de siembra, sombra y a pleno sol, para verificar su potencial de control bajo condiciones diferentes.
- Validar estos resultados en parcelas de café en las áreas de producción de café de los distritos de Renacimiento, Bugaba y Boquete; y probar metodologías de formulación líquida y en polvo, que permitan un acceso rápido de la tecnología para productores.

BIBLIOGRAFÍA

- Ali, S; Zhen, H; Ren, S. 2010. Production of cuticle degrading enzymes by *Isaria fumosorosea* and their evaluation as a biocontrol agent against diamondback moth. J. Pest Sci. 83:361-370.
- Andersen, SO. 1979. Biochemistry of insect cuticle. Annual Review of Entomology 24(1):29-61.
- Avery, PB; Faull, J; Simmonds, MS. 2004. Effect of different photoperiods on the growth infectivity and colonization of Trinidadian strains of *Paecilomyces fumosoroseus* on the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, using a glass slide bioassay. J. Insect Sci. 4(38):1-10.
- Bustillo P, AE; Cárdenas, R; Villalba, DA; Benavides, P; Orozco, J; Posada, FJ. 1998. Manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. Chinchiná, Colombia, Cenicafé. 134 p.
- Bustillo P, AE. 2006. Una revisión sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), en Colombia. Revista Colombiana de Entomología 32:101-116.
- Cabanillas, EH; Jones, AW. 2009. Effects fo temperature and cultura media on vegetative growth of an entomopathogenic fungus *Isaria* sp. (Hypocreales: Clavicipitaceae) Naturally Affecting the Whitefly, *Bemisia tabaci* in Texas. Mycopathología 167:263-271.
- Camacho C, O. 1990. PCPROBIT VER 1.0 Colegio de Postgraduados. Centro de Estadística y Cálculo. Licencia: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. México.

- Castellanos, D. 1997. Importancia de la patogenicidad de la acción enzimática del hongo *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. *Revista Colombiana de Entomología* 23(1-2):65-71.
- Delgado, F; López, Y; Girado, EM. 2001. Actividad enzimática de hongos y su patogenicidad sobre *Hypothenemus hampei*. *Manejo Integrado de Plagas* no. 60:43-49.
- Ferrón, P. 1981. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In Burges, H.D. Ed. *Microbial control pest and plant diseases 1970-1980*. London, academic Press. p. 465-482.
- González G, MT; Posada, FJ; Bustillo, AE. 1993. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *B. bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. *CENICAFE* 44(3):93-102.
- González G, MT; Valencia J, A; Bustillo P, AE. 2001. Incremento de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*, utilizando integumento del insecto en el medio de cultivo. *Manejo Integrado de Plagas* 60:31-35.
- Hernández, VM; Garza, E. 1994. Patogenicidad de *Paecilomyces fumosoroseus* a mosquita blanca *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). In XVII Congreso Nacional de Control Biológico. Oaxaca. (1994, Oax, México). Sociedad Mexicana de Control Biológico. 42-43 p.
- Khachatourians, GG. 1991. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. In Aurora, DK; Ajello, A; Mukerji, KG. Eds. *Handbook of Applied Mycology. Humans, Animals and Insects*. New York, Marcel Dekker. 2:613-661.
- Kim, JS; Roh, JY; Choi, JY; Shin, SC; Jeon, MJ; Je, YH. 2008. Insecticidal activity of *Paecilomyces fumosoroseus* SFP-198 as a multi-targeting biological control agent against the greenhouse whitefly and the two-spotted spider mite. *Int. J. In. Entomol.* 17:181-187.
- Lezcano B., JA. 2014. Proyecto de Investigación e innovación para el manejo integrado del cultivo de café. Informe de logros del Proyecto 2010-2014. Programa para la Competitividad del Agronegocio. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. PA. 2 p.

- Patersen, I; Charnley, K; Cooper, R; Clarkson, J. 1994. Specific induction of cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Microbiology no. 140:185-189.
- Ruíz S, E; Chan C, W; Alejo, JC; Tun S, JM; Pérez G, A; Lara R, J. 2013. Virulencia de aislados monospóricos de *Isaria fumosorosea* sobre inmaduros de *Bemisia tabaci*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 4(3):381-392.
- Ruíz C, R. 1996. Efecto de la fenología del fruto de café sobre los parámetros de la tabla de vida de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari), Tesis Ing. Agr. Manizales, Colombia. Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuaria. 87 p.
- Scorsetti, AC; Humber, AR; De Gregorio, C. 2008. New records of entomopathogenic fungi infecting *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum*, pest of horticultural crops, in Argentina. Bio Control 53:787-796.
- Smith, RJ; Grula, EA. 1981. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology 37(2):222-230.
- Smith, RJ; Pehrul, S; Grula, EA. 1981. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of entomopathogenic hyphomycetes. Journal of Invertebrate Pathology 38:335-344.
- St. Leger, R; Charnley, K; Cooper, RM. 1986. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in cultura on cuticle. Journal of Invertebrate Pathology 48:85-95.
- Vélez A, PE; Posada F, FJ; Marín M, P; González G, MT.; Osorio V, E; Bustillo P, AE. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. CENICAFE. (Boletín Técnico) no. 17:1-10.
- Vidal, C; Fargues, J; Lacey, LA. 1997. Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: effect of temperature on vegetative growth. J. Invert. Pathol. 70(1):18-26.
- Willis, JH. 1987. Cuticular proteins: The neglected component. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 6(2):203-215.

Zimmermann, G. 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science* 37:373-379.

Zimmermann, G. 2008. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol Science and Technology* 18(9):865-901.