



## HONGOS ENTOMOPATÓGENOS ASOCIADOS A INSECTOS RECOLECTADOS EN PLANTACIONES DE CAFÉ EN EL OESTE DE PANAMÁ

Sumling Y. Castillo<sup>1</sup>, Juan A. Bernal Vega<sup>1</sup>, José Lezcano<sup>2</sup>, Meike Piepenbring<sup>3</sup> & Orlando Cáceres<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Chiriquí 0427, Escuela de Biología, David, Chiriquí, Panamá.

<sup>2</sup>Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, sub-centro Boquete, David, Chiriquí, Panamá.

<sup>3</sup>Department of Mycology, Goethe University, 60054 Frankfurt am Main, Germany. sumlingcastillo@hotmail.com, juanbern@gmail.com, piepenbring@em.uni-frankfurt, o\_caceres\_@hotmail.com.

### RESUMEN

Este estudio se realizó con la finalidad de determinar la diversidad de hongos entomopatógenos nativos asociados a insectos presentes en plantaciones de café en Boquete (sin la presencia de *Hypothenemus hampei* Ferrari). El trabajo de campo se realizó entre octubre y noviembre de 2005. Se recolectaron insectos con la sintomatología del ataque de hongos entomopatógenos y se aislaron e identificaron. Un total de 33 cultivos de hongos se obtuvieron del aislamiento de micelio presente en las muestras de insectos. Los cultivos corresponden a siete especies en cinco géneros de hongos patógenos: *Acremonium charticola*, *A. crassum*, *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*, *Fusarium oxysporum*, *Lecanicillium tenuipes*, *Metarhizium anisopliae* y *Torribiella tenuis*, los cuales se encontraron en insectos de los órdenes Dermáptera y Hemiptera. De éstas especies, solo *Acremonium* y *Beauveria* han sido documentadas en otros estudios como enemigos naturales de *H. hampei*. *Torribiella tenuis* fue el único teleomorfo encontrado parasitando insectos escamas.

### PALABRAS CLAVES

Boquete, control biológico, cultivo de café, *Hypothenemus hampei*, hongos entomopatógenos.

## ABSTRACT

This study was carried out in order to determine the diversity of native entomopathogenic fungi associated to insects present in coffee plantations in Boquete (without the presence of *Hypothenemus hampei* Ferrari). Fieldwork was conducted between October and November 2005. Insects were collected with the symptoms of entomopathogenic fungi attack and were isolated and identified. A total of 33 fungal cultures were obtained from the isolation of mycelia present in samples of insects collected in the field. The cultures correspond to 7 species in 5 genera of pathogenic fungi: *Acremonium charticola*, *A. crassum*, *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*, *Fusarium oxysporum*, *Lecanicillium tenuipes*, *Metarhizium anisopliae* and *Torribiella tenuis*, which were found on insects of the orders Dermaptera and Hemiptera. Of these species, only *Beauveria* and *Acremonium* have been documented in other studies as natural enemies of *H. hampei*. *T. tenuis* was the only teleomorph found infesting scale insects.

## KEYWORDS

Boquete, biological control, coffee plantations, *Hypothenemus hampei*, entomopathogenic fungi.

## INTRODUCCIÓN

La broca del café, *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), se considera uno de los principales problemas entomológicos a nivel mundial. Implica pérdidas importantes en los rendimientos por cosecha desde un 5 % hasta un 24 %, en casos extremos hasta un 50 % (Bustillo *et al.*, 2002). Hay más de 35 000 hectáreas de café atacado por este insecto en México, América Central y el Caribe (De la Rosa *et al.*, 2000). El cultivo de café (*Coffea arabica* L.) es uno de los rubros agrícolas más importantes de la región de Boquete en el oeste de Panamá. Actualmente es amenazado por el ataque de *H. hampei*, detectada desde 2005 en Renacimiento (zona fronteriza de Panamá con Costa Rica). En estudios realizados entre diciembre de 2005 y marzo de 2006, se detectaron niveles de infestación de *H. hampei* entre 1.4 % y 1.6 % en las localidades de Río Sereno y Monte Lirio, respectivamente (Guerra & Bernal, 2012). Por ello, surge la necesidad de buscar alternativas para el manejo de esta plaga en el país. Los hongos entomopatógenos son el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plaga. Actualmente se conocen aproximadamente 100 géneros y 750 especies de hongos patógenos de insectos (Monzón, 2001). Las especies más importantes

se clasifican en géneros como *Akanthomyces*, *Aschersonia*, *Beauveria*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Verticillium* y *Zoophthora* (Tzean *et al.*, 1997; González-Castillo *et al.*, 2012). En Panamá se conocen aproximadamente 25 especies de hongos patógenos de insectos registradas en los géneros *Aschersonia*, *Ascopolyporus*, *Cordyceps*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Isaria*, *Mattirolella*, *Metarhizium*, *Nectria*, *Tompetchia*, *Torrubiella* y *Verticillium* (Piepenbring, 2006). Aparentemente, estos hongos han sido poco investigados en Panamá. Sin embargo, para controlar insectos plagas utilizando los hongos como agentes de biocontrol, son necesarios más estudios que determinen la diversidad de hongos nativos que infecten insectos en ecosistemas naturales y así explotar sus posibles usos en el país.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Sitio de estudio**

El estudio se desarrolló en el distrito de Boquete, donde se ubicaron siete fincas de café al azar en los corregimientos de los Naranjos en las áreas de: Alto Lino (8° 46' 29.09" N, 82° 25' 40.44" O), Alto Quiel (8° 48' 23.79" N, 82° 27' 51.84" O), El Huacal (08°47'8.19" N, 82°26'5.98" O), El Salto (8° 47' 44.01" N, 82° 28' 25.67" O), Jaramillo centro (8° 46' 29.09" N, 82° 25' 40.44" O), Palmira arriba (08°45'56.88" N, 82°27'36.35" O) y Palmira centro (8° 44' 30.76" N, 82° 27' 3.97" O).

### **Método de cultivo y aislamiento de los hongos**

Para el cultivo de los hongos se utilizó el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) con antibiótico (Cloranfenicol 0.5 g/L). Se tomaron fracciones de micelio del hongo recolectado en el insecto muerto infestado y se colocaron en los medios de cultivo dentro de una cámara estéril de flujo laminar. Luego de inocular fracciones de micelio presentes en el cuerpo del insecto en los platos de Petri con el cultivo, se colocaron en bolsas plásticas con cierre hermético y se incubaron a 30 °C, hasta observar el crecimiento del micelio. Se realizaron aislamientos recurrentes hasta obtener cultivos puros. Para conservar los cultivos se tomaron fracciones de micelio y agar, se colocaron en viales estériles con agua estéril y se colocaron en refrigeración. Los procedimientos de siembra, traspaso de cultivo, aislamiento y

conservación se realizaron dentro de una cámara de flujo laminar para evitar la contaminación de los cultivos.

### **Método de identificación de los hongos**

Se prepararon placas de cada cultivo de los hongos utilizando el método de Estrada & Vélez (2003). Se consideraron las características morfológicas macroscópicas del cultivo (color, forma, crecimiento) y las microscópicas (estructuras reproductivas vegetativas, forma, color, tamaño y otras estructuras presentes). Para la identificación de los hongos se utilizaron las claves publicadas sobre hongos en insectos de Tzean *et al.* (1997) y Zare & Gams (2001).

### **RESULTADOS**

Se recolectaron 80 insectos muertos en las fincas de café seleccionadas en el distrito de Boquete, en los cuales solo se obtuvo 33 cultivos de hongos de siete especies, en cinco géneros. Se obtuvieron cultivos de las especies: *Acremonium charticola* (Lindau) Gams (seis aislamientos), *A. crassum* Petch (10 aislamientos), *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (nueve aislamientos), *B. brongniartii* (Sacc.) Petch (dos aislamientos), *Fusarium oxysporum* Schlecht (tres aislamientos), *Lecanicillium tenuipes* (Petch) Zare & Gams (dos aislamientos), *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok (un aislamiento). Además, se encontró un solo hongo en su fase sexual o teleomorfo (*Torrubiella tenuis*) parasitando insectos escamas (Heteroptera), de la cual no se pudo obtener un cultivo.

### **Descripción de las especies**

*A. charticola* (Fig. 1A): en medio de cultivo presentó micelio de color blanco, blanco-amarillento con la edad del cultivo, conidióforos ramificados, células conidiógenas con forma de punzón, conidios elipsoidales (Fig. 1B), tamaño 3-4.5 (-5) x 1-2  $\mu\text{m}$ , en cadenas cortas o solitarias sobre las fiálides. Se obtuvieron un total de 6 aislamientos de *A. charticola* en insectos escamas (Fig. 1) de las fincas de café de Alto Lino (3), Huacal (2) y el Salto (1). La especie *A. crassum* (Fig. 1C): en medio de cultivo presentó micelio de color blanco, blanco-amarillento con la edad del cultivo, se diferencia de la anterior por la formación de conidios en falsas cabezas y los conidios son cilíndricas de 5-7 x 2-3  $\mu\text{m}$ . Se obtuvieron un total de 10 aislamientos de *A. crassum* en insectos

escamas de las fincas de café en Huacal (6), Palmira (2) y el Salto (2). Ambas especies se encontraron parasitando insectos del orden Heteroptera (escamas verdes), recolectados sobre las hojas de café.

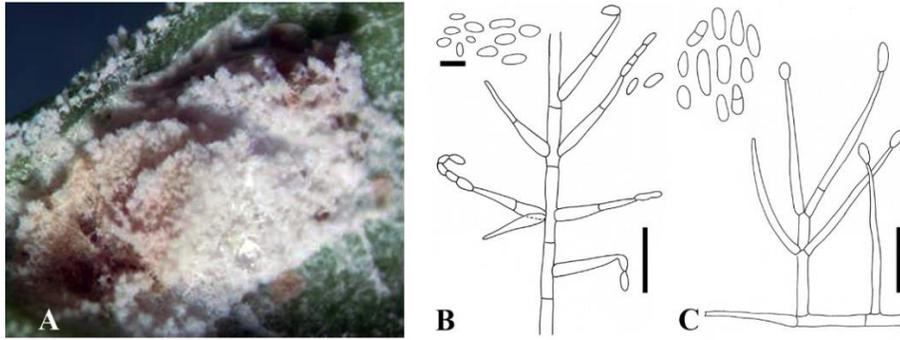


Fig. 1. A-C. A. Insecto escama con micelio del hongo *Acremonium charticola*. B. Conidióforos y conidios de *Acremonium charticola*. C. Conidióforos y conidios de *Acremonium crassum*. Escala (5 y 10  $\mu\text{m}$ ). Foto y dibujos por S.Y. Castillo, 2006.

***B. bassiana*** (Fig. 2A): en cultivo presentó un micelio de color blanco algodonoso, conidióforos con grupos de células conidiógenas con partes basales globosas y raquis alargados, delgados y denticulados, conidios globosas (Fig. 2B), tamaño 2-3.5 (-4) x 1-2.5 (-3)  $\mu\text{m}$ . Esta especie se encontró como parasito de insectos del orden Hemíptera (chinchas), cubriéndolos de micelio algodonoso de coloración blanquecina en hojas de café y en el suelo alrededor de la planta. Se obtuvieron 8 aislamientos de *B. bassiana* en los chinchas recolectados en Palmira arriba (6) y Palmira centro (2). La especie *B. brongniartii*: se diferencia de la anterior por la forma de las células conidiógenas que son más alargadas a cilíndricas, con un raquis alargado y denticulado, conidios elipsoidales a cilíndricas (Fig. 2C), tamaño 3-4.5 (-5) x (1-) 1.5-2.5 (-3)  $\mu\text{m}$ . Esta especie se encontró en insectos de los órdenes Dermáptera y Homóptera. Se obtuvieron 2 aislamientos de muestras en Alto Lino.

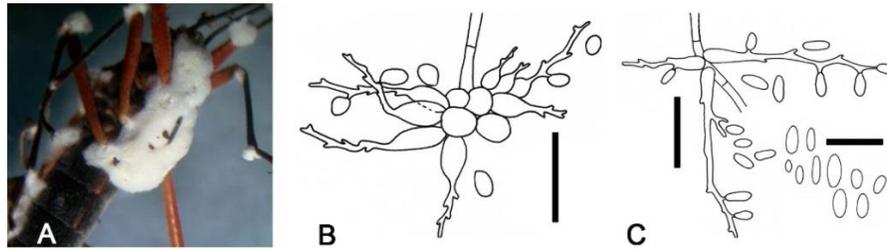


Fig. 2. A-C. A. Insecto (Hemiptera) cubierto por micelio del hongo *Beauveria bassiana*. B. Conidióforos y conidios de *Beauveria bassiana* (escala: conidióforos 10  $\mu\text{m}$ ). C. Conidióforos y conidios de *Beauveria brongniartii* (escala: conidióforos 10  $\mu\text{m}$ , conidios 5  $\mu\text{m}$ ). Foto y dibujos por S.Y. Castillo, 2006.

***F. oxysporum***: en cultivo presentó un micelio de color blanco algodonoso con pigmentación violeta púrpura en el medio de cultivo, conidióforos simples, cilíndricos, laterales, con clamidósporas laterales e intercalares, microconidios cilíndricas ovoides (Fig. 3A), tamaño 5-13 (-18) x (2-) 2.5-3.5 (-4)  $\mu\text{m}$ , macroconidios fusiformes, tres septos, tamaño (20-) 22-31 (-35) x 3-4.5 (-5)  $\mu\text{m}$ . se obtuvieron 3 aislamientos de insectos del orden Hemíptera de Alto Quiel (1) y Palmira centro (2).

***L. tenuipes***: en cultivo presentó micelio blanco lanoso, conidióforos erectos con una o varias fiálides en espiral, onduladas, esbeltas, alargadas, 1-2  $\mu\text{m}$  de ancho, células conidiógenas cortas con la base hinchada y el ápice estrecho ligeramente geniculado a denticulado. Conidios primarias alargadas a fusiformes, las secundarias pequeñas de forma elipsoidal, agrupadas en fascículos o solitarias sobre cada fiálide (Fig. 3B), tamaño (3-) 3.5-5 x (1-) 1.5-2  $\mu\text{m}$  (Fig. 3A). Se obtuvieron 2 aislamientos *L. tenuipes* de muestras de un insecto Homóptera en Huacal (1) y de un Hemíptera en Alto Quiel (1).

***M. anisopliae***: en cultivo presentó un micelio con coloraciones de blanco, verde amarillo a verde oscuro con la edad del cultivo, conidióforos ramificados con forma de empalizada, formados por metulae con fiálides en las puntas de color verde hialino, conidios elipsoidales a cilíndricas (Fig. 3C), tamaño (4-) 5-8 (-10) x (2-) 2.5-3  $\mu\text{m}$  (Fig. 3B). Se obtuvo aislamiento de un insecto Dermáptera en Palmira arriba (1).

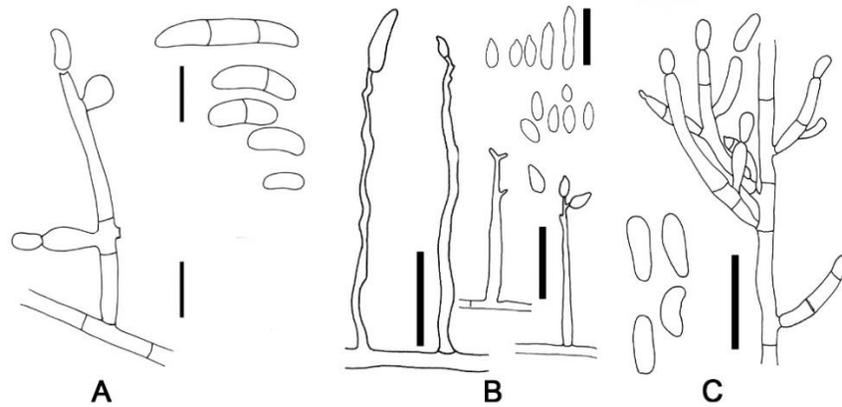


Fig. 3 A-C. A. Conidióforos y conidios de *Fusarium oxysporum* (escala: 10  $\mu\text{m}$ ). B. Conidióforos y conidios de *Lecanicillium tenuipes* (escala: conidióforos 10  $\mu\text{m}$ , conidios 5  $\mu\text{m}$ ). C. Conidióforos y conidios de *Metarhizium anisopliae* (escala 10  $\mu\text{m}$ ). Dibujos por S.Y. Castillo, 2006.

***T. tenuis*** (teleomorfo): se encontró parasitando insectos escama del orden Homóptera sobre las hojas de café. Emergen de los insectos cuerpos fructíferos compactos, tipo peritecio con forma de cono, coloración naranja a chocolate brillante, crecimiento solitario o gregario, subículo formado por una trama de hifas blancas con margen desprendible. Ascosporas con más de 200  $\mu\text{m}$  de longitud, cilíndricas, capitadas, ascosporas filiformes, multiseptadas, arreglo en filas paralelas, aproximadamente con 1.5  $\mu\text{m}$  de ancho.

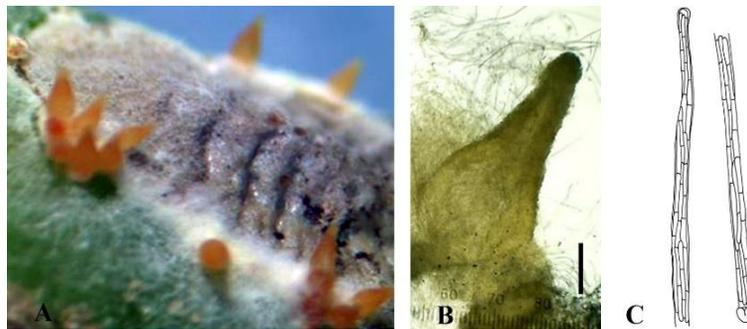


Fig. 4 A-C. A. Estado sexual de *Torrubiella tenuis* en Heteroptera. B. Peritecio y Ascos de *Torrubiella tenuis* (escala: 25  $\mu\text{m}$ ). C. Asco con

ascosporas de *Torrubiella tenuis* (escala: 10  $\mu\text{m}$ ). Fotos y dibujos por S. Y. Castillo, 2006.

## DISCUSIÓN

La mayoría de los insectos recolectados pertenecen a los órdenes Dermáptera, y Hemíptera (subórdenes Heteroptera y Homoptera). La presencia de estos órdenes fue común en todas las fincas en estudio. Los especímenes mayormente recolectados fueron insectos escamas (Homóptera), de los cuales se obtuvieron aislamientos del género *Acremonium*. En cambio en chinches (Heteroptera) se obtuvieron aislamientos del género *Beauveria* y *Fusarium*. Bustillo *et al.* (2002), sugiere que *F. oxysporum* puede actuar como saprofito o ser un patógeno débil y que bajo las condiciones de laboratorio y en el campo no causa una tasa elevada de mortalidad. Los aislamientos menos frecuentes fueron del género *Lecanicillium* y *Metarhizium*. Las especies aisladas en este estudio fueron: *A. charticola*, *A. crassum*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *L. tenuipes* y *T. tenuis*, que de acuerdo con la literatura se consideran como especies entomopatógenas (Tzean *et al.*, 1997, Trabanino *et al.*, 2001, Morales *et al.*, 2009). De la especie *T. tenuis* no se logró obtener aislamientos, pero fue el único hongo en estado sexual encontrado en campo. La especie desarrolló fructificaciones en forma de peritecios sobre el cuerpo de insectos escamas. Johnson *et al.* (2009), menciona que esta especie es normal encontrarla parasitando insectos escamas y que presenta un peritecio con forma cónica alargada y un estroma aplanado.

Los resultados encontrados en este estudio son similares a los encontrados en cafetales de México y Colombia, donde se estudió la microbiota asociada en forma natural a *H. hampei* (Pérez *et al.*, 2003, Bustillo *et al.*, 2002), encontrando los hongos *Acremonium* sp., *B. bassiana*, *F. oxysporum* y *M. anisopliae* como enemigos naturales. Igualmente Morales *et al.* (2009), realizó estudios sobre hongos entomopatógenos asociados a la muerte de la broca en cafetales de Renacimiento-Panamá, en los cuales se registró solo los hongos *Beauveria* sp. y *Fusarium* sp.

## CONCLUSIONES

Los hongos mayormente aislados de insectos muertos recolectados en siete fincas de café en Boquete fueron los géneros *Acremonium* y *Beauveria*. En menor grado se obtuvieron aislamientos de *Fusarium*, *Lecanicillium* y *Metarhizium*. Se ha documentado que *Acremonium* sp., *B. bassiana*, *F. oxysporum* y *M. anisopliae* son los hongos que podrían tener mayor potencial para ser utilizadas en el control biológico de plagas. Aunque en la investigación no se pudo corroborar si los hongos aislados infectaron a los insectos en su estado vivo o muerto, se presume que la infección ocurrió cuando el insecto aún estaba vivo. Por lo que, hace falta realizar ensayos de patogenicidad con los cultivos obtenidos, determinar niveles de infestación y obtener luego biopreparados fúngicos para el control biológico de la broca y otros insectos plagas.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el apoyo del Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Panamá (IDIAP), la Universidad Autónoma de Chiriquí, la Universidad Goethe, Frankfurt am Main y el Servicio de Intercambio Académico Alemán (DAAD). Se agradece a R. Kirschner por su apoyo en la identificación de las muestras.

## REFERENCIAS

- Bustillo, A.E., R. Cárdenas & F.J. Posada. 2002. Natural enemies and competitors of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in Colombia. *Neotrop. Entomol.* 31: 635-639.
- De la Rosa, W., H.R. Segura, J.F. Barrera & T. Williams. 2000. Laboratory evaluation of the impact of entomopathogenic fungi on *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethyridae), a parasitoid of the Coffee Berry Borer. *Environ. Entomol.* 29: 126-131.
- Estrada, M.N. & P.A. Vélez. 2003. Procedimiento para el registro, aislamiento, mantenimiento, preservación y sistematización de una colección de hongos entomopatógenos. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* 70: 1-7.

González-Castillo, M., C.N. Aguilar & R. Rodríguez-Herrera. 2012. Control de insectos-plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: retos y perspectivas. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila* 4 (8): 42-55.

Guerra, T. & J.A. Bernal Vega. 2012. Determinación de los niveles de infestación de *Hypothenemus hampei ferrari* (Coleoptera: Curculionidae) en dos fincas de café en renacimiento, Chiriquí, Panamá. *Scientia* 22(1): 21-32.

Johnson, D., G. Sung, N.L. Hywel, J.J. Luangsa, J.F. Bischoff, R.M. Kepler & J.W. Spatafora. 2009. Systematics and evolution of the genus *Torrubiella* (Hypocreales, Ascomycota). *Mycol. Res.* 113: 279-289.

Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 63: 95-103.

Morales, R.A., E. Sánchez, S. Caballero & J. Muñoz. 2009. Inventario de hongos asociados a la muerte de la broca del cafeto (*Hypothenemus hampei* Ferr.) en Renacimiento, Panamá. Nota de investigación en progreso. *Revista del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá* 13 (4): 1-4.

Pérez, J., F. Infante, F. Vega, F. Holguín, J. Macías, J. Valle, G. Nieto, S. Peterson, C. Kurtzman & K. O'Donnell. 2003. Mycobiota associated with the Coffee Berry Borer (*Hypothenemus hampei*) in Mexico. *Mycol. Res.* 107: 879-887.

Piepenbring, M. 2006. Checklist of Fungi in Panama. *Puente Biológico (Universidad Autónoma de Chiriquí)* 1: 1-190.

Trabanino, R., C. Kuniyoshi & M. Michel. 2001. Manual de agentes de control biológico. Centro de control biológico para Centroamérica. Honduras, Zamorano. Biblioteca Wilson Popenoe [Consultado 01 enero 2006]. Disponible en: <http://www.zamorano.edu/biblioteca>.

Tzean, S.S., L.S. Hsieh & W.J. Wu. 1997. Atlas of entomopathogenic fungi from Taiwan. Council of Agriculture, Executive Yuan, Taiwan. 214 pp.

Zare, R. & W. Gams. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata* IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. Nova Hedwigia 73: 1-50.

*Recibido abril de 2012, aceptado agosto de 2013.*