

Caracterización morfofisiológica y molecular de hongos entomopatógenos asociados a *Hypothenemus hampei* en áreas cafetaleras de la comarca Ngäbe-Buglè

Morphophysiological and molecular characterization of entomopathogenic fungi associated with *Hypothenemus hampei* in coffee areas of the Ngäbe-Buglè region

Gladys I. González Dufau¹, Arnulfo Monzón², Julio Santamaría Guerra³, Ulfredo Santo³, Sindy Caballero³, Kathia Castrejon³, Marco Sanjur³

¹ Doctorado en Agroecología/https://orcid.org/0000-0002-0989-0957/ggdufau@gmail.com/Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá

² Ph.D. Entomología,https://orcid.org/0000-0002-0661-0390/arnulfo.monzon@ci.una.edu.ni/Universidad Nacional Agraria

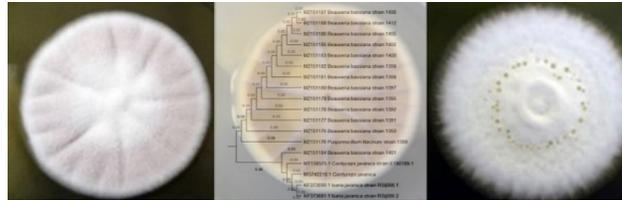
³ Ph.D. Innovación Institucional/https://orcid.org/0000-0002-0215-2599/juliosguerra@gmail.com/Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá

³ Ing. Agr. Cul. Trop./https://orcid.org/0000-0001-8255-7264/uspineda@hotmail.com/Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá

³ Lic. M. Agr. https://orcid.org/0000-0003-1497-8803/sindy1216@gmail.com/Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá

³ Tec. Agr. https://orcid.org/0000-0002-0867-1672/lilineth03041988@gmail.com/Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá

³ B. Agr. https://orcid.org/0000-0002-2183-6558/msanjurp@gmail.com/Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá



RESUMEN

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) es la principal plaga del cultivo del café (*Coffea* spp.) y colonizó recientemente este cultivo en la comarca Ngäbe-Buglè. Una de las alternativas de manejo de esta plaga es a través de sus enemigos naturales, por lo que el objetivo de este estudio fue caracterizar morfofisiológica y molecularmente aislados de hongos entomopatógenos nativos, colectados en la comarca Ngäbe-Buglè y seleccionar los más promisorios, para su inclusión en programas de manejo agroecológico de plagas. La identificación molecular se hizo mediante la secuenciación de la región del espaciador transcrito interno (ITS, del inglés Internal Transcribed Spacer) (ITS 1 y 2 incluyendo 5.8 S). Se identificaron 13 aislados pertenecientes a *Beauveria bassiana* (Vullevein), y un aislado de *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Hou- braken, Hywel-Jones & Samson. Adicionalmente, se incluyó un aislado (RS-Ij006) de *Isaria javanica* (= *Cordyceps javanica* (Frieder. & Bally) Samson & Hywel-Jones) de la colección de hongos entomopatógenos del Laboratorio de Entomología del IDIAP, David, para la determinación de las características morfológicas. Para la determinación de las características morfológicas se utilizaron tres medios de cultivo: Papa-Dextrosa-Agar, Malta-Dextrosa Agar y Sabouraud-Dextrosa-Agar. Se evaluó la mortalidad y se obtuvo

ABSTRACT

The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) is a monophagous specie of coffee berries (*Coffea* spp.) and is one of the main pests of this crop in the Ngäbe-Buglè Region. The use of native natural enemies is one of the alternatives for managing this pest, because of that the objective of this study was to characterize morphologically, physiologically, and molecularly, isolated entomopathogenic fungi collected in coffee plantations of the Ngäbe-Buglè Region, to select those with potential, for inclusion in agroecological pest management programs. The molecular characterization of the isolates was performed by sequencing the ITS (Internal Transcribed Spacer) region (ITS 1 and 2 including 5.8 S) and comparison with the database GenBank. Twelve isolates were determined as belonging to *Beauveria bassiana* (Vullevein), and one isolate as *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Hou- braken, Hywel-Jones & Samson. Additionally, an *Isaria javanica* isolate (= *Cordyceps javanica* (Frieder. & Bally) Samson & Hywel-Jones)) from the entomopathogenic fungi collection of the Entomology Laboratory of IDIAP, David, was included for determination of morphological characteristics. Mortality and median lethal time were evaluated. The highest mortality rates, at day 15 after inoculation, were observed with RS-Ij006 and D-Bb1400 isolates with 100 %; followed by

Recibido: 8 de enero del 2021

Aceptado: 10 de mayo del 2021



Los artículos de la revista La Calera de la Universidad Nacional Agraria, Nicaragua, se comparten bajo términos de la licencia Creative Commons: Reconocimiento, No Comercial, Compartir Igual. Las autorizaciones adicionales a las aquí delimitadas se pueden obtener en el correo edgardo.jimenez@ci.una.edu.ni

© Copyright 2021. Universidad Nacional Agraria (UNA).

BIOTECNOLOGIA

el Tiempo Letal Medio (TL50)). Los mayores porcentajes de mortalidad de *H. hampei*, al día 15 después de la inoculación, se observaron con los aislamientos RS-Ij006 y D-Bb1400 con 100 %; seguidos por D-Bb1398 con 98.90 % y D-Bb1350 con 93.3 %. Los menores registros del TL50 se obtuvieron con los aislados de D-1388 (*Purpureocillium lilacinum*) con 3.52 días y RS-Ij006 con 3.98 días, seguidos por D-Bb1350 con 6.58 días. Los aislados a los que el insecto presentó menor susceptibilidad fueron D-1391, D-1399, D-Bb1397, D-Bb1412 y D-Bb1395, D-Bb1392, estos necesitaron más tiempo para alcanzar el 100 % de mortalidad de adultos de *H. hampei* y el TL50 fue superior a 11 días.

Palabras clave: *Purpureocillium lilacinum*, *Cordyceps*, *Beauveria*, manejo agroecológico, biodiversidad funcional.

D-Bb1398 with 98.90 % and D-Bb1350) with 93.3 %. The least mean lethal times (TL50) were obtained with the isolates of D-1388 (*Purpureocillium lilacinum*) with 3.52 days and RS-Ij006 with 3.98 days followed by D-Bb1350 with 6.58 days. The isolates in which the insect presented lower susceptibility were D-1391; D-1399; D-Bb1397; D-Bb1412; D-Bb1395, D-Bb1392 these needed more time to reach 100 % adult mortality of *H. hampei* and the TL50 was greater than 11 days.

Key words: *Purpureocillium lilacinum*, *Cordyceps*, *Beauveria*, agroecology, functional biodiversity.

El cultivo de café es de gran relevancia para la agricultura indígena y campesina familiar de la comarca Ngäbe-Buglè (CNB) debido a que representa el cuatro por ciento de la producción nacional, está entre los tres cultivos de mayor importancia económica para la población local, en cuanto a número de explotaciones y generación de ingresos como lo señala el Instituto Nacional de Estadística y Censo (2011). Además, por las características del manejo del cultivo en agroecosistemas forestales, ofrece una gama importante de servicios ambientales como son: captura de agua, conservación del suelo, captura de carbono, así como la conservación y protección de diversos grupos biológicos como son, principalmente, plantas (árboles, epífitas, etc.), aves, insectos y anfibios (Motta-Delgado y Murcia-Ordóñez, 2011).

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) es una especie monófaga del fruto del café (*Coffea* spp.), que se considera la principal plaga insectil de este cultivo a nivel mundial (Monzón, 2001; Vázquez, 2005). En Panamá fue reportada por primera vez en la región occidental en el año 2005 (Castillo *et al.*, 2013), con dispersión posterior hacia el resto de las zonas cafetaleras, y es en la actualidad una de las principales plagas de este cultivo en la comarca Ngäbe-Buglè (CNB), alcanzando infestaciones hasta de 29 % (Palacio *et al.*, 2014).

Durante los primeros años de incidencia de esta plaga en Panamá, su manejo se basó principalmente en el uso de insecticidas, muchos de ellos altamente tóxicos y contaminantes al ambiente, principalmente por desconocimiento de otras alternativas de manejo de la plaga. González *et al.* (2018), reportan los hongos entomopatógenos (HEP) como enemigos naturales presentes en las poblaciones de *H. hampei* en la CNB. La aparición de epizootias en poblaciones de insectos se indica como un fenómeno natural (Monzón, 2007), que se propicia por diversos factores, principalmente las características propias del insecto hospedero, del patógeno y del ambiente, interactuando entre sí, además del efecto del manejo que se realiza en el sistema de producción (Vásquez, 2005). Entre las características de

los HEP, se destacan la mortalidad total, el Tiempo Letal Medio (TL50), la velocidad de crecimiento diario (mm día⁻¹), Tiempo Medio de Germinación o esporulación (TG50), entre otras (Carrillo-Rayas y Blanco-Labra, 2009; Lezcano *et al.*, 2015).

Los HEP pertenecen a un amplio grupo de microorganismos que proveen múltiples servicios a los agroecosistemas, como la regulación biótica, la estabilidad del suelo, la descomposición de la materia orgánica, entre otros (Sarandón, 2020). Motta-Delgado y Murcia-Ordóñez (2011) indican que los HEP de mayor utilización para el control biológico incluyen a: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Lecanicillium* (*Verticillium*). De los cuales los de mayor utilización en el mundo son *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *P. fumosoroseus* (*Isaria fumosoroseus*) (Téllez-Jurado *et al.*, 2009).

Debido al potencial de las epizootias causadas por HEP en la broca del café, se propuso realizar análisis morfofisiológicos y moleculares de los hongos entomopatógenos encontrados naturalmente asociados a *H. hampei* (Ferrari), como primer paso en el desarrollo de la alternativa de su uso como agentes de control biológico de la plaga. Así, el objetivo de este estudio fue caracterizar morfofisiológica y molecularmente los aislados de HEP colectados en la CNB afectando naturalmente poblaciones de *H. hampei* (Ferrari), y seleccionar las que muestren mejor potencial patogénico para su incorporación en programas de manejo agroecológico de dicha plaga.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta purificación y aislamiento. Se colectaron cadáveres de *H. hampei* con crecimiento micelial, en una plantación de café de la localidad de Cerro Tula (8°24'18.17" y 81°47'5.51"; corregimiento de Hato Chamí, distrito de Nolé Duima en la CNB, los que fueron desinfectados superficialmente en el laboratorio de Entomología del Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP)

BIOTECNOLOGIA

en David, Provincia de Chiriquí, con hipoclorito de sodio al 0.5% durante cinco minutos, y lavados con agua destilada estéril. Seguidamente, estos se colocaron individualmente en cámara húmeda (90 % HR y 25±1°C). Los hongos que se desarrollaron en los cadáveres fueron aislados y sembrados en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), y codificados. Para fines de comparación, se incluyó en el estudio, el aislado RS-Ij006 (*Cordyceps javanica*) procedente de la colección de hongos entomopatógenos del IDIAP Centro de Innovación Agropecuaria Chiriquí, David, Chiriquí.

Caracterización molecular. Identificación molecular a través de genes de ADN. La extracción del ADN genómico de los aislados obtenidos, se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT), Ciudad del Saber, Panamá. Se empleó un kit de purificación de ADN de QuiaGen®. La amplificación del fragmento de ITS por PCR se realizó con los cebadores (primers) ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), usando 30 ciclos de desnaturalización (94 °C por 45 s), hibridación (55 °C por un minuto) y polimerización (72 °C por 45 s). Los cebadores se diseñaron de las secuencias conservadas 18S-ADNr y 28S-ADNr en hongos. Las secuencias de nucleótidos de los fragmentos amplificados se compararon con las secuencias ya publicadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). A las secuencias de ADN obtenidas, se agregó una (RSCj006), previamente identificada, obtenida a partir de *Trialeurodes vaporariorum* (González *et al.*, 2015). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de la distancia p (Nei y Kumar, 2000) y se muestran en las unidades del número de diferencias de base por sitio. Este análisis involucró 18 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones ambiguas se eliminaron para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). Hubo un total de 751 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (Kumar *et al.* 2018).

Caracterización morfofisiológica

Características macroscópicas. Los hongos se identificaron morfológicamente a nivel de especie (Seifert *et al.* 2011). Se obtuvieron cultivos monospóricos a partir de colonias puras de los aislados en medio de cultivos PDA (Leucona, 1996). A partir de los cultivos monospóricos, los aislados se sembraron en PDA, Malta Dextrosa Agar (MDA) y SDA (Sabourad Dextrosa Agar). La siembra se hizo, colocando en el centro de los platos petri, un trozo del cultivo monospórico y se incubaron a 26±1°C en oscuridad. Para cada aislado se utilizaron cinco réplicas por cada medio de cultivo. A los 10 días de sembrado (dds), se registraron las características macroscópicas como forma de la colonia, elevación, aspecto

de la superficie y color del micelio. La coloración por el anverso y el reverso de las colonias se estimó siguiendo los códigos de la paleta de color de suelos Munsell (Munsell Color Company, 2000).

Crecimiento radial. Para determinar el crecimiento radial, se colocó un cultivo monospórico en el centro del plato con medio de cultivo y se colocó en incubación a 26±1°C en oscuridad. Para fines de realizar las mediciones de crecimiento, en la parte posterior de los platos se marcaron cuatro radios, sobre los que se hicieron las mediciones, las que se realizaron durante 10 días, iniciando al segundo día después del establecimiento del ensayo. Con los datos obtenidos se determinó la tasa de crecimiento en mm día⁻¹ (French y Hebert, 1982) para los tres medios de cultivo.

Diámetro de la colonia. A partir de cultivos monospóricos incubados a 26±1°C por 10 días; se midió el diámetro (mm) en dos puntos de la colonia, realizando dos lecturas por cada plato petri.

Características microscópicas

Tamaño de conidias. Se obtuvo conidias a partir de un cultivo puro de 10 dds, de los hongos del estudio, y se midió el largo y ancho de las mismas, utilizando un microscopio óptico Olympus CX31 con un aumento de 100x. Se evaluaron 50 conidias por aislado y por medio de cultivo, para medir su tamaño en micras (French y Hebert, 1982).

Concentración de conidias. La concentración de conidias se midió a los 10 días, luego del crecimiento radial de las colonias. En tubos Falcon de 15 ml conteniendo 10 ml de Tween 80 al 0.05 % (v/v) se colocaron individualmente tres secciones de 1 cm diámetro del crecimiento esporulado de los aislados. Posteriormente se realizaron diluciones sucesivas hasta la dilución 10⁻³. Se realizaron cinco repeticiones por aislado. Se realizó el conteo al microscopio con la cámara de Neubauer (Neubauer improved, Marienfeld, Alemania) y se registraron los conteos de conidias producidas (cm²) por cada aislado en los tres medios de cultivo (French y Hebert, 1982).

Germinación. La capacidad germinativa de los aislados fue evaluada simultáneamente a la prueba de patogenicidad. Se utilizó una concentración de 1x10⁶conidias ml⁻¹ y se colocaron alícuotas de 5 µl en siete puntos del medio en platos petri, se incubaron durante 24 horas a 26 °C y se adicionó una gota de azul de lactofenol con el fin de suspender el proceso de germinación y teñir las esporas. Se recortaron trozos del cultivo en los puntos de inoculación, se hicieron montajes en portaobjeto y se procedió al conteo de conidias germinadas y no germinadas en cinco campos microscópicos.

BIOTECNOLOGIA

La observación microscópica se realizó con un aumento de 40x; los resultados se expresaron en porcentaje de esporas germinadas. Para cada aislamiento se utilizaron cinco cajas de petri por repetición.

Mortalidad de *H. hampei*. Para evaluar la mortalidad y TL50 de los hongos aislados, se utilizaron adultos de aproximadamente 10 días, obtenidos de una cría de *H. hampei*, establecida a partir de adultos colectados de cerezas de café infestadas naturalmente. La inoculación se realizó por inmersión en una suspensión de 1×10^9 conidias ml⁻¹ + Tween 80 (0.1%) durante un minuto. Como testigo se utilizó agua destilada estéril + Tween 80 (0.1%). La unidad experimental se estableció con 10 adultos de *H. hampei*, colocados individualmente en viales de vidrio, donde se les suministró un grano de café pergamino. El ensayo se mantuvo a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, en cámara húmeda con agua destilada estéril sobre papel toalla esterilizado. La mortalidad se registró diariamente durante 15 días y los cadáveres se colocaron individualmente en cámara húmeda con el fin de obtener esporulación. El Tiempo Letal Medio fue calculado mediante el método de regresión lineal simple.

Análisis estadístico. Los datos del crecimiento lineal se transformaron a $\log(x + 1)$; este y la producción de conidias se analizaron mediante un análisis de varianza y separación de medias con Tukey ($\alpha = 0.05\%$). Los datos de mortalidad se transformaron a $\arcsin(\sqrt{x/100})$ y se analizaron mediante una prueba de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0.05\%$).

RESULTADO Y DISCUSIÓN

Colecta, purificación y aislamiento. A partir de los especímenes de *H. hampei*, se obtuvieron 14 aislados de hongos, los que fueron codificados de la siguiente manera: D-Bb1350, D-P11388, D-Bb1391, D-Bb1392, D-Bb1395, D-Bb1397, D-Bb1398, D-Bb1399, D-Bb1400, D-Bb1401, D-Bb1402, D-Bb1405, D-Bb1406, D-Bb1412.

Caracterización molecular. Al analizar las secuencias, 13 de los 14 aislados correspondieron 100 % a *Beauveria bassiana* Bals. (Vuill.) (Accesiones MG548313.1 y MH922794.1). Un aislado se identificó como muy cercano al género *Isaria* (= *Paecilomyces*) similar al aislado RS-Ij006 y coincidió 100 % (Accesión KF624800.1) con el género *Purpureocillium lilacinum* del GenBank. Luangsa-ard *et al.* (2011), proponen este microorganismo como un nuevo género *Purpureocillium* y una nueva combinación *Purpureocillium lilacinum* para el anteriormente conocido como *Paecilomyces lilacinus*, especie que según Luangsa-ard *et al.* (2011) cuando es usado en altas concentraciones representa un riesgo para la salud en humanos inmuno-comprometidos. Por lo anterior, este material se debe manejar con reserva ya que se requieren

realizar más investigaciones que determinen los factores de patogenicidad en humanos (Luangsa-ard *et al.* 2011). El aislado RS-Ij006 corresponde a *Isaria javanica* (Friedrichs y Bally) (Samson y Hywell-Jones (Luangsa-ard *et al.* 2011) y sus secuencias están depositadas en el GenBank con las accesiones KF373690 y KF373691 (González *et al.* 2015). Este género, se le ha reubicado recientemente con el nuevo nombre de *Cordyceps* en una revisión posterior por Kepler *et al.* (2017). El nuevo nombre de *Isaria javanica* se indica en lo sucesivo como *Cordyceps javanica*. Los análisis evolutivos filogenéticos y moleculares de las secuencias obtenidas dio como resultado el árbol filogenético reflejado en la Figura 1. Las relaciones evolutivas de taxones se infirieron mediante el método del vecino más cercano (Saitou y Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 0.66904220. Se observó poca variabilidad entre los aislamientos de *B. bassiana*. El análisis separó los aislamientos de *B. bassiana* en un grupo y colocó el aislamiento D-1388 diferenciado de las accesiones *Isaria* (KF373690 y KF373691) y del aislamiento MK120858.1 *Purpureocillium* utilizado como grupo externo. Los números de accesión asignados en el GenBank, para cada secuencia de nucleótidos de los aislados analizados en este estudio fueron: MZ151175 (D-Bb1350); MZ151176 (D-P11388); MZ151177 (D-Bb1391); MZ151178 (D-Bb1392), MZ151179 (D-Bb1395), MZ151180 (D-Bb1397) MZ151181 (D-Bb1398), MZ151182 (D-Bb1399), MZ151183 (D-Bb1400), MZ151184 (D-Bb1401), MZ151185 (D-Bb1402), MZ151186 (D-Bb1405), MZ151187 (D-Bb1406), MZ151188 (D-Bb1412).

Con relación a la condición de aislados endémicos, por ser colectados afectando naturalmente poblaciones de *H. hampei* en la CNB, Rehner *et al.* (2006, p.18), en un amplio estudio filogenético de *B. bassiana*, establecieron que "la alta diversidad genética detectada en el ubicuo Neotropical AFNEO_1 geográfica y ecológicamente, sugiere que este linaje es endémico y está bien establecido en el Neotrópico".

Caracterización morfofisiológica. Los hongos aislados se depositaron en la colección de hongos entomopatógenos del Laboratorio de Entomología del Centro de Investigación Agropecuaria de Chiriquí con una réplica en la colección de referencia de hongos entomopatógenos de la Estación Experimental del IDIAP en Río Sereno.

Características macroscópicas. Los aislados de los hongos entomopatógenos correspondieron a 12 aislamientos nativos de *B. bassiana* (D-Bb1350, D-Bb1391, D-Bb1392, D-Bb1395, D-Bb1397, D-Bb1398, D-Bb1399, D-Bb1400, D-Bb1402, D-Bb1405, D-Bb1406, D-Bb1412) y un aislamiento nativo D-1388, correspondiente a *Purpureocillium lilacinum*.

BIOTECNOLOGIA

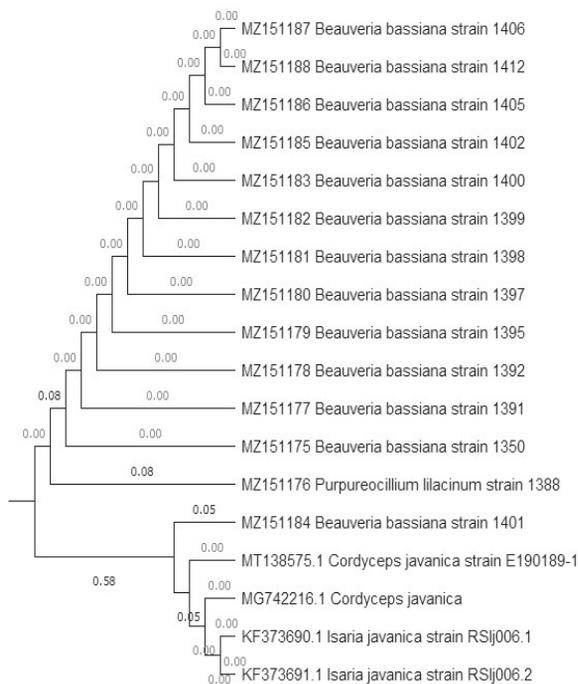


Figura 1. Análisis filogenético de vecino más cercano (NJ) de la región ITS (ITS1, 5.8S, e ITS2) para especies de *Beauveria* usando *Purpureocillium* como grupo externo. Números en las ramas indican valores de bootstrap después de 500 réplicas. MEGA, versión X.

La forma, el borde y el color de las colonias resultaron comunes a todos los aislados de *B. bassiana*. Todos presentaron colonias circulares, borde liso y color blanco (Gley 8/N según tabla Munsell) por el anverso (Figura 2). En cuanto a la elevación, se distribuyeron en tres tipos, desde plana a convexa, con situaciones intermedias referidas a la altura de los bordes y al tamaño de la elevación central. El aislado D-Bb1397 mostró ser variable en cuanto a la elevación ya que algunas colonias formaron anillos más elevados y otras, depresión central con crecimiento de altura irregular (e.g. D-Bb1397). En cuanto al aspecto de la superficie, la mayor parte de las colonias no presentaron irregularidades y sólo algunas (D-Bb1391, D-Bb1402, D-Bb1405) produjeron anillos concéntricos.

La apariencia de los aislados de *B. bassiana*, por el anverso y el reverso de las colonias mostraron características culturales similares en los tres medios evaluados. Los materiales correspondientes a *B. bassiana* presentaron un aspecto inicial algodonoso para luego convertirse pulverulento y superficie semi-elevada, coincidiendo con lo descrito para el género *Beauveria* por Vélez *et al.* (2001), y por Rodríguez y Del Pozo (2003).

En el reverso, el crecimiento micelial de *B. bassiana* fue tomando un color amarillento claro que fue más fuerte (5Y 8/5) en el medio MDA, intensidad media

(5Y 8/6), en el SDA y más pálido en el medio PDA (2.5Y 7/8). Adicionalmente se observó la formación de radios en el medio de SDA ligeramente marcados en algunos aislados de *B. bassiana* (D-Bb1350, D-Bb1398, D-Bb1399, D-Bb1405, D-Bb1406, D-Bb1412).

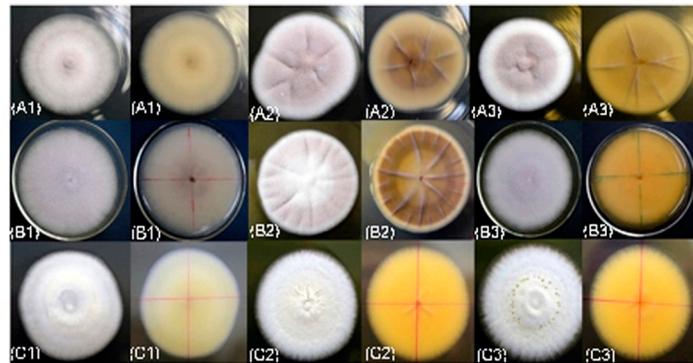


Figura 2. Características macroscópicas de los aislados del género *Cordyceps* (A), *Purpureocillium* (B) y *Beauveria* (C) en PDA (1), SDA (2) y MDA (3) en el anverso y reverso de los medios de cultivo.

Las características morfológicas de los aislados de *Beauveria*, correspondieron a lo reportado por Glare e Inwood (1998). Mientras que el color de los aislados de D-P11388 (*Purpureocillium*) en el lado anverso es rosáceo liláceo (10R 7/2), en contraste con el aislado RS-Cj006 (*Cordyceps*) que fue rosado pálido (10R 5/2); de aspecto friable y superficie plana, crecimiento concéntrico con cambio en la coloración diaria; inicialmente blanca para tornarse rosáceo pálido en 24 horas. Adicionalmente se observó la formación de radios muy marcados en el medio de SDA tanto en el anverso como en el reverso en los aislados D-P11388 (*Purpureocillium*), RS-Cj006 (*Cordyceps*) y muy atenuados en el reverso de *Beauveria* (Figura 2). Similarmente en el medio MDA, se presentó la formación de radios menos acentuada en el aislado RS-Cj006 (*Cordyceps*). La coloración por el reverso según tabla Munsell fueron para RS-Cj006 (*Cordyceps*): 5Y 8/2 en medio PDA, 10YR 6/2 en medio SDA, y 10YR 5/4 en MDA; y para D-P11388 (*Purpureocillium*): 5Y 8/2 en PDA, 10YR 5/8 en SDA, y 10YR 4/6 en MDA.

Crecimiento lineal. Los aislamientos D-P11388 y el RS-Ij006 mostraron un crecimiento significativamente ($p < 0.0001$) mayor que los aislados de *B. bassiana*. El aislado D-P11388 fue el que presentó mayor crecimiento con 4.53 mm día⁻¹ seguida por la RS-Ij006 con 1.93 mm día⁻¹, mientras que los valores obtenidos por los aislados de *B. bassiana* estuvieron en el rango 1.1 a 1.62 mm día⁻¹ (Cuadro 1). El crecimiento lineal es un indicativo de la habilidad del hongo para invadir los sustratos donde crece (Montesinos-Matías *et al.* 2011), por lo que esta capacidad competitiva se puede considerar una característica deseable.

BIOTECNOLOGIA

Cuadro 1. Diámetro de la colonia y crecimiento radial de los aislados de hongos entomopatógenos medio PDA

Aislado	Diámetro de la colonia (mm) ^{1/}	Crecimiento radial (mm día ⁻¹) ^{2/}
D-PI1388	87.97 a	4.53 a
RS-Ij006	42.05 b	1.93 b
D-Bb1392	32.05 c	1.10 f
D-Bb1397	31.66 cd	1.54 f
D-Bb1400	31.62 cd	1.23 f
D-Bb1391	31.33 cde	1.43 f
D-Bb1402	30.66 cdef	1.52 f
D-Bb1399	30.52 cdef	1.61 f
D-Bb1398	30.43 cdef	1.54 f
D-Bb1406	29.46 cdef	1.51 f
D-Bb1395	29.23 def	1.51 ef
D-Bb1350	28.42 fg	1.62 cde
D-Bb1412	26.41 gh	1.57 c
D-Bb1405	25.57 h	1.47 cd

¹/CV = 32.73 % ²/CV = 8.17 %

Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Tukey (0.05).

El diámetro de las colonias de los aislados de *B. bassiana* en SDA osciló entre 21.98 mm y 32.1 mm, con un promedio de crecimiento de 27.8 mm. El crecimiento lineal promedio de *B. bassiana* fue de 1.49 mm día⁻¹, mientras que para RS-Ij006 (*Cordyceps javanica*) fue de 1.93 mm día⁻¹ y 4.53 mm día⁻¹ para el aislado D-PI1388 (*P. lilacilum*) (Cuadro 3). Estos resultados son similares a los reportados por Elósegui *et al.* (2003), quienes encontraron para *B. bassiana*, diámetros de la colonia que oscilaron entre 25 mm y 31 mm, y promedios de crecimiento lineal de 1.56 mm a 1.93 mm. De acuerdo con Mugnai *et al.* (1989), la edad del cultivo y sustrato de crecimiento determinan en gran medida las características morfológicas de los aislados. También se

ha reportado que el desbalance entre las fuentes carbonatadas y nitrogenadas es el principal factor que afecta el crecimiento del hongo (Elósegui *et al.* 2003). Así, cuando las fuentes que aportan nitrógeno (N) en el medio (ejemplo el extracto de levadura) están dos o más veces concentradas con respecto a la fuente carbonatada (ejemplo la dextrosa), se estimula el crecimiento micelial (Jenkins y Prior, 1993).

La mayor capacidad potencial de dispersión se observó en el género *Purpureocillium* con el mayor promedio ($p < 0.001$), de 4.1 mm día⁻¹ (Figura 3b), seguido por *Cordyceps* con 2.12 mm día⁻¹, mientras que los aislados de *Beauveria* tuvieron el menor promedio de crecimiento lineal con 1.49 mm día⁻¹. Estas diferencias ($p < 0.0001$), también se observaron al comparar por género el diámetro de la colonia al décimo día de crecimiento (Figura 3a), se observaron diferencias significativas destacándose el género *Purpureocillium* con 87.97 mm, seguido por el género *Cordyceps* con 42.05 mm y *Beauveria* con 29.7 mm.

Características microscópicas

Tamaño y forma de conidias. Las conidias de los 12 aislados son lisas, globosas a ovoides; de acuerdo con esta forma, tamaño, así como también al raquis en forma de “zigzag”, fueron caracterizadas morfológicamente pertenecientes a la especie *B. bassiana* (Figura 4).

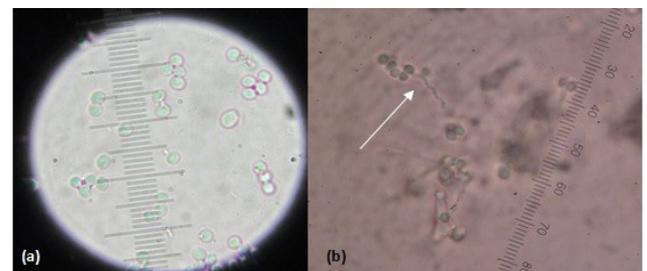


Figura 4. Conidias(a) y conidióforo en forma de raquis-100x (b) de *B. bassiana*-40x.

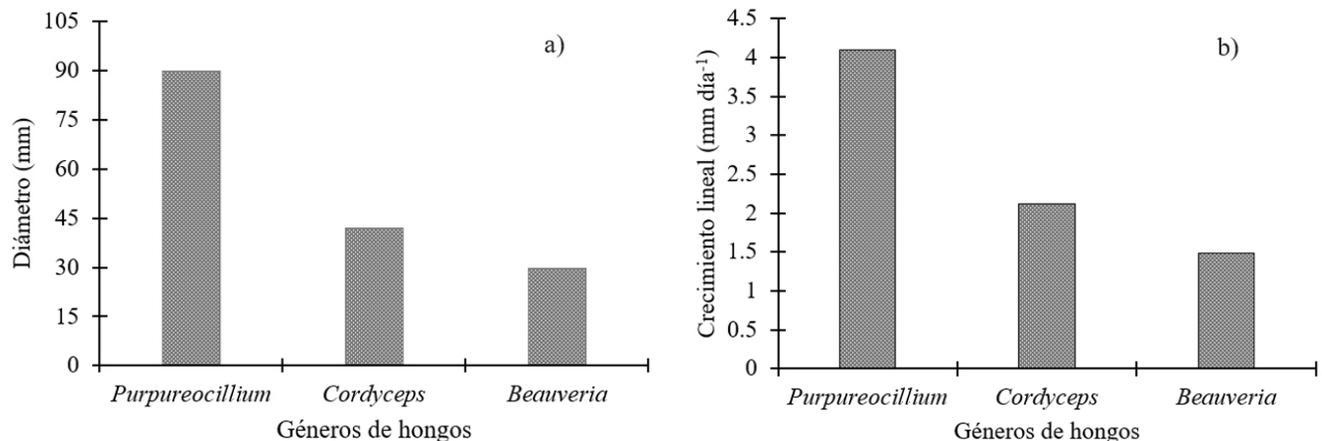


Figura 3. Diámetro (mm) de las colonias (a) y crecimiento radial (mm día⁻¹) (b) por género al décimo día de crecimiento.

BIOTECNOLOGIA

En el Cuadro 2 se observa que el tamaño de las conidias osciló en 1.2-3.0 x 1.0-2.8 µm. Este tamaño es reportado por diversos autores para *B. bassiana* (Kepler, 2017; Glare e Inwood 1998), quienes, luego de comparar diversas cepas de especies de *Beauveria*, provenientes de diferentes países, concluyeron que las cepas con conidias esféricas y menores de 3 µm de diámetro pueden ser consideradas como *B. bassiana* (French y Hebert, 1982; Glare e Inwood, 1998, Vélez *et al.* 2001; Kepler 2017).

Para el aislado D-1388 la variación fue de 4.1-10.2 x 1.1-3.8 µm. y para el RS-Ij006 de 4.8-6.2 x 1.1-1.6 µm; ambas de forma fusoides alargadas. Inicialmente por la forma de las conidias, se encontró coincidencia con lo descrito para el género *Cordyceps* (= *Isaria*), sin embargo, el aspecto de la colonia difería con el del aislado RS-Ij006. En la Cuadro 3 se observan los promedios del largo y ancho de las esporas para cada uno de los aislados.

Cuadro 2. Dimensiones (µm) de las conidias de los aislados de hongos entomopatógenos caracterizados

Aislados	Largo (µm)		Ancho (µm)		Promedio	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	largo	ancho
RS-Ij006	4.8	6.2	1.1	1.6	5.46	1.33
D-P11388	4.1	10.2	1.1	3.8	6.94	2.52
D-Bb1350	1.7	2.8	1.5	2.7	2.24	2.07
D-Bb1391	1.7	2.8	1.5	2.6	2.23	2.07
D-Bb1392	1.6	2.8	1.4	2.6	2.26	2.09
D-Bb1395	1.9	2.8	1.7	2.6	2.20	2.03
D-Bb1397	1.7	2.6	1.5	2.4	2.23	2.05
D-Bb1398	1.7	2.8	1.5	2.6	2.24	2.07
D-Bb1399	1.7	2.7	1.6	2.5	2.19	2.03
D-Bb1400	1.8	2.8	1.6	2.6	2.20	2.04
D-Bb1402	1.7	2.8	1.5	2.6	2.22	2.03
D-Bb1405	1.7	2.7	1.5	2.5	2.18	2.01
D-Bb1406	1.7	2.6	1.5	2.4	2.17	2.00
D-Bb1412	1.9	2.7	1.7	2.5	2.19	2.03

Con respecto al género (Cuadro 3), se observaron diferencias significativas entre los tres géneros estudiados ($p < 0.001$) para las variables ancho y largo de conidias; siendo *Purpureocillium* el género que presentó el mayor largo (6.94 µm), seguido por *Cordyceps* con 5.46 µm y *Beauveria* con 2.21 µm.

Cuadro 3. Dimensiones de las conidias de los géneros de hongos entomopatógenos caracterizados

Género	Promedio dimensiones (µm)	
	Largo	Ancho
<i>Cordyceps</i>	5.46 a	1.33 a
<i>Purpureocillium</i>	6.94 b	2.54 b
<i>Beauveria</i>	2.21 c	2.04 c

Medias con una letra común en una misma columna no son significativamente diferentes, Tukey (0.05).

Concentración de conidias. Los promedios de las concentraciones de conidias de los aislados del género *Beauveria* variaron de 10.46 a 11.13 x 10¹² conidios cm⁻² sin ser estadísticamente diferentes entre sí ($p > 0.05$), siendo los aislados D-Bb1397 y el D-Bb1392 los que presentaron el mayor promedio, con 11.13x10¹² cm⁻² y el aislado D-Bb1395 con menor promedio de 10.46 x 10¹² cm⁻² (Cuadro 4). Estos valores fueron superiores a los observados para los géneros *Cordyceps* y *Purpureocillium*.

Cuadro 4. Concentración de conidias producidas (cm⁻²) de los aislados de hongos entomopatógenos

Aislado	Concentración promedio (cm ⁻²)	Medio de cultivo		
		PDA	MDA	SDA
D-Bb1397	11.13 a	9.68	10.16	13.56
D-Bb1392	11.13 a	9.22	10.50	13.67
D-Bb1399	10.94 a	9.66	9.66	13.50
D-Bb1391	10.90 a	9.59	9.87	13.25
D-Bb1350	10.87 a	9.44	9.53	13.64
D-Bb1412	10.83 a	9.43	9.51	13.56
D-Bb1402	10.76 a	8.62	10.24	13.41
D-Bb1405	10.75 a	9.13	9.59	13.53
D-Bb1406	10.74 a	9.15	9.49	13.59
D-Bb1398	10.67 a	9.06	9.54	13.41
D-Bb1400	10.67 a	9.15	9.79	13.07
D-Bb1395	10.46 a	8.06	9.76	13.56
RS-Ij006	2.27 b	1.01	1.99	3.80
D-P11388	1.63 b	1.32	1.63	1.93

PDA: Papa Dextrosa Agar, MDA: Malta Dextrosa Agar, SDA: Sabourad Dextrosa Agar / Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Tukey (0.05).

El género *Beauveria* produjo significativamente ($p < 0.001$) la mayor concentración de conidias (10.82 cm⁻²) seguido por *Cordyceps* (RS-Ij006) con 2.27 cm⁻² y *Purpureocillium* (D-P11388) con promedio de 1.63 cm⁻² sin ser los dos últimos diferentes entre sí ($p > 0.05$). La mayor concentración de conidias obtenida por los aislados de *Beauveria*, sugiere que esta característica ha sido desarrollada para compensar su relativo lento crecimiento radial.

BIOTECNOLOGIA

Cuadro 5. Concentración (N° conidias cm⁻²) de géneros de hongos entomopatógenos

Género	Concentración (N° conidias cm ⁻²)	Medio de cultivo		
		PDA	MDA	SDA
<i>Beauveria</i>	10.82 a	9.21	9.79	13.45
<i>Cordyceps</i>	2.27 b	1.01	1.99	3.80
<i>Purpureocillium</i>	1.63 b	1.32	1.63	1.93
CV	7.73 %			

PDA: Papa Dextrosa Agar, MDA: Malta Dextrosa Agar, SDA: Sabourad Dextrosa Agar / medias con una letra común no son significativamente diferente.

Mortalidad de *H. hampei*. En 60 % de los aislados la mortalidad fue superior a 70 % (Cuadro 6). Con base en la mortalidad evaluada a los 15 días después de la inoculación, se determinó que los mejores tratamientos fueron RS-Ij006 y D-Bb1400, con 100 % de mortalidad, seguidos por D-Bb1398, con 98.9 %, indicando la presencia de aislamientos más eficaces que otros.

Al evaluar el TL₅₀ se observó que los aislados D-P11388 y RS-Ij006 causaron el 50 % de mortalidad en menor tiempo, con 3.52 días y 3.98 días; seguidos por los aislados D-Bb1350 con 6.58 días; D-Bb1400 con 7.86 días y D-Bb1398 con 8.43 días. Los demás aislamientos requirieron de un tiempo de 11 días o más para eliminar el 50 % de la población (Cuadro 6).

Velocidad de germinación. Los aislamientos registraron un TG₅₀ de entre 9.38 y 14.75 horas; siendo clasificados en tres grupos: TG₅₀ corto, para los aislamientos RS-Ij006 y D-P11388 con 9.45 y 9.38; TG₅₀ intermedio para D-Bb1400, D-Bb1402, D-Bb1405, D-Bb1398, D-Bb1350, que oscilaron entre 13.97 y 14.12 horas y TG₅₀ largo para los demás, que oscilaron entre 14.68 a 14.75 horas. Según Shah *et al.* (2005), la velocidad de germinación es una de las determinantes de virulencia más reportadas. Los valores de TG₅₀ que se reportan en este estudio son similares a los reportados por Díaz y Leucona (1995) con aislados de *Beauveria* colectados en diferentes regiones de Argentina, los que oscilaron entre 12h 10 min y 20h 4 min. Por otra parte, Montesinos-Matías *et al.* (2011), indican que, una germinación lenta hace a los HEP sean más sensibles a las variaciones ambientales, mientras que una rápida germinación les confiere mayor probabilidad de éxito en campo.

Cuadro 6. Mortalidad, TL₅₀ y TG₅₀ de los aislados de hongos entomopatógenos afectando insectos de la broca del café (*Hypothenemus hampei*)

Aislado	Mortalidad (% a los 15 días)	TL ₅₀ (días)	TG ₅₀ (horas)
RS-Cj006	100.00	3.98	9.45
D-P11388	80.00	3.52	9.38
D-Bb1350	93.30	6.58	14.12
D-Bb1391	63.30	11.61	14.75
D-Bb1392	40.00	17.29	14.72
D-Bb1395	43.30	18.49	14.68
D-Bb1397	53.30	15.05	14.71
D-Bb1398	98.90	8.43	14.05
D-Bb1399	66.70	11.93	14.74
D-Bb1400	100.00	7.86	13.99
D-Bb1402	86.70	11.38	14.01
D-Bb1405	83.30	11.57	14.03
D-Bb1406	70.00	11.73	14.68
D-Bb1412	50.00	16.10	14.74

CONCLUSIONES

Se diferenciaron aislados nativos de hongos, mediante la caracterización morfofisiológica y molecular. Los aislados de *B. bassiana* D-Bb1400, D-Bb1350 y D-Bb1398, presentaron alto potencial patogénico para el control de *H. hampei*, alta producción de conidias y buen Tiempo de Germinación Medio por lo que pueden ser incorporados como parte de una estrategia de Manejo Agroecológico de la broca del café.

El conjunto de aislados de *B. bassiana* mostraron diferencias entre sí en cuanto a la mortalidad de *H. hampei*, no obstante, el análisis filogenético no muestra variación genética, ubicándolas en un mismo grupo. Esto abre perspectivas para estudios posteriores de búsqueda de marcadores moleculares específicos que distingan estas cepas correlacionándolas con su potencial de mortalidad.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Laboratorio de Investigaciones Botánicas-Herbario de la Escuela de Biología de la Universidad Autónoma de Chiriquí (UNACHI) y a la doctora Tina Hoffman por su apoyo en el procesamiento preliminar de los aislados obtenidos. Al INDICASAT y al doctor Luis Mejía y su equipo de trabajo, por su colaboración para el procesamiento de las secuencias. Se agradece al productor José Gallardo por compartir sus conocimientos, por la atención brindada y permitir la colecta de muestras en sus cafetales. A los revisores por sus valiosos aportes para mejorar el documento.

BIOTECNOLOGIA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carrillo-Rayas, M. T., y Blanco-Labra, A. (2009). Potencial y algunos de los mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga. *Acta Universitaria*, 19(2), 40-49. <https://www.redalyc.org/pdf/416/41611810005.pdf>
- Castillo, S., Bernal, J. A., Lezcano, J., Piepenbring, M., y Cáceres, O. (2013). Hongos entomopatógenos asociados a insectos recolectados en plantaciones de café en el oeste de Panamá. *Tecnociencia*, 15(2), 29-39. <https://revistasvip.up.ac.pa/index.php/tecnociencias/article/view/966/954>
- Díaz, B. M., y Lecuona, R. E. (1995). Evaluación de cepas nativas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* Bals (Vuill.) (Deuteromicotina) como base para la selección de bioinsecticidas contra el barrenador *Diatraea saccharalis* (F.). *Agriscientia*, (12), 33-38. <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/agris/article/view/2450/1396>
- Elósegui, O., Nieves, N., Raysa Díaz, R., Bel Padrón, N., y Carr, A. (2003). Comportamiento del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. cepa lbb-1 en Agar sabouraud dextrosa producido en Cuba. *Fitosanidad*, 7(2), 49-53.
- French, E., y Hebert, T. (1982). *Métodos de investigación fitopatológica*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A8740e/A8740e.pdf>
- Glare, T. R., y Inwood, A. J. (1998). Morphological and genetic characterization of *Beauveria* spp. from New Zealand. *Mycological Research*, 102(2), 250-256.
- González Dufau, G.I., Caballero, S., Contreras, G., Vergara, G., y Mejía, L. C. (2015). Caracterización morfológica y molecular del aislado endémico RS006, biocontrolador de *Hypothenemus hampei* en Panamá. *Revista Ciencia Agropecuaria*, (22), 78-85. <http://www.revistacienciaagropecuaria.ac.pa/index.php/ciencia-agropecuaria/article/view/166/131>
- González-Dufau, G. I., Santamaría Guerra, J., Torres, L., Santo, U., y Sanjur, M. (2018). Manejo ecológico de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) en Cerro Tula, comarca Ngäbe-Buglé, Panamá. *Cadernos de Agroecología*, 13(1). <http://cadernos.aba-agroecologia.org.br/index.php/cadernos/article/view/1713/1125>
- Instituto Nacional de Estadística y Censo. (2011). *VII Censo Nacional Agropecuario, 2011. Resultados Finales Básicos*. https://www.inec.gob.pa/publicaciones/Default3.aspx?ID_PUBLICACION=364&ID_CATEGORIA=15&ID_SUBCATEGORIA=60
- Jenkins, N. E., y Prior, C. (1993). Growth and formation of true conidia by *Metarhizium flavoviride* in a simple liquid medium. *Mycological Research*, 97(12), 1489-1494.
- Kepler, R. M., Luangsa-ard, J. J., Hywel-Jones, N. L., Quandt, A., Sung, G. H., Stephen, A., y Shrestha, B. (2017). A phylogenetically-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales). *IMA FUNGUS*, 8(2), 335-353. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2017.08.02.08>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., y Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Leucona, R. E. (1996). *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*. Talleres Gráficos Mariano
- Lezcano, J. A., Saldaña, E., Ruiz, R., y Caballero, S. (2015). Patogenicidad y virulencia del aislado de la cepa nativa de *Isaria* spp. y dos hongos entomopatógenos comerciales. *Ciencia Agropecuaria*, (23), 20-38. <http://www.revistacienciaagropecuaria.ac.pa/index.php/ciencia-agropecuaria/article/view/120/85>
- Luangsa-ard, J., Houbraken, J., VanDoorn, T., Seung-Beom, H., Borman, A. M., Hywel-Jones, N. L., y Samson, R. A. (2011). *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinum*. *FEMS Microbiol Letter*, 321(2), 141-149. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02322.x>
- Montesinos-Matías, R., Viniegra-González, G., Alatorre-Rosa, R., Gallardo-Escamilla, F., y Loera, O. (2011). Variación de fenotipos de crecimiento y virulencia en cepas mutantes de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Resistentes a 2-desoxi-d-glucosa. *Agrociencia*, 45(8), 929-942. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952011000800006&lng=es&nrm=iso
- Motta-Delgado, P. A., y Murcia-Ordoñez, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente y Agua an Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 6(2), 77-90. <http://doi.org/10.4136/ambi-agua.187>
- Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas*, (63), 95-103. <http://www.bio-nica.info/biblioteca/Monzon2001HongoEntomopatogenos.pdf>
- Monzón, A. (2007). *Insect pathogenic fungi in Hypothenemus hampei, and Leucoptera coffeella in the soil in coffee plantations in Central America: Natural occurrence, management system and genetic diversity* [Tesis doctoral]. Norwegian University of Life Sciences.
- Mugnai, L., Bridge, P. D., y Evans, C. A. (1989). A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*. *Mycological Research*, 92(2), 199-209. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(89\)80012-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(89)80012-7)
- Munsell Color. (2000). *Munsell soil color charts*. Munsell color Baltimore.
- Nei, M., y Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press
- Palacio, E., Santamaría-Guerra, J., Torres, L., Sánchez, E., y González-Dufau, G.I. (2014). *Manejo agroecológico de plagas y enfermedades del cultivo de café (Coffea arabica y Coffea canephora) en la comarca Ngäbe-Buglé. Informe Técnico Anual Plan Operativo Anual 2014*. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá.

BIOTECNOLOGIA

- Rehner, S. A., Posada, F., Buckley, E. P., Infante, F., Castillo, A., y Vega, F. (2006). Phylogenetic origins of African and neotropical *Beauveria bassiana*s. *l. pathogens of the coffee berry borer; Hypothenemus hampei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93(1), 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.04.005>
- Rodríguez Dos Santos, A., y Del Pozo, E. (2003). Aislamiento de hongos entomopatógenos en Uruguay y su virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum* West. *Agrociencia*, 7(2), 71-78. <http://www.fagro.edu.uy/~agrociencia/index.php/directorio/article/view/374/293>
- Saitou, N., y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sarandón, S. J. (2020). *Biodiversidad, agroecología y agricultura sustentable*. Editorial de la UNLP. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/109141/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Seifert, K., Morgan-Jones, G., Gams, W., y Kendrick, B. (2011). *The Genera of Hyphomycetes*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre; Utrecht, The Netherlands.
- Shah, F. A., Wang, C. S., y Butt, T. M. (2005). Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Lett*, 251(2), 259-266. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.010>
- Téllez-Jurado, A., Cruz Ramírez, M. G., Mercado Flores, Y. A., Torres, A., y Arana-Cuenca, A. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista mexicana de micología*, (30), 73-80. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802009000200007
- Vázquez, L. L. (2005). *Experiencia cubana en el manejo agroecológico de plagas en café y avances en la broca del café* [Presentación de paper]. Simposio sobre Situación Actual y Perspectivas de la Investigación y Manejo de la Broca del Café en Costa Rica, Cuba, Guatemala y México. México. <https://www.researchgate.net/publication/286626732>
- Vélez, P., Estrada, A. N., González, M. T., Valderrama, A. M., y Bustillo, A. E. (2001). Caracterización de aislamientos de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. *Manejo Integrado de Plagas*, (62), 38-53. <http://www.sidalc.net/REPDOC/A2113E/A2113E.PDF>