

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL AISLADO ENDÉMICO RS006, BIOCONTROLADOR DE *Hypothenemus hampei* EN PANAMÁ¹

**Gladys González Dufau²; Sindy Caballero³;
Grace Contreras⁴; Gloribel Vergara⁵; Luis C. Mejía⁶**

RESUMEN

El control de la broca del café, *Hypothenemus hampei*, mediante el uso indiscriminado de insecticidas orgánicos sintéticos puede traer como consecuencia la selección de individuos resistentes, el surgimiento de nuevas plagas, la contaminación ambiental y problemas de salud humana. Para el manejo agroecológico de plagas y en estudios epidemiológicos, la identificación taxonómica de las especies es fundamental, lo cual se facilita con el empleo de técnicas moleculares con altos niveles de confiabilidad, sensibilidad y prontitud. Este trabajo es el primer reporte del hongo *Isaria javanica* (Friedrichs y Bally) Samson y Hywell-Jones en Panamá y su actividad como biocontrolador de la broca del café. Se presentan los resultados del estudio de identificación morfológica y molecular del aislado obtenido a partir de *Trialeurodes vaporariorum* en la naturaleza y RS006b (reaislado de *H. hampei* en condiciones de laboratorio). Para la identificación morfológica se utilizó microscopía de estructuras de reproducción y claves dicotómicas; la caracterización molecular de los aislados se realizó mediante secuenciación de la región ITS (ITS 1 y 2 incluyendo 5,8 S) y comparación con la base de datos GenBank. Tanto la secuencia de ADN obtenida del hongo aislado colectado en la naturaleza (RS006a), así como la del aislado que se obtuvo causando la muerte de brocas adultas en el bioensayo de eficacia biológica sobre *H. hampei* (RS006b), confirmaron que se trataba de la misma especie: *I. javanica* con capacidad de infectar individuos adultos de la broca del café. Estas secuencias de ADN resultaron idénticas a las de *I. javanica* CBS134.22 (Accesión GenBank: KM234218.1), lectotipo de la especie.

PALABRAS CLAVES: Hongo entomopatógeno nativo, agroecosistema, biodiversidad local, control biológico.

¹Recepción: 26 de noviembre de 2014. Aceptación: 19 de marzo de 2015. La investigación se realizó como parte del proyecto FID007-044: Caracterización molecular de hongos entomopatógenos para su uso en el control de la broca de café en Panamá, con el financiamiento de la Secretaría Nacional de Ciencias, Tecnología e Innovación (SENACYT).

²M.Sc. en Entomología. IDIAP. Centro de Investigación Agropecuaria Occidental (CIAOc). e-mail: ggdufau@gmail.com

³Téc. Agropecuario. IDIAP. CIAOc.

⁴Lic. en Biología. IDIAP. CIAOc.

⁵Lic. en Biología. Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales (STRI) – Panamá. Apartado 0843-03092, Balboa, Ancón, República de Panamá.

⁶Ph.D. en Biología y Patología de Plantas. STRI – Panamá.

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE ENDEMIC ISOLATED RS006, BIOCONTROLLER OF *Hypothenemus hampei* IN PANAMA

ABSTRACT

The control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, by the indiscriminate use of synthetic organic insecticides can result in the selection of resistant individuals, the emergence of new pests, environmental contamination and human health problems. For agroecological pest management and epidemiological studies, taxonomic species identification is critical. This is enabled by the use of molecular techniques with high levels of reliability, sensitivity and promptness. This paper is the first report in Panama about *Isaria javanica* (Friedrichs and Bally) Samson and Hywell-Jones, its activity as a bio controller of the coffee berry borer. The results of the morphological and molecular identification of the obtained isolate from *Trialeurodes vaporariorum* in nature and RS006b (reisolated from *H. hampei* in laboratory conditions) are presented. Microscopy of reproductive structures and dichotomous keys were used for morphological identification; the molecular characterization of the isolates were performed by sequencing the ITS region (ITS 1 and 2 including 5.8 S) and comparison with the database GenBank. Both, the obtained sequence from the isolated fungus originally from nature (RS006a) and the obtained isolate killing adult bits in the bioassay biological effectiveness on the coffee berry borer (*H. hampei*) (RS006b) confirmed that it was the same species: *I. javanica* with ability to infect adult individuals of the coffee berry borer. These sequences resulted to be identical to the ones from *I. javanica* culture CBS134.22 (KM234218.1 Genbank accessesion number), the lectotype of the species.

KEY WORDS: Native entomopathogenic, agroecosystem, local biodiversity, biological control.

INTRODUCCIÓN

La broca del fruto del café *Hypothenemus hampei* Ferrari es una plaga que está presente en Panamá desde junio del 2005 cuando se reportó por primera vez (MIDA 2005) y está considerada como la principal plaga insectil en todos los países productores de café (Vega *et al.* 2009). Este insecto tiene la forma de un diminuto gorgojo, produce el daño al atacar el fruto del café y se reproduce internamente en el

endospermo, causando la pérdida total del grano y, en algunos casos, su caída prematura, además del deterioro de la calidad del producto final (Bustillo 2006).

El control de esta plaga mediante el uso indiscriminado de insecticidas orgánicos sintéticos puede traer como consecuencia la selección de individuos resistentes, el surgimiento de nuevas plagas y la contaminación ambiental y humana.

En los ecosistemas se encuentran de manera natural organismos con funciones biocontroladoras de plagas, que por desconocimiento, se han estado afectando de manera indiscriminada mediante la práctica de la agricultura convencional (Devine *et al.* 2008, Altieri y Toledo 2011, Cortés 2011, Koohafkan y Altieri 2015).

En la búsqueda de prácticas amigables, con el ambiente y la salud humana, es imprescindible la comprensión de las funciones del ecosistema para su restauración y utilización mediante formas alternativas de agricultura (Altieri y Toledo 2011). En el caso de los hongos entomopatógenos, significa determinar su identidad genética y filogenia, comprender su biología, su interacción con otras formas de vida y comprobar su virulencia específica que le confiere su actividad enzimática y su capacidad de asimilar sustratos presentes en el hospedero y en el ambiente (González *et al.* 2013). Sin este conocimiento básico será prácticamente imposible el desarrollo de biopreparados efectivos, estables y confiables para la salud humana.

Para el manejo agroecológico de plagas y en estudios epidemiológicos la identificación exacta de las especies es fundamental, lo cual se facilita con el empleo de técnicas moleculares para su

diferenciación y caracterización con altos niveles de confiabilidad, sensibilidad y prontitud, si se cuenta con los equipos apropiados.

Esta investigación responde a la búsqueda de métodos alternativos para el control de plagas, mediante el uso de enemigos naturales de la broca del café, tales como los hongos entomopatógenos, por lo que se reporta como parte de la biodiversidad local, la presencia del aislado de *Isaria javanica* (Friedrich y Bally) Samson y Hywell-Jones (Fungi: Sordariomycetes) perteneciente a la familia Cordycipitae y División Hypocreales. El mismo fue aislado de un cadáver de adulto de la mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*) encontrado sobre el cultivo de tomate, *Solanum lycopersicum* L. (GRIN 2013), bajo techo en la localidad de Cordillera, distrito de Boquerón, provincia de Chiriquí - Panamá, a una altitud de 930 msnm y posición geográfica 17P 0322815 UTM 0960183 que se encuentra en la zona de vida Bosque Pluvial Premontano (Holdridge 1987).

El hallazgo local coincidió con el reporte de Scorsetti *et al.* (2006) en Argentina quienes encontraron a *Isaria* parasitando mosca blanca. El aislado se depositó en el cepario del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP) ubicado en el laboratorio de

Agentes Biocontroladores de la Estación Experimental de Río Sereno (EERS), provincia de Chiriquí y le fue asignado el código secuencial RS006. Se utilizó en pruebas de patogenicidad con diferentes aislados de la colección de IDIAP, para evaluar su potencial biocontrolador sobre la broca del café.

Este reporte presenta los resultados de la identificación morfológica y caracterización molecular de los aislados RS006a y RS006b, los cuales se encontraron afectando naturalmente la mosca blanca de los invernaderos y a la broca del café en condiciones de laboratorio.

Colecta, desinfección y aislamiento:

Una vez en el laboratorio, el cadáver de adulto de la mosca blanca (*T. vaporariorum*), se desinfectó en hipoclorito de sodio (0,5% del producto activo) durante cinco minutos; se enjuagó cuatro veces con agua destilada estéril, posteriormente se colocó en papel de filtro estéril en una placa Petri esterilizada, se agregó agua destilada estéril y fue sellada la placa con parafilm, manteniéndola en incubación a 20°C. Transcurridos siete días, mediante el uso de la cámara de flujo laminar, se transfirió con un asa de siembra, una pequeña porción del crecimiento fungoso al medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA por sus siglas en inglés) para su

aislamiento y purificación siguiendo protocolos establecidos (Leucona 1996).

Identificación morfológica y molecular:

Con base a sus características morfológicas al microscopio (Figura 1) y con ayuda de las claves dicotómicas de Humber (2005) y Barnett y Hunter (1998), y el análisis molecular de secuencias en el Laboratorio de Biología Molecular del Smithsonian, Naos Panamá, se realizó la identificación de dos aislamientos: RS006a (colectado en la naturaleza afectando *T. vaporariorum*) y RS006b (reaislado de *H. hampei* en condiciones de laboratorio) (Cuadro 1).

Los aislamientos se cultivaron en medio PDA y se mantuvieron a temperatura ambiente promedio (22°C). Para evitar la contaminación por bacterias, los aislados se sembraron en PDA más Rifampicina (0,025 mg/ml) para obtener cultivos puros. Adicional, se realizó microcultivos, lo que permitió observar las estructuras reproductivas con mayor facilidad bajo el microscopio (Cuadro 1).

La caracterización molecular se realizó mediante secuenciación de la región ITS (ITS 1 y 2 incluyendo 5.8 S) y mediante comparación de las mismas, con secuencias en la base de datos del GenBank. El cultivo RS006 es 100% idéntico a *I. javanica* CBS134.22 (cultivo

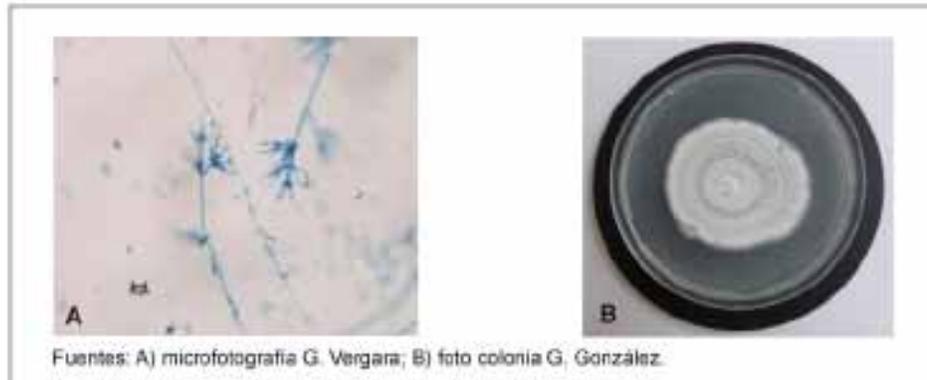


Figura 1. Características microscópicas y macroscópicas de *Isaria javanica*.
 A) Microfotografía de conidióforos y conidias de *I. javanica*;
 B) Morfología de las colonias de *Isaria javanica*.

CUADRO 1. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE LOS AISLADOS DE RSS006a y RSS006b.

Característica	Aislado colectado en la naturaleza (RS006a)	Reaislado de <i>H. hampei</i> en condiciones de laboratorio (RS006b)
Forma de las Conidias	Fusoides largas, Ovoides largas,	Fusoides largas, Ovoides largas,
Dimensión de las Conidias en μm (LxA, \bar{x} , n=50)	2,70-5,16 x 0,37-1,17, 4,04-0,81	3,33-5,93 x 0,37-1,48, 4,50-0,98
Color de la colonia	Crema y/o chocolate claro	Crema y/o chocolate claro
Superficie	Terrosa	Terrosa
Forma de la colonia	Circular	Circular
Elevación	Umbonada	Umbonada
Margen	Ondulado	Ondulado
Consistencia	Friable	Friable
Hospedero	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	<i>Hypothenemus hampei</i>

tipo) para la región ITS; lo cual concluyó que el aislado RS006 corresponde a *Isaria javanica* (Friedrichs y Bally) Samson y Hywell-Jones (Luangsa-ard *et al.* 2005) y pasa a denominarse RSIj006 y sus secuencias se depositaron en el GenBank con las accesiones KF373690 para el aislado RS006a y KF373691 para el aislado RS006b.

Tanto, la secuencia del hongo aislado y colectado originalmente en la naturaleza (RS006a), así como la del aislado que se obtuvo causando la muerte a brocas adultas en el bioensayo (RS006b), confirmaron que se trataba de la misma especie: *I. javanica* con capacidad de infectar individuos adultos de la broca del café.

El uso de hongos entomopatógenos para la lucha contra plagas insectiles es un componente importante de control, siendo una cantidad considerable de hongos mencionados en diversos estudios con este propósito.

Algunas especies de *Isaria*, como *I. fumosorosea*, *I. farinosa* e *I. tenuipes* se han estudiado como agentes de control biológico de insectos, hay preparaciones y productos comerciales de *I. fumosorosea* disponibles en algunos países (Specht *et al.* 2009).

Varios hongos entomopatógenicos hypocreales (Ascomycota) son reportados infectando la broca del café: *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin, *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fr. (anteriormente conocida como *Paecilomyces farinosus*), *Isaria fumosorosea* Wize (anteriormente conocida como *Paecilomyces fumosoroseus*), *Isaria lilacinus* (Thom) Sanson (anteriormente conocido como *Paecilomyces lilacinus*), *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare y Gams (anteriormente conocido como *Verticillium lecanii*), *Nomurae rileyi* (Farl.) Samson y *Ophiocordyceps entomorrhiza* (Dicks) Sung *et al.* (conocido anteriormente como *Hirsutella eleutheratorum*) (Bustillo *et al.* 1998, 2002, Vega *et al.* 1999, 2009).

Se reporta, por primera vez en Panamá, la especie *Isaria javanica* como biocontrolador de *H. hampei*, lo cual brinda una alternativa con potencial para incorporarse a los programas de manejo integrado de plagas en el país.

BIBLIOGRAFÍA

Altieri, M; Toledo, VM. 2011. The agroecological revolution of Latin America: rescuing nature, securing food sovereignty and empowering peasants. *The Journal of Peasant Studies* 38(3):587-612. Traducción de Pablo Alarcón-Chaires revisada por los autores. 34 p.

- Barnett, HL; Hunter, BB. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth edition. APS Press. St. Paul Minnesota. 218 p.
- Bustillo P, AE. 2006. Una revisión sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera:Curculionidae: Scolytinae), en Colombia. Revista Colombiana de Entomología 32(2):101-116.
- Bustillo, AE; Cárdenas R; Posada, FJ. 2002. Natural Enemies and Competitors of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in Colombia. Neotrop Entomol 31:635-63.
- Bustillo, AE; Cárdenas, R; Villalba, D; B. Benavides; Orozco, J; Posada, FJ.1998. Manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. Chinchiná, Cenicafé. 134 p.
- Cortés, N. H. 2011. Ventajas y desventajas de los insecticidas químicos y naturales (en línea). Trabajo para optar por el título de Licenciatura en Ingeniería Ambiental. Veracruz, México. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Químicas. 83 p. Consultado 3 feb. 2015.
- Disponble en <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/30882/1/CortesNicolas.pdf>.
- Devine, GJ; Eza, D; Ogusuku, E; Furlong, MJ. 2008. Uso de insecticidas: Contexto y consecuencias ecológicas. Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública 25(1):74:100.
- González D, GI; Caballero, S; Contreras, G; González, F; Mejía, LC. 2013. Caracterización Morfológica de Cepas Nativas de Hongos Entomopatógenos en Panamá. In 58 Reunión Anual de PCCMCA (Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos Animales). Memoria. Tegucigalpa, HN. p. 139.
- GRIN (Germplasm Resources Information Network). 2013. Taxonomy for Plants. United States department of Agriculture (en línea), Agricultural Research Service. Consultado 6 jun. 2013. Disponible en <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?22956>.
- Holdridge, LR. 1987. Ecología basada en zonas de vida. San José, Costa Rica: IICA. 216 p. (Colección y Libros y Materiales Educativos/IICA; no.83).

- Humber, RA. 2005. Entomopathogenic Fungal Identification (en línea). USDA-ARS. Consultado 6 jun. 2013. Disponible en <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/19070510/APSwkshoprev.pdf>.
- Koohafkan, P; Altieri, MA. 2015. Sistemas Importantes del Patrimonio Agrícola Mundial: Un Legado para el Futuro (en línea). Consultado 5 mar. 2015. Disponible en http://agroeco.org/wp-content/uploads/2011/03/GIAHS_Booklete_ES_Ir.pdf.
- Leucona, RE. 1996. Técnicas empleadas con hongos entomopatógenos. Capítulo 10. 143-150. *In* Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Leucona, RE. Ed. Buenos Aires, AR. 338 p.
- Luangsa-ard, JJ; Hywel-Jones, NL; Manoch, L; Samson, RA. 2005. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. *Mycological Research* 109:581-589. doi:10.1017/S0953756205002741.
- MIDA (Ministerio de Desarrollo Agropecuario). 2005. Dirección de Agricultura, Estadísticas Agropecuarias. Hoja informativa.
- Scorsetti, AC; Humber, RA; Gregorio, C De; López Lastra, CC. 2006. New records of entomopathogenic fungi infecting *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum*.
- Specht, A; Azevedo JL; Luna Alves Lima de, EA; Tomazzoni B, J; Kassawara M; Lorini LM; Monteiro Barros, N. 2009. Ocorrência do fungo entomopatogênico *Isaria javanica* (Frieder & Bally) Samson & Hywell-Jones (Fungi, Sordariomycetes) em lagartas de *Lonomia obliqua* Walker (Lepidoptera, Saturniidae, Hemileucinae). *Revista Brasileira de Entomologia* 53(3):493-494.
- Vega, FE; Infante F; Castillo F; Jaramillo J. 2009. The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): a short review, with recent findings and future research directions. *Terrestrial Arthropod Reviews* 2:129-147.
- Vega, FE; Mercadier, G; Damon, A; Kirk, A. 1999. Natural enemies of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae) in Togo and Cote d'Ivoire, and other insects associated with coffee beans. *Afr. Entomol.* 7:243