

Universidad de San Carlos de Guatemala  
Dirección General de Investigación  
Programa Universitario de Investigación  
Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas

Informe final

**“Bioprospección de hiperparásitos de *Hemileia vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café”**

Equipo de investigación

**Nombre del coordinador: Gustavo Adolfo Álvarez Valenzuela**

Nombre del Investigador: Soren Sherwood Ramírez Barillas

Nombre del Auxiliar de Investigación II: José Miguel Escobar Sandoval

Nombre del Auxiliar de Investigación II: Alba Marilia Noj Suruy

**27 de noviembre 2015**

Instituto de investigaciones agronómicas y ambientales (IIA)

Asociación de Reservas Naturales Privadas (ARNP)

M. Sc. Gerardo Arroyo Catalán  
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar  
Coordinador General de Programas

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar  
Coordinador Programas de Investigación

Ing. Agr. Gustavo Adolfo Álvarez Valenzuela  
Coordinador del proyecto

Ing. Agr. Soren Sherwood Ramírez Barillas  
Investigador

P. Agr. José Miguel Escobar Sandoval  
Auxiliar de Investigación II

Br. Alba Marilia Noj Suruy  
Auxiliar de Investigación II

Partida Presupuestaria

4.8.63.7.30

Año de ejecución: 2015

## Índice

<b>1. Introducción.....</b>	<b>- 3 -</b>
<b>2. Marco teórico y estado del arte .....</b>	<b>- 4 -</b>
2.1 Bioprospección de agentes de control biológico .....	- 4 -
2.2 Reserva Natural Privada (RNP).....	- 4 -
2.3 Biocontrol para el manejo de royas .....	- 4 -
2.4 Impacto de la roya sobre el cultivo de café en Guatemala .....	- 5 -
2.5 Roya del café ( <i>Hemileia vastatrix</i> Berk & Broome 1869) .....	- 5 -
<b>3. Hipótesis .....</b>	<b>- 10 -</b>
<b>4. Objetivos .....</b>	<b>- 10 -</b>
4.1 General.....	- 10 -
4.2 Específicos .....	- 10 -
<b>5. Materiales y métodos .....</b>	<b>- 11 -</b>
5.1 Descripción y delimitación en tiempo y espacio de la propuesta .....	- 11 -
5.2 Período de la investigación .....	- 11 -
5.3 Tipo de investigación.....	- 11 -
5.4 Técnicas e instrumentos.....	- 11 -
5.4.1.1 Localización geográfica y ubicación espacial de las muestras .....	- 12 -
5.4.1.2 Colecta de muestras .....	- 13 -
5.4.2.1 Determinación de hiperparásitos de la roya del café .....	- 13 -
5.4.2.2 Aislamiento y purificación de hiperparásitos .....	- 15 -
<b>6. Resultados .....</b>	<b>- 17 -</b>
6.1 Sitios de Muestreo.....	- 17 -
6.2 Agentes biocontroladores determinados .....	- 20 -
6.3 Prevalencia de biocontroladores .....	- 20 -
6.4 Índice de velocidad de crecimiento micelial (IVCM).....	- 21 -
6.5 Conteo de Conidiosporas .....	- 22 -
6.6 Análisis de la información .....	- 24 -
6.7 Conteo de conidiosporas.....	- 25 -
6.8 Matriz de resultados.....	- 27 -
6.9 Impacto esperado .....	- 27 -

<b>7. Análisis y discusión de resultados</b> .....	- 28 -
<b>8. Conclusiones</b> .....	- 30 -
<b>9. Referencias</b> .....	- 31 -
<b>10. Apéndice</b> .....	- 34 -
10.1 Análisis de la varianza de IVCM <i>C. hemileiae</i> .....	- 34 -
10.2 Análisis de la varianza de IVCM <i>L. lecanii</i> .....	- 35 -
10.3 Análisis de la varianza de la producción de conidiosporas <i>C. hemileiae</i> .....	- 36 -
10.4 Análisis de la varianza de la producción de conidiosporas <i>L. lecanii</i> .....	- 37 -
<b>11. Actividades de gestión, vinculación y divulgación</b> .....	- 38 -
<b>12. Orden de pago</b> .....	- 39 -

### Índice de figuras

Figura 1: A. <i>C. hemileiae</i> (micelio oscuro) parasitando <i>H. vastatrix</i> , B. Vista microscópica de <i>C. hemileiae</i> , se observa colapso de uredosporas de <i>H. vastatrix</i> .....	- 14 -
Figura 2: A. <i>L. lecanii</i> parasitando <i>H. vastatrix</i> B. Vista microscópica de <i>L. lecanii</i> sobre <i>H. vastatrix</i> .....	- 14 -
Figura 3: <i>Mycodiplosis sp.</i> alimentandose de <i>H. vastatrix</i> .....	- 15 -
Figura 4: Ubicación geográfica de sitios de muestreo en época seca y lluviosa del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de <i>H. vastatrix</i> en reservas naturales voluntarias con café, 2015 .....	- 19 -

### Índice de tablas

Tabla 1: Sitios de muestreo en época seca (marzo-mayo) durante la primera etapa del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de <i>H. vastatrix</i> en reservas naturales voluntarias con café, 2015.....	- 12 -
Tabla 2: Sitios de muestreo en época lluviosa (junio-septiembre) durante la segunda etapa del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de <i>H. vastatrix</i> en reservas naturales voluntarias con café, 2015.....	- 12 -
Tabla 3: Operacionalización de las variables .....	- 16 -
Tabla 4: Sitios de muestreo en época seca (marzo – mayo) y datos de ubicación geográfica, realizados durante la primera etapa del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de <i>H. vastatrix</i> en reservas naturales voluntarias con café, 2015.....	- 17 -
Tabla 5: Sitios de muestreo en época lluviosa (junio – septiembre) y datos de ubicación geográfica, realizados durante la primera etapa del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de <i>H. vastatrix</i> en reservas naturales voluntarias con café, 2015 ....	- 18 -

Tabla 6: Agentes biocontroladores determinados durante la ejecución del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de <i>H. vastatrix</i> en reservas naturales voluntarias con café, 2015 .....	- 20 -
Tabla 7: Prevalencia de hiperparásitos en época seca (marzo – mayo) del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de <i>H. vastatrix</i> en reservas naturales voluntarias con café, 2015 .....	- 21 -
Tabla 8: Prevalencia de hiperparásitos en época lluviosa (junio – septiembre) del proyecto Bioprospección de hiperparásitos <i>H. vastatrix</i> en reservas naturales voluntarias con café, 2015 .....	- 21 -
Tabla 9: IVCN de <i>C. hemileiae</i> en las unidades muestreadas y épocas del año del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de <i>H. vastatrix</i> en reservas naturales voluntarias con café, 2015 .....	- 22 -
Tabla 10: IVCN de <i>L. lecanii</i> en las unidades muestreadas y épocas del año del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de <i>H. vastatrix</i> en reservas naturales voluntarias con café, 2015 .....	- 22 -
Tabla 11: Conteo de conidiosporas de <i>C. hemileiae</i> en las unidades muestreadas y épocas del año del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de <i>H. vastatrix</i> en reservas naturales voluntarias con café, 2015.....	- 23 -
Tabla 12: Conteo de conidiosporas de <i>L. lecanii</i> en las unidades muestreadas y épocas del año del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de <i>H. vastatrix</i> en reservas naturales voluntarias con café, 2015.....	- 23 -
Tabla 13: Análisis de varianza y prueba Tukey de los datos de IVCN obtenidos de <i>C. hemileiae</i> en época seca y lluviosa del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de <i>H. vastatrix</i> en reservas naturales voluntarias con café, 2015.....	- 24 -
Tabla 14: Análisis de varianza y prueba Tukey de datos de IVCN obtenidos de <i>L. lecanii</i> en época seca y lluviosa del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de <i>H. vastatrix</i> en reservas naturales voluntarias con café, 2015 .....	- 25 -
Tabla 15: Análisis de varianza y prueba de Tukey del conteo de conidiosporas de <i>C. hemileiae</i> en época seca y lluviosa del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de <i>H. vastatrix</i> en reservas naturales voluntarias con café, 2015.....	- 26 -
Tabla 16: Análisis de varianza y prueba de Tukey del conteo de conidiosporas de <i>L. lecanii</i> en época seca y lluviosa del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de <i>H. vastatrix</i> en reservas naturales voluntarias con café 2015 .....	- 26 -
Tabla 17: Matriz de resultados del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de <i>Hemileia vastatrix</i> en reservas naturales voluntarias con café.....	- 27 -
Tabla 18: Impacto esperado del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de <i>Hemileia vastatrix</i> en reservas naturales voluntarias con café.....	- 27 -

**“Bioprospección de hiperparásitos de *Hemileia vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café”**

**Resumen**

La bioprospección de agentes de control biológico es una actividad primaria en la búsqueda de alternativas para el manejo de plagas y enfermedades; las reservas naturales dentro de plantaciones de café por las características de biodiversidad, son aptas para albergar diversidad microbiana. *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., tradicionalmente se ha combatido con fungicidas sintéticos que contaminan el ambiente y el control biológico es una alternativa sostenible. El estudio se realizó en 10 fincas con reservas naturales privadas voluntarias con café cinco de Guatemala, cuatro de Sacatepéquez y una de Chimaltenango, el muestreo se realizó en época seca y lluviosa. Se obtuvo y documentó la presencia de agentes biocontroladores y en el laboratorio se determinaron los hiperparásitos: *Cladosporium hemileiae* Steyaert y *Lecanicillium lecanii* (Zimmerm.) Zare & W. Gams., además de un insecto micófago: *Mycodiplosis* sp. (Diptera, Cecidomyiidae).

*C. hemileiae* se detectó en nueve de los 10 sitios muestreados en la época seca y uno en época lluviosa, *L. lecanii*, se detectó en seis sitios muestreados en época seca y cinco en lluviosa. Después de los análisis de índice de velocidad de crecimiento micelial (IVCM) y producción de conidiosporas, se estableció que las mejores cepas de *C. hemileiae*, fueron: Morán época seca parte baja, San Sebastián época seca y Guardabarranca parte alta, para *L. lecanii*, fueron: San Sebastián época seca y Corral Viejo estación lluviosa parte baja.

Palabras clave: biocontroladores, roya, control biológico, prevalencia, agentes.

## Abstract

Bioprospecting biological control agents are a primary activity in the search for alternatives to manage pests and diseases; in natural reserves of coffee plantations with biodiversity characteristics which are suitable to host microbial diversity. *Hemileia vastatrix* Steyaert was fought traditionally with synthetic fungicides that pollute the environment but biological control can be a sustainable alternative. The study was conducted in 10 farms with voluntary private natural reserves: five in Guatemala, four in Sacatepéquez and one in Chimaltenango, sampling was carried out during the dry and rainy seasons. The presence of biocontrol agents were obtained and documented. In laboratory hyperparasites were determined: *Cladosporium hemileiae* Berk. & Br., and *Lecanicillium lecanii* (Zimmerm.) Zare & W. Gams., plus a mycophage insect: *Mycodiplosis* sp. (Diptera, Cecidomyiidae).

*C. hemileiae*, were detected in nine of the 10 sites sampled during the dry season and one rainy season, *L. lecanii*, was detected in six sites sampled during the dry season and five in rainy season. After the analysis of mycelial growth rate (IVCM) and conidiospores production, it was established that the best strains of *C. hemileiae*, were: Morán época seca parte baja, San Sebastián época seca y Guardabarranca parte alta and for *L. lecanii*, were: San Sebastián época seca y Corral Viejo época lluviosa parte baja.

Keywords: biocontrol, rust, biological control, prevalence, agents.

## 1. Introducción

El cultivo de café fue el primero en convertirse en una mercancía global y a principios del siglo XIX, las cadenas de comercio de café se expandieron por el mundo, uniendo consumidores en Europa y Norte América con productores en África, Asia y Latinoamérica (McCook, 2006).

La roya del café se reportó como epidemia por primera vez en el sur de la India en 1869 y siguió expandiéndose por todo mundo en el siglo XIX y XX en tres períodos, entre 1870 y 1920 se propagó en las zonas cafetaleras del Océano Basin de la India y el Pacífico, en las décadas de 1950 y 1960 afectó las zonas cafetaleras del oeste de África, finalmente cruzó el océano Atlántico a finales de la década de 1960 y durante las siguientes dos décadas se propagó en las zonas cafetaleras de Latinoamérica y su impacto económico varió considerablemente, en algunas zonas destruyó más del 90% de la plantación, mientras que en otras el daño fue mínimo (McCook, 2006).

En Guatemala el cultivo de café es considerado de los más importantes ya que genera fuentes de trabajo y divisas producto del comercio internacional, sin embargo la producción se ha visto afectada y reducida debido a la expansión de la roya del café, desde 2012 a la fecha la enfermedad se ha propagado a todas las áreas cafetaleras del país lo que ha ocasionado pérdidas en la producción que seguirán incrementándose a medida que las condiciones favorables persistan (Asociación Nacional del Cafe [ANACAFE], 2013).

El control de la roya del café se ha enfocado al uso de fungicidas sintéticos pero el alto costo de estos insumos no es permisible para la mayoría de medianos y pequeños productores, además de la contaminación que generan; una alternativa para el manejo de *H. vastatrix*, son agentes de control biológico y en Guatemala se han reportado estudios en los que se ha aislado microorganismos que tienen antagonismo con la roya, sin embargo ninguno ha tenido impacto en el manejo del cultivo (Rolz, De León, & Paniagua, 2013).

Una forma de resolver dicha situación es detectar, aislar y reproducir en forma masiva uno o más microorganismos que tengan la habilidad de parasitar y debilitar a *H. vastatrix*

. Las fincas cafetaleras afectadas por la roya que poseen áreas de reserva natural debido a la cercanía del cultivo con una biodiversidad poco perturbada abre la posibilidad de que se encuentren agentes de control biológico ya que la biodiversidad en bosques naturales es mayor que en áreas cultivadas, por lo que el objeto de la bioprospección fue detectar cepas

de microorganismos específicos para la roya del café con posibilidad de ser propagados en forma masiva y formulados como fungicidas para proporcionar otra alternativa de manejo a la caficultura nacional.

## **2. Marco teórico y estado del arte**

### **2.1 Bioprospección de agentes de control biológico**

La bioprospección es la búsqueda sistemática, clasificación e investigación de nuevas fuentes de compuestos químicos, genes, proteínas y otros productos que posean un valor económico actual o potencial y que se encuentran en los componentes de la diversidad biológica (Castree, 2003).

### **2.2 Reserva Natural Privada (RNP)**

El decreto 4-89 del congreso de la República de Guatemala crea la ley de áreas protegidas y en su artículo 10 establece la guía de reservas naturales privadas que nos expresa que son áreas que pertenecen a personas individuales o jurídicas, que los dueños destinan voluntariamente y durante el tiempo que estimen conveniente, a la conservación y protección de hábitat de flora y fauna, así como comunidades bióticas o rasgos del ambiente. En ellas se garantiza la conservación, estabilidad o supervivencia de ciertas especies de plantas y animales, a través de la protección de hábitat críticos, poblaciones reproductoras y áreas de alimentación o reproducción. Estas reservas cuentan con el respaldo y el reconocimiento pleno del estado para la protección de la integridad del terreno y sus recursos (Concejo Nacional de Áreas Protegidas [CONAP], 1995).

### **2.3 Biocontrol para el manejo de royas**

El biocontrol se refiere a la utilización de especies de insectos, plantas, hongos y bacterias para control de plagas y enfermedades. A nivel mundial se presenta como una alternativa viable y sostenible, como una solución a los problemas generados por el uso desmedido a través de los años de productos agroquímicos, en general los antagonistas no tienen un único modo de acción, de los cuales se pueden mencionar: antibiosis, competencia por espacio o

por nutrientes, interacciones directas con el patógeno como mico parasitismo, lisis enzimática, e inducción de resistencia (Cook & Baker, 1983).

Álvarez en 2013 reportó que en Guatemala se encuentra el hiperparásito *Cladosporium uredinicola* sobre *Puccinia horiana* en el proyecto DIGI 4.8.63.7.26., y en 2012 reportó la presencia de *S. filum* y su potencial en el control del *P. horiana* en el proyecto FODECYT 022-2012.

#### **2.4 Impacto de la roya sobre el cultivo de café en Guatemala**

La -ANACAFE- reportó en el año 2012 que la roya del café afectó 193,200 hectáreas equivalentes al 70% del parque cafetalero de Guatemala y en el año 2013 sufrió una reducción del 15% en la producción nacional, equivalente a 700,000 quintales de café oro que dejaron de producirse a causa de la enfermedad, esto significó que se perdieran miles de empleos y el país dejó de percibir US\$372 millones de dólares por concepto de divisas por exportaciones de café (Asociación Nacional del Café [ANACAFE], 2013).

En Centroamérica la reducción en la producción tiene impacto directo en la vida de pequeños productores ya que es la única fuente de ingresos para alimentación e insumos para granos básicos. Como resultado, la epidemia de roya tiene un impacto indirecto sobre la seguridad alimentaria (Avelino, Pablo, Laderach, & Hruska, 2015).

La defoliación causada por la enfermedad disminuye en forma significativa la producción, con nivel de infección de 68%, se ha reportado pérdidas de producción de hasta 48%, y se ha constatado que la roya acentúa el ritmo bienal de la producción (Avelino & Rivas, 2013).

#### **2.5 Roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk & Broome 1869)**

Inicialmente, sus síntomas se manifiestan con la aparición de pequeñas lesiones o manchas redondas, color amarillo pálido, de uno a tres milímetros de diámetro. Esta mancha es translúcida, si se examina contra la luz y se asemeja a manchas de aceite. Gradualmente esta mancha aumenta de tamaño al iniciarse la esporulación (formación de esporas por el envés de la hoja) y puede alcanzar los dos centímetros de diámetro, se torna de color naranja y la superficie se vuelve polvosa. En este estado de desarrollo, si la lesión se toca con el dedo, las esporas se adhieren a él. Cuando éstas son abundantes se desprenden fácilmente formando una ligera nube color naranja. Si existen muchas lesiones o manchas, estas crecen

hasta unirse unas con otras cubriendo toda la hoja y provocando su caída. Cuando las manchas de la roya envejecen, el polvo anaranjado se torna de un color naranja pálido y posteriormente en el centro de la lesión amarilla surge una mancha de color café marrón o negro de apariencia seca, que crece hasta cubrir toda la superficie de la lesión y donde no se producen esporas. También es posible observar alrededor de la mancha marrón, en muchas ocasiones un borde de color amarillo, donde se producirán esporas de la roya, si existen las condiciones de clima favorables para la esporulación. Este tipo de mancha se aprecia con mayor frecuencia al final de la epidemia de la enfermedad, en el período seco, luego de la época de cosecha del café. Este tipo de lesiones representa la fuente de infección principal al inicio del período lluvioso siguiente (Barquero, 2013).

### **2.5.1 Taxonomía (Avelino & Rivas, 2013)**

Reino: Fungi  
Phylum: *Basidiomycota*  
Clase: *Urediniomycetes*  
Orden: *Uredinales*  
Familia: *Chaconiaceae*  
Género: *Hemileia*  
Especie: *Hemileia vastatrix* Berk. Broome 1869

### **2.5.2 Epidemiología de la roya del café**

La epidemia de roya tiene dos fases, la primera fase consiste en la formación del inóculo primario o inóculo inicial, este es el inóculo responsable del desarrollo inicial de la epidemia. La segunda fase consiste en la repetición del ciclo patológico de la roya o policiclo y la formación del inóculo secundario. La intensidad de la epidemia de roya depende más del número de ciclos que se pueden dar en el año que de la cantidad de inóculo primario. En efecto, la capacidad de producción de esporas de una sola lesión explica que aun teniendo poco inóculo primario éste sea capaz de originar una epidemia severa (Avelino & Rivas, 2013).

Barquero (2013) menciona que los principales factores que condicionan el desarrollo de la enfermedad dependen de la relación entre: (a) hospedante, (b) patógeno y (c) el ambiente.

- a) Hospedante: dentro de los factores del hospedante debe considerarse la susceptibilidad de la variedad, la densidad de siembra (una mayor cercanía de las plantas facilita los procesos de infección entre las hojas), la condición nutricional de las plantas y la predisposición de éstas debido a una alta cosecha.
- b) Patógeno: los puntos más importantes a considerar en el patógeno son la duración de su ciclo reproductivo, la cantidad de inóculo y los tipos de razas presentes en la población del hongo *H. vastatrix*. La roya es una enfermedad que para causar daños severos en los cafetales depende del desarrollo paulatino de múltiples ciclos de reproducción, el tiempo desde que una espora germina y penetra invadiendo los tejidos internos de la hoja hasta que se forman las manchas con esporas puede tardar entre 20 y 40 días. Entre más favorables son las condiciones de temperatura y permanencia de agua sobre las hojas, menos será el tiempo para completar el ciclo.
- c) Factores de ambiente: la cantidad de horas que permanece la superficie de la hoja mojada ya sea por lluvias, rocío o condensación y la persistencia de una mayor cantidad de horas con temperaturas entre el rango de 18 a 28°C son los factores del clima que más influyen para que la enfermedad se desarrolle rápidamente. La lluvia y el viento juegan un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad, no solo por favorecer la germinación de las esporas, sino porque junto a la lluvia el viento favorece la dispersión de esporas que flotan en el aire, diseminándolas a grandes distancias. Por otra parte, las gotas de lluvia favorecen la dispersión dentro de la plantación, producto del salpique de las esporas de unas hojas a otras, e incluso facilitando la llegada de esporas a estomas, lugar de entrada del patógeno en las hojas. Otros factores importantes en el transporte del hongo son: insectos y animales, incluyendo el hombre, principalmente durante la etapa de recolección del café (Barquero, 2013)

### **2.5.3 Manejo de la roya del café**

La vulnerabilidad de los sistemas agrícolas a los patógenos, en comparación con los ecosistemas naturales ha sido atribuida a su simplificación y especialmente a la reducción de la diversidad de plantas y de animales. De ahí, la propuesta de incorporar biodiversidad dentro de los agro ecosistemas tanto a nivel de parcela como a nivel de paisaje para manejar

mejor las plagas y enfermedades. Sin embargo, dependiendo de los rasgos de vida de los patógenos o de las plagas y de sus requerimientos, no siempre se tienen respuestas favorables al incorporar biodiversidad vegetal en los sistemas cultivados (Avelino & Rivas, 2013).

La realización de ciertas prácticas agronómicas como: uso de distancias de siembra apropiadas, poda de cafetos, selección de número de hijos por planta, manejo de la sombra, fertilización adecuada y control de malezas, tienen un efecto directo sobre la capacidad productiva de la plantación, pero además y de forma indirecta si se realizan bien, limitan el progreso de la roya así como de otras enfermedades del café (Barquero, 2013)

Sin embargo, en caso de condiciones climáticas óptimas para la roya, hay que reconocer que ningún sistema de manejo logrará mantener naturalmente la enfermedad en niveles bajos, habrá que recurrir al uso de tácticas de control específicas como el control químico o mejorar las variedades resistentes (Avelino & Rivas, 2013).

#### **2.5.4 Agentes de control biológico**

La existencia de hongos hiperparásitos de la roya del café se ha demostrado en el laboratorio, Rolz (2013) cita varios autores: Carrión (1988), Carrión y Ruiz-Berlín (1988), Leguizamón (1989), Eskes (1991), Alarcón y Carrión (1994), Vélez (1995), Rivas (1996) y Carrión (1999), todos los estudios anteriores se refieren al hiperparásito *Lecanicillium lecanii* (antes denominado *Verticillium lecanii*). En Guatemala, Arriola (1998) aisló de lesiones de *H. vastatrix* en el campo los hongos siguientes: *Aphanocladium melirolae*, *Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium leptobactum* y *Verticillium* sp. En Xalapa, Veracruz, Carrión y Rico-Gray (2002) aislaron los hongos siguientes: *Acremonium byssoides*, *Calcarisporium arbuscula*, *C. ovalisporum*, *Sporothrix guttuliformis* y *Fusarium pallidoroserum* (Rolz, De León, & Paniagua, 2013).

#### **2.5.5 Cambio climático**

Las actividades humanas impulsadas por los cambios demográficos, económicos, tecnológicos y sociales tienen un gran impacto en el cambio climático. Este está afectando las plantas en los ecosistemas naturales y agrícolas de todo el mundo, así como los patógenos. El resultado es un incremento de las epidemias, poniendo en peligro la seguridad alimentaria y la provisión de servicios ecosistémicos. Se han desarrollado modelos epidémicos basados

en el clima para pronosticar las enfermedades y guiar las estrategias de control. En la actualidad existe una oportunidad de utilizar estos modelos y los pronósticos más recientes de cambio climático para predecir los efectos de los escenarios en la distribución y la gravedad de las epidemias. En el caso particular de la roya del café, se ha hecho mucho hincapié en estudiar los efectos del cambio climático sobre la duración del período de latencia, el cual determina la velocidad de repetición del ciclo de la enfermedad y los niveles finales de la epidemia. Las condiciones climáticas en el futuro serán muy complicadas para el cultivo del café, por reducción de calidad y problemas productivos relacionados con la fisiología del cafeto, las plagas y enfermedades, especialmente la roya del café y la broca por los cambios de incidencia bruscos que podrían presentar, podrían ser determinantes en la desaparición del cultivo en las áreas más bajas y a menos que se hagan esfuerzos adicionales para fortalecer la capacidad de adaptación de hoy, es probable que haya grandes pérdidas económicas en toda la cadena de suministro del café, así como la desaparición de servicios ecosistémicos (Avelino & Rivas, 2013).

### 3. Hipótesis

En las reservas naturales voluntarias con cultivos de café existe la presencia de al menos un agente de control biológico para la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.)

### 4. Objetivos

#### 4.1 General

Establecer la presencia de agentes de control biológico para *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., dentro de fincas cafetaleras con reserva natural en la región central de Guatemala.

#### 4.2 Específicos

- 4.2.1 Establecer localización geográfica, distribución espacial e índice de prevalencia de los agentes detectados.
- 4.2.2 Identificar agentes con potencial de virulencia promisorios para la formulación de fungicidas biológicos.

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1 Descripción y delimitación en tiempo y espacio de la propuesta**

La investigación se desarrolló desde el mes de febrero hasta noviembre del 2015, en las fincas de socios de la Asociación de Reservas Naturales Privadas de Guatemala (ARNPG), ubicadas en los departamentos de Guatemala, Sacatepéquez y Chimaltenango.

### **5.2 Período de la investigación**

La investigación tuvo una duración de 10 meses a partir de febrero hasta noviembre de 2015, con tres etapas de trabajo: 1) Campo: marzo-agosto, 2) Laboratorio: febrero-octubre y 3) Gabinete: marzo-noviembre.

### **5.3 Tipo de investigación**

La bioprospección es un método exploratorio de agentes biológicos que sigue un patrón de muestreo dirigido para lograr la detección y determinación de incidencia y expansión y aunque no sea experimental se ciñe a las técnicas de muestreo para la selección de unidades de un universo determinado.

### **5.4 Técnicas e instrumentos**

#### **5.4.1 Fase de Campo**

El sujeto de muestreo fueron 10 fincas pertenecientes a la Asociación de Reservas Naturales Privadas de ANACAFE que están situadas en los departamentos de Guatemala, Sacatepéquez y Chimaltenango en el denominado Nudo Cadena Volcánica Central. La ubicación de las fincas sujetas a muestreo, se presentan en las tablas 1 y 2.

Tabla 1: Sitios de muestreo en época seca (marzo-mayo) durante la primera etapa del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de *H. vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café, 2015

No.	Finca	Lugar	Municipio	Departamento
1	Las Nubes		Villa Nueva	Guatemala
2	Las Vegas	parte baja	Chinautla	Guatemala
		parte alta	Chinautla	Guatemala
3	Guardabarranca	parte baja	Villa Canales	Guatemala
		parte alta	Villa Canales	Guatemala
4	Moran	parte baja	Villa Canales	Guatemala
		parte alta	Villa Canales	Guatemala
5	El Yalú	parte baja	Sumpango	Sacatepéquez
		parte alta	Sumpango	Sacatepéquez
6	La Soledad	parte baja	Acatenango	Chimaltenango
		parte alta	Acatenango	Chimaltenango
7	Corral Viejo	parte baja	Palencia	Guatemala
		parte alta	Palencia	Guatemala
8	El Capetillo	parte baja	Alotenango	Sacatepéquez
		parte intermedia	Alotenango	Sacatepéquez
		parte alta	Alotenango	Sacatepéquez
9	San Sebastián		San Miguel Dueñas	Sacatepéquez
10	El Portal	parte baja	Antigua Guatemala	Sacatepéquez
		parte media	Antigua Guatemala	Sacatepéquez
		parte alta	Antigua Guatemala	Sacatepéquez

Tabla 2: Sitios de muestreo en época lluviosa (junio-septiembre) durante la segunda etapa del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de *H. vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café, 2015

No.	Finca	Lugar	Municipio	Departamento
1	Las Nubes		Villa Nueva	Guatemala
2	Las Vegas		Chinautla	Guatemala
3	Guardabarranca	parte alta	Villa Canales	Guatemala
4	Moran	parte alta	Villa Canales	Guatemala
5	El Yalú	parte baja	Sumpango	Sacatepéquez
		parte alta	Sumpango	Sacatepéquez
6	La Soledad	parte alta	Acatenango	Chimaltenango
7	Corral Viejo	parte baja	Palencia	Guatemala
8	El Capetillo	parte baja	Alotenango	Sacatepéquez
		parte alta	Alotenango	Sacatepéquez
9	San Sebastián		San Miguel Dueñas	Sacatepéquez
10	El Portal	parte baja	Antigua Guatemala	Sacatepéquez
		parte alta	Antigua Guatemala	Sacatepéquez

#### 5.4.1.1 Localización geográfica y ubicación espacial de las muestras

La localización geográfica fue obtenida por medio de equipo GARMIN GPSMAP®62sc, las coordenadas se trabajaron en formato UTM (Universal Transversa Mercator) y la ubicación espacial se representó por medio de mapas temáticos elaborados en el software ArcGIS® versión 10.1.

#### 5.4.1.2 Colecta de muestras

En cada sitio de muestreo se realizó la inspección minuciosa y toma de muestras en forma dirigida, en los sitios más próximos al bosque con el objeto de obtener muestras de roya con mayor probabilidad de estar parasitadas considerando que la cercanía a la reserva natural permite en si el desplazamiento de especies depredadoras de la roya del café.

Seleccionada la planta se observó el estrato bajo, medio y alto de plantas con presencia de signos y síntomas de roya, la condicionante para la captación de muestras fue la existencia de al menos una de las pustulas de roya en la hoja manifestando depresión o daño provocado por algun agente biológico.

Las muestras fueron colocadas en bolsas de nylon debidamente acomodadas dentro de papel periódico humedecido y cada una de ellas fue identificada con un código según la unidad de muestreo. Posteriormente las muestras fueron trasladadas hacia el Centro de Diagnostico Parasitológico (CDP) de la Facultad de Agronomía de la USAC para su procesamiento.

#### 5.4.2 Fase de laboratorio

##### 5.4.2.1 Determinación de hiperparásitos de la roya del café

Cada una de las muestras colectadas fue clasificada, ordenada y observada en estereoscopio para la detección de estructuras de reproducción correspondientes a biocontroladores, posteriormente se procedió a realizar montajes de estas estructuras que se observaron en el microscopio y se cotejaron con claves morfológicas. Las muestras vegetales con presencia de hiperparásitos fueron separadas, una parte herborizada y la otra sirvió para el proceso de aislamiento y purificación. El modo de acción de los biocontroladores se describe a continuación:

***Cladosporium hemileiae* Steyaert (Digitopodium U. Braun, Heuchert & K. Schub., gen. nov.) (Heuchert, Braun, & Schubert, 2005)**

*C. hemileiae* tiene la capacidad de romper la pared celular y penetrar las uredosporas, colapsando y produciendo necrosis, posteriormente se observa la presencia de abundante micelio de coloración oscura desarrollado sobre pústulas, disminuyendo la cantidad de inóculo e inhibiendo el crecimiento y desarrollo (García Velazco, y otros, 2005). La Figura 1 muestra micelio de *C. hemileiae* sobre *H. vastatrix*, en vista macro y microscópica.

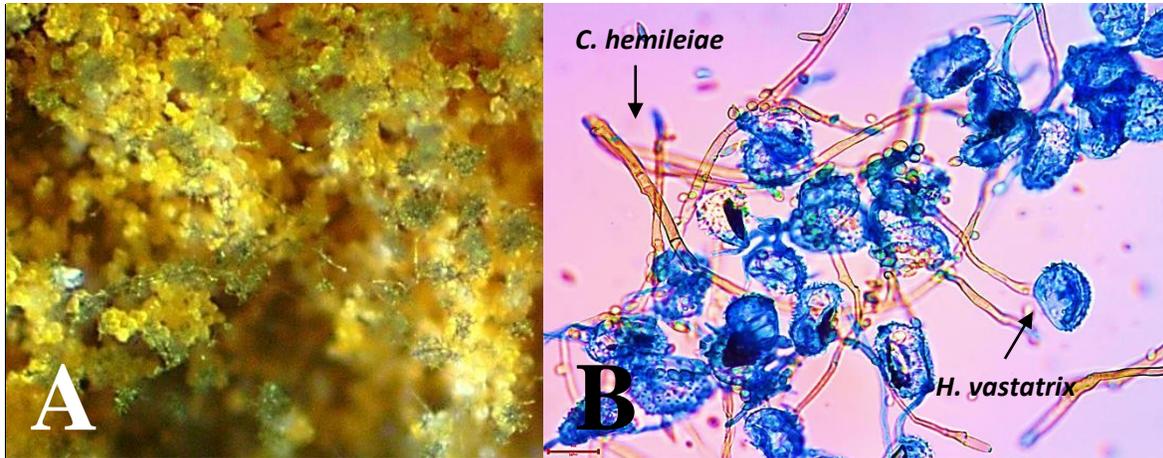


Figura 1: A. *C. hemileiae* (micelio oscuro) parasitando *H. vastatrix*, B. Vista microscópica de *C. hemileiae*, se observa colapso de uredosporas de *H. vastatrix*.

***Lecanicillium lecanii* (Zimmerm.) Zare & W. Gams. (Zare & Gams, 2001)**

*L. lecanii*, tiene la capacidad de alimentarse al invadir, degradar y destruir el contenido de las uredosporas de *H. vastatrix*, se ha reportado que micelio y conidiosporas afectan desarrollo, germinación, períodos de incubación, latencia y tasa de infección (Canjura Saravia, Sánchez, Krauss, & Somarriba, 2002). La Figura 2 muestra micelio de *L. lecanii*, sobre *H. vastatrix*, en vista macro y microscópica.

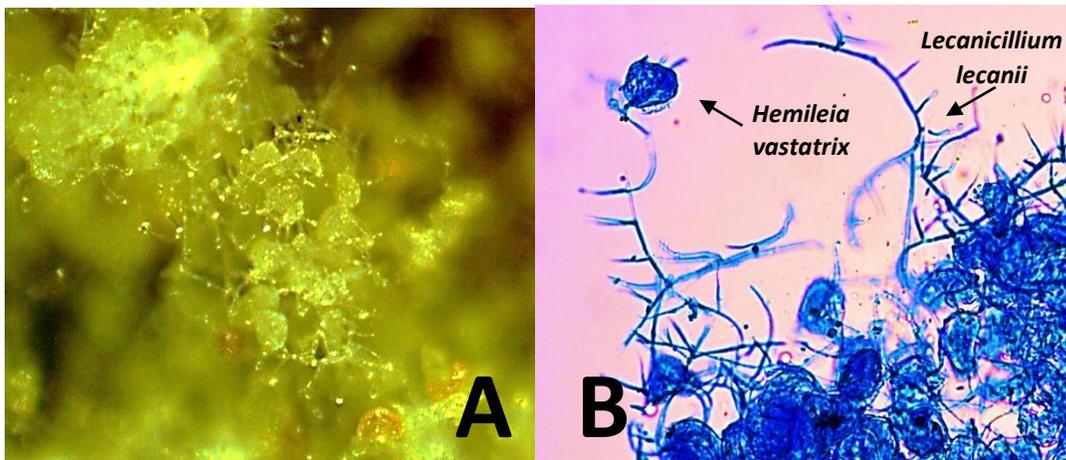


Figura 2: A. *L. lecanii* parasitando *H. vastatrix* B. Vista microscópica de *L. lecanii* sobre *H. vastatrix*.

***Mycodiplosis* sp. (Diptera, Cecidomyiidae) (Gagné, 1981)**

Díptero perteneciente a la familia *Cecidomyiidae*, las larvas comen esporas y se ha reportado que llevan hasta 280 en su interior, sin embargo se resalta que estos insectos tienen un papel suplementario con la dispersión de la roya que podría llegar a ser importante a nivel de hojas, árboles e incluso plantaciones completas, pero sería irrelevante en la dispersión a largas distancias (Henk, Farr, & Aime, 2011). La figura 3 muestra la larva de *Mycodiplosis* sp. alimentándose de esporas de *H. vastatrix*.



Figura 3: *Mycodiplosis* sp. alimentándose de *H. vastatrix*.

#### **5.4.2.2 Aislamiento y purificación de hiperparásitos**

Se realizó según la técnica descrita por (Goh, 1999) y modificada por (Alvarez, Santos, & Centes, 2013) que recibe el nombre de Aislamiento de esporas con aguja de vidrio y que se describe a continuación:

- a) **Aislamiento:** se realizó en un ambiente estéril y se tomaron pústulas de *H. vastatrix*, parasitadas con biocontroladores. Con ayuda de una aguja de disección estéril se transfirieron esporas a una caja Petri con agar-agua al 3% (A-A). Con una aguja de vidrio estéril bajo el estereoscopio fueron arrastradas las esporas una por una, se sellaron las cajas con parafilm y se colocaron en la incubadora a 26°C.
- b) **Purificación:** a las 24 horas del aislamiento se transfirieron 5 esporas a 5 cajas con medio PDA, una espora germinada por caja, para obtener cultivos monospóricos que se incubaron a 26°C.
- c) **Índice de velocidad de crecimiento micelial (IVCM):** para evaluar si existió diferencia significativa en el crecimiento “in vitro” de las diferentes cepas colectadas

y el sitio de colecta de las cepas, se evaluó el IVCN en medio de cultivo PDA, a temperatura 26 °C. Según la cantidad de microorganismos aislados y las localidades de donde provenían se hicieron comparaciones entre las poblaciones de las cepas aisladas siguiendo un modelo estadístico completamente al azar. Las mediciones de crecimiento micelial se iniciaron 72 horas después de realizar el cultivo monospórico en PDA durante un periodo de ocho días. El IVCN fue calculado utilizando la fórmula de Maguire, adaptada por Oliveira (Oliveira, 1991).

$$IVCM = \sum(D - D_a) / N$$

Dónde: D=diámetro medio actual (mm), Da=diámetro medio del día anterior (mm), N=número de días después de la inoculación en medio de cultivo (días).

- d) **Producción de conidiosporas:** para determinar si existió diferencia significativa en la producción de conidiosporas de las diferentes cepas colectadas y el sitio de colecta de las cepas se realizaron conteos de cultivos monospóricos sobre medio PDA en cajas Petri de 90 mm de diámetro a los 55 días cuando cubrió en su totalidad el medio, se realizó la suspensión de esporas en 50 ml de solución Tween 20 al 0.05% en agua destilada para desprender, separar y dispersar las esporas. El conteo de conidiosporas se realizó utilizando Cámara de Neubauer y los promedios ponderados se utilizaron en el análisis de varianza y prueba de Tukey.

### 5.4.3 Fase de gabinete

Los datos obtenidos del IVCN y conteo de conidiosporas se analizaron con software estadístico InfoStat®, se realizó análisis de varianza y prueba Tukey ( $\alpha=0.05$ ) para comparaciones múltiples, los datos originales del conteo de conidiosporas se transformaron a logaritmo natural (ln) para hacer entendibles los resultados ya que tienen una distribución de Poisson.

Tabla 3: Operacionalización de las variables

Tipo de variable	Dimensional	Análisis realizado
Cuantitativa	Presencia y prevalencia de hiperparásitos	Cuantificación de prevalencia por lugar de muestreo en las fincas.
Cuantitativa	Índice de velocidad de crecimiento micelial	Paramétrico: análisis de varianza y método Tukey para comparaciones múltiples.
Cuantitativa	Conteo de conidiosporas	Paramétrico: conversión a ln, análisis de varianza y método Tukey para comparaciones múltiples.

## 6. Resultados

Se estableció la presencia, prevalencia y distribución espacial de agentes de control biológico para *H. vastatrix*, en todas las unidades de muestreo, con la variable de presencia, no presencia, según la unidad y época de los muestreos.

### 6.1 Sitios de Muestreo

En las tablas 4 y 5 se detallan los sitios de muestreo, época del año en que se realizaron, nombre de la unidad, sitio de muestreo dentro de la unidad, municipio, departamento, altitud y coordenadas de ubicación.

Tabla 4: Sitios de muestreo en época seca (marzo – mayo) y datos de ubicación geográfica, realizados durante la primera etapa del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de *H. vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café, 2015

No.	Finca	lugar	Municipio	Departamento	msnm	Longitud	Latitud
1	Las Nubes		Villa Nueva	Guatemala	1,570	90° 38' 35.0116" W	14° 32' 19.5161" N
2	Las Vegas	parte baja	Chinautla	Guatemala	1,263	90° 31' 16.0803" W	14° 44' 47.3383" N
		parte alta	Chinautla	Guatemala	1,269	90° 31' 31.4063" W	14° 44' 46.9640" N
3	Guardabarranca	parte baja	Villa Canales	Guatemala	1,559	90° 29' 56.5" W	14° 28' 49.12" N
		parte alta	Villa Canales	Guatemala	1,629	90° 29' 53.6554" W	14° 28' 45.7393" N
4	Moran	parte baja	Villa Canales	Guatemala	1,235	90° 32' 01.5912" W	14° 29' 58.9014" N
		parte alta	Villa Canales	Guatemala	1,309	90° 32' 12.5226" W	14° 29' 48.4472" N
5	El Yalú	parte baja	Sumpango	Sacatepéquez	1,693	90° 45' 02.4170" W	14° 42' 04.0917" N
		parte alta	Sumpango	Sacatepéquez	1,869	90° 45' 12.2498" W	14° 41' 56.2502" N
6	La Soledad	parte baja	Acatenango	Chimaltenango	1,419	90° 59' 29.9249" W	14° 31' 55.1539" N
		parte alta	Acatenango	Chimaltenango	1,451	90° 59' 01.6626" W	14° 32' 07.5993" N
7	Corral Viejo	parte baja	Palencia	Guatemala	1,408	90° 15' 16.6168" W	14° 36' 04.0148" N
		parte alta	Palencia	Guatemala	1,650	90° 15' 11.9202" W	14° 36' 58.0710" N
8	El Capetillo	parte baja	Alotenango	Sacatepéquez	1,416	90° 48' 26.4056" W	14° 29' 37.8488" N
		parte intermedia	Alotenango	Sacatepéquez	1,441	90° 48' 09.4592" W	14° 29' 51.3139" N
		parte alta	Alotenango	Sacatepéquez	1,510	90° 47' 52.0734" W	14° 30' 27.1328" N
9	San Sebastián		San Miguel Dueñas	Sacatepéquez	1,499	90° 48' 30.1959" W	14° 31' 26.2530" N
10	El Portal	parte baja	Antigua Guatemala	Sacatepéquez	1,540	90° 44' 58.5443" W	14° 34' 05.2526" N
		parte media	Antigua Guatemala	Sacatepéquez	1,573	90° 45' 23.8678" W	14° 34' 14.2923" N
		parte alta	Antigua Guatemala	Sacatepéquez	1,550	90° 44' 57.7753" W	14° 34' 02.8116" N

Tabla 5: Sitios de muestreo en época lluviosa (junio – septiembre) y datos de ubicación geográfica, realizados durante la primera etapa del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de *H. vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café, 2015

No.	Finca	lugar	Municipio	Departamento	msnm	Longitud	Latitud
1	Las Nubes		Villa Nueva	Guatemala	1,570	90° 38' 35.0116" W	14° 32' 19.5161" N
2	Las Vegas		Chinautla	Guatemala	1,263	90° 31' 16.0803" W	14° 44' 47.3383" N
3	Guardabarranca	parte alta	Villa Canales	Guatemala	1,629	90° 29' 53.6554" W	14° 28' 45.7393" N
4	Moran	parte alta	Villa Canales	Guatemala	1,316	90° 32' 07.5787" W	14° 29' 37.4162" N
5	El Yalú	parte baja	Sumpango	Sacatepéquez	1,693	90° 45' 02.4170" W	14° 42' 04.0917" N
		parte alta	Sumpango	Sacatepéquez	1,869	90° 45' 12.2498" W	14° 41' 56.2502" N
6	La Soledad	parte alta	Acatenango	Chimaltenango	1,451	90° 59' 01.6626" W	14° 32' 07.5993" N
7	Corral Viejo	parte baja	Palencia	Guatemala	1,408	90° 15' 16.6168" W	14° 36' 04.0148" N
8	El Capetillo	parte baja	Alotenango	Sacatepéquez	1,420	90° 48' 12.8925" W	14° 29' 48.5090" N
		parte alta	Alotenango	Sacatepéquez	1,447	90° 48' 03.9935" W	14° 29' 55.7737" N
9	San Sebastián		San Miguel Dueñas	Sacatepéquez	1,491	90° 48' 50.3558" W	14° 31' 54.3848" N
10	El Portal	parte baja	Antigua Guatemala	Sacatepéquez	1,542	90° 44' 57.8027" W	14° 34' 01.7953" N
		parte alta	Antigua Guatemala	Sacatepéquez	1,552	90° 45' 16.3422" W	14° 33' 59.5329" N

A excepción del muestreo que se realizó en El Yalú en época lluviosa (junio – septiembre) en donde no se detectó la presencia de hiperparásitos sobre la roya del café, en todos los lugares se documentó la presencia de uno o más.

En la figura 4, se muestran en el mapa de forma gráfica la localización de los puntos de muestreo en los departamentos de Guatemala, Sacatepéquez y Chimaltenango en época seca y lluviosa.

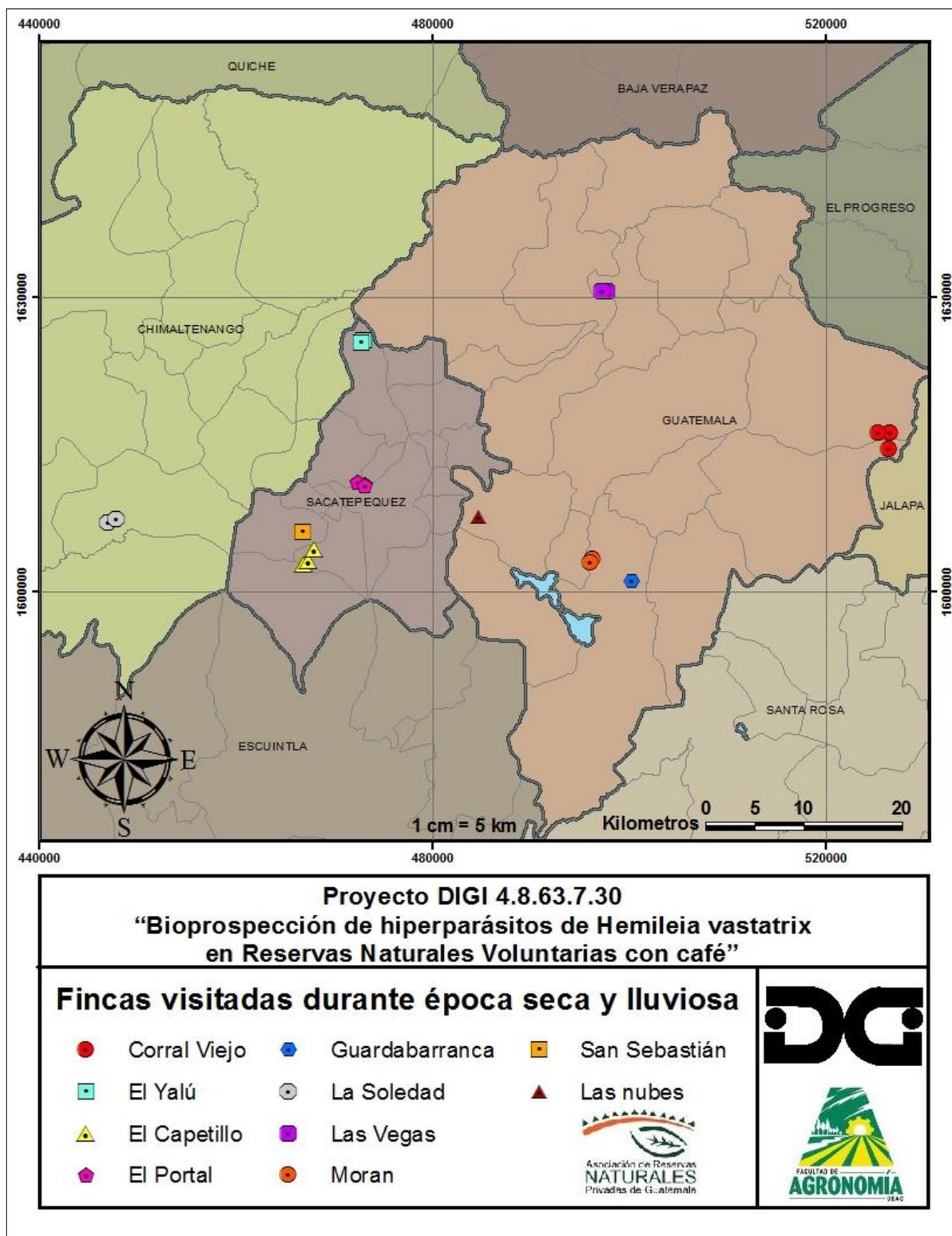


Figura 4: Ubicación geográfica de sitios de muestreo en época seca y lluviosa del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de *H. vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café, 2015

## 6.2 Agentes biocontroladores determinados

Durante el estudio se detectaron tres organismos que parasitan la roya del café en los sitios bajo estudio, de estos, dos son hongos y el tercero es un insecto, los cuales se presentaron en la mayoría de los casos en todas las unidades bajo muestreo, a excepción de una de ellas donde solo se localizó al insecto. Los agentes detectados fueron estudiados y se procedió a la determinación por medio de claves taxonómicas según el grupo al que pertenecieron. En la tabla 6 se detallan los agentes detectados durante el presente estudio.

Tabla 6: Agentes biocontroladores determinados durante la ejecución del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de *H. vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café, 2015

Agente biocontrolador determinado	Clave morfológica utilizada
<i>Cladosporium hemileiae</i> Steyaert (Digitopodium U. Braun, Heuchert & K. Schub., gen. nov.)	Heuchert, Braun & Schubert, 2005
<i>Lecanicillium lecanii</i> (Zimmerm.) Zare & W. Gams.	Zare & Gams, 2001
<i>Mycodiplosis</i> sp.	Gagné, 1982

## 6.3 Prevalencia de biocontroladores

La presencia de los agentes biocontroladores se evidenció en función de las muestras donde fueron localizados, según la época de muestreo y el agente detectado, se pudo constatar que a lo largo del muestreo las poblaciones variaron y en el caso de *C. hemileiae* Steyaert, fue localizado con mayor prevalencia en la época seca, *L. lecanii* (Zimmerm.) Zare & W. Gams., en época seca con presencia moderada y en época lluviosa se hizo más frecuente, en el caso de *Mycodiplosis* sp. (Diptera, Cecidomyiidae), tuvo prevalencia a lo largo de todo el muestreo independientemente de la época. En las tablas 7 y 8 se muestran los datos de procedencia de la muestra y prevalencia expresada en porcentaje.

Tabla 7: Prevalencia de hiperparásitos en época seca (marzo – mayo) del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de *H. vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café, 2015

No.	Ubicación (fincas)	<i>Lecanicillium lecanii</i> (%)	<i>Cladosporium hemileiae</i> (%)	<i>Mycodiplosis</i> sp. (%)
1	Las Nubes	0	60	40
2	Las Vegas	10	21	69
3	Guardabarranca	0	20	80
4	Moran	1	92	7
5	El Yalú	0	0	100
6	La Soledad	15	10	75
7	Corral Viejo	0	13	88
8	El Capetillo	8	23	69
9	San Sebastián	12	50	38
10	El Portal	7	28	65

Tabla 8: Prevalencia de hiperparásitos en época lluviosa (junio – septiembre) del proyecto Bioprospección de hiperparásitos *H. vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café, 2015

No.	Ubicación (fincas)	<i>Lecanicillium lecanii</i> (%)	<i>Cladosporium hemileiae</i> (%)	<i>Mycodiplosis</i> sp. (%)
1	Las Nubes	0	0	100
2	Las Vegas	0	0	100
3	Guardabarranca	0	17	83
4	Moran	0	0	100
5	El Yalú	0	0	0
6	La Soledad	59	0	41
7	Corral Viejo	8	0	92
8	El Capetillo	73	0	27
9	San Sebastián	32	0	68
10	El Portal	21	0	79

#### 6.4 Índice de velocidad de crecimiento micelial (IVCM)

De las cepas aisladas en época seca y lluviosa se realizaron cultivos monospóricos a los que se les midió el IVCM según el diámetro de crecimiento del hongo, se realizaron cinco repeticiones y a cada repetición se le realizó tres lecturas en intervalos de 3, 5 y 7 días después de la siembra en el medio de cultivo. En las tablas 9 y 10 se muestran los promedios ponderados de las tres lecturas de las cinco repeticiones expresadas en milímetros por día.

Tabla 9: IVCM de *C. hemileiae* en las unidades muestreadas y épocas del año del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de *H. vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café, 2015

No.	Ubicación (finca)	Hiperparásito	Época	IVCM (mm/día)	*D.E.
1	Las Nubes	<i>C. hemileiae</i>	seca	2.05	0.82
2	Las Vegas	<i>C. hemileiae</i>	seca	2.32	1.82
3	Guardabarranca pb	<i>C. hemileiae</i>	seca	1.95	0.07
4	Guardabarranca pa	<i>C. hemileiae</i>	seca	1.62	0.11
5	Guardabarranca pa	<i>C. hemileiae</i>	lluviosa	2.21	0.39
6	Morán pb	<i>C. hemileiae</i>	seca	2.44	0.07
7	Morán pa	<i>C. hemileiae</i>	seca	1.12	0.38
8	La Soledad	<i>C. hemileiae</i>	seca	3.00	0.21
9	Corral Viejo	<i>C. hemileiae</i>	seca	1.78	0.12
10	El Capetillo	<i>C. hemileiae</i>	seca	2.06	0.07
11	San Sebastián	<i>C. hemileiae</i>	seca	2.37	0.16
12	El Portal	<i>C. hemileiae</i>	seca	2.67	0.28

estación seca (es) estación lluviosa (ell) parte baja (pb) parte alta (pa). \*Desviación Estándar de los datos.

Tabla 10: IVCM de *L. lecanii* en las unidades muestreadas y épocas del año del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de *H. vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café, 2015

No.	Ubicación (finca)	Hiperparásito	Época	IVCM (mm/día)	*D.E.
1	Las Vegas	<i>L. lecanii</i>	seca	1.94	0.16
2	Morán pb	<i>L. lecanii</i>	seca	1.50	0.08
3	La Soledad	<i>L. lecanii</i>	seca	1.03	0.03
4	La Soledad	<i>L. lecanii</i>	lluviosa	0.77	0.19
5	Corral Viejo pb	<i>L. lecanii</i>	seca	0.68	0.01
6	Corral Viejo pb	<i>L. lecanii</i>	lluviosa	1.98	0.09
7	San Sebastián	<i>L. lecanii</i>	seca	4.34	0.17
8	San Sebastián	<i>L. lecanii</i>	lluviosa	4.11	0.10
9	El Portal	<i>L. lecanii</i>	seca	1.19	0.02
10	El Portal	<i>L. lecanii</i>	lluviosa	1.45	0.01
11	El Capetillo	<i>L. lecanii</i>	lluviosa	1.40	0.03

estación seca (es) estación lluviosa (ell) parte baja (pb) parte alta (pa). \*Desviación Estándar de los datos.

## 6.5 Conteo de Conidiosporas

De los cultivos monospóricos se realizaron conteos de conidiosporas a los 55 días de la siembra, cuando el micelio del hongo cubrió el diámetro de la caja Petrí, se realizaron dos lecturas con cámara de Neubauer a tres repeticiones de cada cepa. Las tablas 11 y 12 detallan las medias ponderadas de las lecturas que se realizaron a las cepas.

Tabla 11: Conteo de conidiosporas de *C. hemileiae* en las unidades muestreadas y épocas del año del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de *H. vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café, 2015

No.	Finca	Hiperparásito	Época	Conidiosporas/ml	Rango max	Rango min
1	Las Nubes	<i>C. hemileiae</i>	seca	6.56E+06	7.75E+06	5.38E+06
2	Las Vegas	<i>C. hemileiae</i>	seca	2.16E+07	2.68E+07	1.64E+07
3	Guardabarranca pb	<i>C. hemileiae</i>	seca	1.93E+08	1.94E+08	1.91E+08
4	Guardabarranca pa	<i>C. hemileiae</i>	seca	1.21E+08	1.32E+08	1.09E+08
5	Guardabarranca pa	<i>C. hemileiae</i>	lluviosa	5.95E+07	6.11E+07	5.79E+07
6	Morán pb	<i>C. hemileiae</i>	seca	1.02E+08	1.13E+08	9.21E+07
7	Morán pa	<i>C. hemileiae</i>	seca	2.06E+06	2.09E+06	2.04E+06
8	La Soledad	<i>C. hemileiae</i>	seca	2.32E+08	2.59E+08	2.05E+08
9	Corral Viejo	<i>C. hemileiae</i>	seca	9.44E+07	1.05E+08	8.38E+07
10	El Capetillo	<i>C. hemileiae</i>	seca	1.43E+08	1.89E+08	9.75E+07
11	San Sebastián	<i>C. hemileiae</i>	seca	8.06E+07	8.50E+07	7.63E+07
12	El Portal	<i>C. hemileiae</i>	seca	2.83E+08	2.98E+08	2.68E+08

estación seca (es) estación lluviosa (ell) parte baja (pb) parte alta (pa)

Tabla 12: Conteo de conidiosporas de *L. lecanii* en las unidades muestreadas y épocas del año del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de *H. vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café, 2015

No.	Finca	Hiperparásito	Época	Conidiosporas/ml	Rango max	Rango min
1	Las Vegas	<i>L. lecanii</i>	seca	1.91E+07	3.40E+07	4.14E+06
2	Morán pb	<i>L. lecanii</i>	seca	1.96E+07	2.19E+07	1.72E+07
3	La Soledad	<i>L. lecanii</i>	seca	8.54E+07	9.16E+07	7.93E+07
4	La Soledad	<i>L. lecanii</i>	lluviosa	1.46E+08	1.49E+08	1.44E+08
5	Corral Viejo pb	<i>L. lecanii</i>	seca	3.04E+08	3.14E+08	2.94E+08
6	Corral Viejo pb	<i>L. lecanii</i>	lluviosa	3.04E+08	3.14E+08	2.94E+08
7	San Sebastián	<i>L. lecanii</i>	seca	2.27E+08	2.40E+08	2.14E+08
8	San Sebastián	<i>L. lecanii</i>	lluviosa	2.27E+08	2.40E+08	2.14E+08

9	El Portal	<i>L. lecanii</i>	seca	3.93E+07	5.25E+07	2.61E+07
10	El Portal	<i>L. lecanii</i>	lluviosa	3.93E+07	5.25E+07	2.61E+07
11	El Capetillo	<i>L. lecanii</i>	lluviosa	1.26E+08	1.31E+08	1.20E+08

estación seca (es) estación lluviosa (ell) parte baja (pb) parte alta (pa)

## 6.6 Análisis de la información

### 6.6.1 IVCM

Con los datos obtenidos del IVCM se realizó análisis de varianza y prueba de Tukey con software estadístico InfoStat® para diferenciar las cepas con mejor crecimiento y si existió diferencia significativa entre los IVCM de las cepas según los sitios de muestreo y épocas del año en que se realizaron.

Las tablas 13 y 14 detallan la cepa analizada, el número de repeticiones, las medias ponderadas, desviación estándar y prueba de Tukey. Según los análisis realizados se estableció que la mejor cepa de *C. hemileiae* Steyaert para esta variable es: La Soledad época seca y en el caso de *L. lecanii* (Zimmerm.) Zare & W. Gams., la mejor cepa es la procedente de San Sebastián época seca.

Tabla 13: Análisis de varianza y prueba Tukey de los datos de IVCM obtenidos de *C. hemileiae* en época seca y lluviosa del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de *H. vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café, 2015

Cepa <i>C. hemileiae</i>	n	Medias	D.E	*Tukey ( $\alpha=0.05$ )		
La Soledad es	5	3.00	$\pm 0.1$	A		
El Portal es	5	2.67	$\pm 0.1$	A	B	
Morán es pb	5	2.44	$\pm 0.1$	B		C
San Sebastián es	5	2.37	$\pm 0.1$	B	C	D
Las Vegas es	5	2.32	$\pm 0.1$	B		C D
Guardabarranca ell pa	5	2.16	$\pm 0.1$	C		D E
El Capetillo es	5	2.06	$\pm 0.1$	C		D E F
Las Nubes es	5	2.05	$\pm 0.1$	C		D E F
Guardabarranca es pb	5	1.95	$\pm 0.1$	D		E F
Corral Viejo es	5	1.78	$\pm 0.1$	E		F
Guardabarranca es pa	5	1.62	$\pm 0.1$	F		
Morán es pa	5	1.12	$\pm 0.1$	G		

\*Lugares con la misma letra no difieren significativamente ( $p>0.05$ ) (C.V.=0.02) promedios con límite de confianza al 95% estación seca (es) estación lluviosa (ell) parte baja (pb) parte alta (pa)

Tabla 14: Análisis de varianza y prueba Tukey de datos de IVCN obtenidos de *L. lecanii* en época seca y lluviosa del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de *H. vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café, 2015

Cepa <i>L. lecanii</i>	n	Medias	D.E	*Tukey ( $\alpha=0.05$ )
San Sebastián es	5	4.34	$\pm 0.04$	A
San Sebastián ell	5	4.11	$\pm 0.04$	B
Corral Viejo ell pb	5	1.98	$\pm 0.04$	C
Las Vegas ell	5	1.94	$\pm 0.04$	C
Morán es pb	5	1.50	$\pm 0.04$	D
El Portal ell	5	1.45	$\pm 0.04$	D
El Capetillo ell	5	1.41	$\pm 0.04$	D
El Portal es	5	1.19	$\pm 0.04$	E
La Soledad es	5	1.03	$\pm 0.04$	E
La Soledad ell	5	0.73	$\pm 0.04$	F
Corral Viejo es pb	5	0.68	$\pm 0.04$	F

\*Lugares con la misma letra no difieren significativamente ( $p > 0.05$ ) (C.V.=5.27) promedios con límite de confianza al 95% estación seca (es) estación lluviosa (ell) parte baja (pb) parte alta (pa)

## 6.7 Conteo de conidiosporas

Con los datos obtenidos del conteo de conidiosporas se realizó análisis de varianza y prueba de Tukey con software estadístico InfoStat para diferenciar las cepas con mejor producción de conidiosporas y si existió diferencia significativa entre los conteos de las cepas según los sitios de muestreo y épocas del año en que se realizaron. Los datos del conteo se convirtieron a logaritmo natural (ln) para comprender los resultados ya que tienen una distribución de Poisson. Las tablas 15 y 16 detallan la cepa analizada, el número de repeticiones, las medias ponderadas, desviación estándar y prueba de Tukey. Según los análisis realizados se estableció que la mejor cepa de *C. hemileiae* Steyaert., para esta variable es Guardabarranca época seca parte baja y para *L. lecanii* (Zimmerm.) Zare & W. Gams., fue Corral viejo época seca parte baja.

Tabla 15: Análisis de varianza y prueba de Tukey del conteo de conidiosporas de *C. hemileiae* en época seca y lluviosa del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de *H. vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café, 2015

Cepa <i>C. hemileiae</i>	n	*Medias	D.E	**Tukey ( $\alpha=0.05$ )
Guardabarranca es pb	3	19.08	$\pm 0.27$	A
El Capetillo es	3	18.74	$\pm 0.27$	A
Guardabarranca es pa	3	18.60	$\pm 0.27$	A B
Morán es pb	3	18.44	$\pm 0.27$	A B
Corral Viejo es	3	18.36	$\pm 0.27$	A B
San Sebastián es	3	18.20	$\pm 0.27$	A B C
La Soledad es	3	17.94	$\pm 0.27$	A B C
Guardabarranca ell pa	3	17.90	$\pm 0.27$	A B C
El Portal es	3	17.23	$\pm 0.27$	B C
Las Vegas es	3	16.87	$\pm 0.27$	C D
Las Nubes es	3	15.69	$\pm 0.27$	D E
Morán es pa	3	14.54	$\pm 0.27$	E

\*Logaritmo natural del conteo de conidiosporas \*\*Lugares con la misma letra no difieren significativamente ( $p>0.05$ ) (C.V.=2.67) promedios con límite de confianza al 95% estación seca (es) estación lluviosa (ell) parte baja (pb) parte alta (pa)

Tabla 16: Análisis de varianza y prueba de Tukey del conteo de conidiosporas de *L. lecanii* en época seca y lluviosa del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de *H. vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café 2015

Cepa <i>L. lecanii</i>	n	*Medias	D.E	**Tukey ( $\alpha=0.05$ )
Corral Viejo es pb	3	19.53	$\pm 0.22$	A
San Sebastián es	3	19.24	$\pm 0.22$	A B
La Soledad ell	3	18.80	$\pm 0.22$	A B
El Capetillo ell	3	18.65	$\pm 0.22$	A B
El Portal ell	3	18.64	$\pm 0.22$	A B
La Soledad es	3	18.26	$\pm 0.22$	B C
El Portal es	3	17.45	$\pm 0.22$	C D
Morán es pb	3	16.78	$\pm 0.22$	D E
Las Vegas ell	3	16.45	$\pm 0.22$	D E F
Corral Viejo ell pb	3	15.93	$\pm 0.22$	E F
San Sebastián ell	3	15.62	$\pm 0.22$	F

\*Logaritmo natural del conteo de conidiosporas \*\*Lugares con la misma letra no difieren significativamente ( $p>0.05$ ) (C.V.=2.13) promedios con límite de confianza al 95% estación seca (es) estación lluviosa (ell) parte baja (pb) parte alta (pa)

## 6.8 Matriz de resultados

Tabla 17: Matriz de resultados del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de *Hemileia vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café.

Objetivo Específico	Resultado Esperado	Resultado Obtenido
Establecer localización geográfica, distribución espacial e índice de prevalencia de los agentes detectados.	Localización geográfica, distribución espacial e índice de prevalencia de los agentes detectados.	Se obtuvo localización geográfica por GPS, distribución espacial representada por mapa temático e índice de prevalencia de los dos hongos e insecto detectados en las unidades de muestreo durante la época seca y lluviosa.
Identificar agentes con potencial de virulencia promisorios para la formulación de fungicidas biológicos.	Identificación de agentes biocontroladores promisorios para la formulación de fungicidas biológicos.	Se identificaron dos biocontroladores promisorios para la formulación de fungicidas: <i>Cladosporium hemileiae</i> y <i>Lecanicillium lecanii</i> .

## 6.9 Impacto esperado

Los objetivos propuestos por el estudio fueron completados satisfactoriamente ya que se identificó biocontroladores con potencial para la formulación de fungicidas, los cuales deberán ser reproducidos y formulados para su aplicación en campo, se espera que el uso de los biocontroladores detectados, ofrezca una alternativa sostenible y amigable con el ambiente, además de reducir costos, lo que favorecería al sector caficultor a nivel nacional.

Tabla 18: Impacto esperado del proyecto Bioprospección de hiperparásitos de *Hemileia vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café.

Impacto esperado	Beneficiario potencial	Indicador verificable
Identificar biocontroladores con potencial para formulación de fungicidas.	Productores de café a nivel nacional.	Se identificaron cepas promisorias de los biocontroladores <i>C. hemileiae</i> y <i>L. lecanii</i> para ser reproducidas masivamente y formuladas en fungicidas.

## 7. Análisis y discusión de resultados

El presente estudio es el primero en Guatemala y uno de los pioneros a nivel mundial en reportar a *C. hemileiae*, como hiperparásito de la roya del café y es la primera vez que se somete dicho agente biocontrolador a pruebas de laboratorio para establecer el comportamiento in vitro con miras a utilizarlo como una alternativa de control biológico y se considera que es un hallazgo de importancia para la caficultura nacional.

Pocos y muy contados son los estudios realizados a nivel mundial sobre esta especie, Steyaert (1930) y Haddad, Saraiva, Mizubuti, Romeiro y Maffia, (2014) lo mencionan como parásito y antagonista de *H. vastatrix*, en cuanto a IVC, Alvarez, Santos y Centes (2015) reportan que una especie diferente, *C. uredinícola* obtuvo crecimientos máximos de 1.87 mm/día, mientras que en este estudio se reportan crecimientos máximos de 3 mm/día con una desviación estándar  $\pm 0.1$  evidenciándose cepas con mayor virulencia y poca variabilidad.

*L. lecanii*, se ha citado ampliamente, en Chiapas, México se hace referencia al control biológico indirecto que aparentemente existe sobre *H. vastatrix*, y que es potenciado por la existencia de relaciones mutualistas de la hormiga *A. instabilis* y la escama verde del café *C. viridis*, Jackson, Skillman y Vandermeer (2012); Vandermeer, Perfecto y Liere (2009); Jackson, Zemenick y Huerta (2012), demuestran en ensayos realizados que para que haya un parasitismo por parte de *L. lecanii*, son necesarias, además de condiciones atmosféricas y del ecosistema del cafetal dos condiciones que son: (a) que se mantenga permanentemente en el suelo de las plantaciones una densidad elevada del hiperparásito y (b) que estén presentes los vectores (principalmente insectos) que transporten el hongo del suelo a las hojas infectadas. Por lo tanto según los resultados del presente estudio se puede ver una convergencia de las condiciones anteriormente expresadas en las cepas colectadas en época lluviosa.

En Costa Rica, Cuba y México Canjura, Sánchez, Krauss y Somarriba (2002); González y Surís (2007); Díaz-Vicente (2014) han reportado aislamiento, selección de cepas para reproducción masiva, formulación de fungicidas biológicos y pruebas en campo con resultados variados.

*Mycodiplosis* sp. ha sido reportado como un insecto mycófago con variedad de hospederos y se ha sugerido su posible uso como biocontrolador de la roya del trigo por Kaushal, Mishra,

Varma, Kapoor y Pandey (2001), sin embargo se menciona el poco conocimiento acerca del rol ecológico que las larvas tienen sobre la roya. La voracidad con que se alimentan de las esporas puede ejercer un impacto negativo en la enfermedad, sin embargo, si las moscas transmiten la enfermedad más eficientemente que el viento, el consumo de esporas de la larva quedaría en segundo plano (Henk, Farr, & Aime, 2011).

El estudio estableció el índice de prevalencia de los agentes detectados en distintas épocas del año. *C. hemileiae*, estuvo presente en nueve de 10 sitios muestreados en época seca y uno en época lluviosa, *L. lecanii*, estuvo presente en seis de 10 sitios muestreados en época seca y cinco en la lluviosa, *Mycodiplosis* sp., estuvo presente en los 10 sitios muestreados en época seca y nueve en época lluviosa; éstos resultados nos indican que existe una preferencia de época en cuanto a los biocontroladores, siendo más prevalente *C. hemileiae*, en época seca y *L. lecanii*, en época seca con prevalencia moderada y en época lluviosa más frecuente.

El análisis de varianza del IVCM y producción de conidiosporas identificó las cepas que crecieron a una mayor velocidad y las que produjeron mayor cantidad de conidiosporas; para *C. hemileiae*, las cepas La Soledad época seca y El Portal época seca tuvieron los mayores crecimientos, sin embargo, su producción de conidiosporas fue muy baja, en cambio, Morán época seca parte baja y San Sebastián época seca mostraron buen índice de crecimiento micelial y producción de conidiosporas, además, una tercera cepa se seleccionó debido a que fue la única que prevaleció en época seca y lluviosa que corresponde a Guardabarranca parte alta, demostrando adaptabilidad a diferentes condiciones climáticas. Para *L. lecanii*, las cepas: San Sebastián época seca y Corral Viejo época lluviosa parte baja tuvieron los crecimientos más altos y la mejor producción de conidiosporas.

Los resultados de la investigación promueven alternativas de manejo para la roya del café, deberá probarse su reproducción masiva, su efectividad en campo, la época del año en la cual son exitosos y si solos o en combinación con otros microorganismos logran un efecto significativo en el inóculo inicial y en temporadas de alta prevalencia de *H. vastatrix*.

## 8. Conclusiones

- Se estableció la presencia de *C. hemileiae*, *L. lecanii* y *Mycodiplosis* sp., biocontroladores de *H. vastatrix*, en fincas cafetaleras con reserva natural en la región central de Guatemala.
- Se estableció localización geográfica, distribución espacial e índice de prevalencia de los agentes detectados.
- Se determinó que las cepas promisorias de *C. hemileiae*, son: Morán época seca parte baja, San Sebastián época seca y Guardabarranca parte alta.
- Se determinó que las cepas promisorias de *L. lecanii*, son: San Sebastián época seca y Corral Viejo época lluviosa parte baja.

## 9. Referencias

- Alvarez Valenzuela, G. A., Santos Bravo, M. C., & Centes Carrillo, L. F. (2015). *Extracción y formulación artesanal de Cladosporium uredinicola biocontrolador de Puccinia horiana*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, Facultad de Agronomía.
- Alvarez Valenzuela, G. A., Santos Bravo, M. d., & Centes, L. F. (2013). *Bioprospección de los hiperparásitos Cicinobolus cesatii de Bary 1870 y Eudarluca caricis (Biv) O.E. Eriks 1996, sobre cultivo y plantas adyacentes en la región central de Guatemala*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, Facultad de Agronomía.
- Asociación Nacional del Cafe [ANACAFE]. (2013). *El cafetal, la revista del agricultor*. Guatemala.
- Asociación Nacional del Cafe [ANACAFE]. (2013). *Memoria de labores 2012/2013*. Guatemala.
- Avelino, J., & Rivas Platero, G. (2013). La roya anaranjada del cafeto. En J. Avelino, A. Muller Raoul, A. Eskes, Santacreo Rodnev, & F. Holguin, *La roya anaranjada del cafeto: mito y realidad*. San Jose, Costa Rica: CIRAD-CP-CAFE, IRD, France-MAE, IICA-PROMECAFE, PROMECAFE, ICAFE-San Jose.
- Avelino, J., Pablo, I., Laderach, P., & Hruska, A. (2015). The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008-2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security*, 7(2), 303-321. doi:10.1007/s12571-015-04469
- Barquero, M. (2013). *Recomendaciones para el combate de la roya del cafeto*. San José: Instituto del café de Costa Rica [ICAFE].
- Biosystematics Research Institute. (1981). *Manual of Nearctic Diptera Volume 1*. Ottawa: Canadian Government Publishing Centre.
- Canjura Saravia, E. M., Sánchez Garita, V., Krauss, U., & Somarriba, E. (2002). Reproducción masiva de *Verticillium* sp., hiperparásito de la roya del café, *Hemileia vastatrix*. *Manejo Integrado de plagas y agroecología*(66), 13-19.
- Castree, N. (2003). Bioprospecting: from theory to practice (and back again). *Transactions of the Institute of British Geographers*, 28(1), 35-55.
- Concejo Nacional de Áreas Protegidas [CONAP]. (31 de marzo de 1995). Guía para establecer una reserva natural privada. Guatemala.
- Cook, R. J., & Baker, K. F. (1983). *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. St. Paul, Minnesota, US: American Phytopathological Society.
- Díaz-Vicente, V. M., Pinzón-Rincón, E. P., Pérez-Quintanilla, J. N., Cabrera-Alvarado, M. E., Magallanes-Cedeño, R., & De Coss-Flores, M. E. (2014). El hongo *Verticillium*

- hemileiae Bouriquet, alternativa para el control de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.). *Agroproductividad*, 58-62.
- Gagné, R. J. (1981). Key to families-adults. En B. R. Institute, *Manual of Nearctic Diptera* (Vol. 1, pág. 674). Ottawa: Canadian Government Publishing Centre.
- García Velazco, R., Zavaleta Mejía, E., Rojas Martínez, R. I., Leyva Mir, S. G., Kilpatrick Simpson, J., & Fuentes Dávila, G. (2005). Antagonismo de *Cladosporium* sp. contra *Puccinia horiana* Henn. Causante de la Roya blanca del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(1), 79-86.
- Goh, T. K. (1999). Single-spore isolation using a hand-made glass needle. *Fungal Diversity* 2, 47-63.
- González, E., & Surís, M. (2007). Selección in vitro de aislamientos promisorios de *Lecanicillium lecanii* (Zare y Gams) para la lucha biológica de *Hemileia vastatrix* (Berk. Et Br.). *Protección Vegetal*, 22(2), 128-130.
- Haddad, F., Saraiva, R. M., Mizubuti, E. S., Romeiro, R. S., & Maffia, L. A. (2014). Isolation and selection of *Hemileia vastatrix* antagonists. *European Journal of Plant Pathology*, 763-772.
- Henk, D. A., Farr, D. F., & Aime, M. C. (2011). Mycodiplosis (Diptera) infestation of rust fungi is frequent, wide spread and possibly host specific. *Fungal Ecology*, 4, 284-289.
- Heuchert, B., Braun, U., & Schubert, K. (2005). Morphotaxonomic revision of fungicolous *Cladosporium* species (hyphomycetes). *Schlechtendalia*, 13, 1-78.
- Jackson, D., Skillman, J., & Vandermeer, J. (2012). Indirect biological control of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*, by the entomogenous fungus *Lecanicillium lecanii* in a complex coffee agroecosystem. *Biological control*(61), 89-97.
- Jackson, D., Zemenick, K., & Huerta, G. (2012). Occurrence in the soil and dispersal of *Lecanicillium lecanii*, a fungal pathogen of the green coffee scale (*Coccus viridis*) and coffee rust (*Hemileia vastatrix*). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*(15), 389-401.
- Kaushal, K., Mishra, A. N., Varma, P. K., Kapoor, K. N., & Pandey, H. N. (2001). Diptera fly (*Mycodiplosis* sp.): a natural bioagent for controlling leaf rust (*Puccinia recondita tritici*) of wheat (*Triticum aestivum*). *The Indian Journal of Agricultural Sciences*.
- McCook, S. (2006). Global rust belt: *Hemileia vastatrix* and the ecological integration of world coffee production since 1850. *Journal of Global History*(1), 177-195. doi:10.1017/s174002280600012x
- Oliveira, J. A. (1991). *Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de pantulas de pepino (Cucumis sativus L.) e pimentão (Capsicum annuum L.)*. Lavras: Escola Superior de Agricultura de Lavras.

- Rolz Asturias, C. E., De León Fajardo, L. R., & Paniagua, O. (2013). Evidencia de un antagonismo in vitro de especies de *Trichoderma* contra *Hemileia vastatrix* (roya del café). *Revista* 25, 65.
- Steyaert, R. L. (1930). *Cladosporium hemileiae* n. spec. Un parasite de l'*Hemileia vastatrix* Berk. et Br. *Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique*, 46-47.
- Vandermeer, J., Perfecto, I., & Liere, H. (2009). Evidence for hyperparasitism of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) by the entomogenous fungus, *Lecanicillium lecanii*, through a complex ecological web. *Plant Pathology*(58), 636-641.
- Zare, R., & Gams, W. (Agosto de 2001). A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. *Nova Hedwigia*, 73, 1-50.

## 10. Apéndice

### 10.1 Análisis de la varianza de IVCM *C. hemileiae*

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
IVCM	60	0.86	0.83	10.02

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	13.43	11	1.22	26.84	<0.0001
Época	4.1E-03	1	4.1E-03	0.09	0.7663
Hiperparásito	0.00	0	0.00	sd	sd
Finca	13.43	10	1.34	29.52	<0.0001
Error	2.18	48	0.05		
Total	15.61	59			

#### Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.20028

Error: 0.0455 gl: 48

Época	Medias	n	E.E.
lluviosa	2.16	5	0.10 A
seca	2.13	55	0.03 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

#### Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.20028

Error: 0.0455 gl: 48

Hiperparásito	Medias	n	E.E.
Cladosporium	2.13	60	0.03 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

#### Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.46313

Error: 0.0455 gl: 48

Finca	Medias	n	E.E.
La Soledad_es_cl	3.00	5	0.10 A
El Portal_es_cl	2.67	5	0.10 A B
Morán_es_pb_cl	2.44	5	0.10 B C
San Sebastián_es_cl	2.37	5	0.10 B C D
Las Vegas_es_cl	2.32	5	0.10 B C D
Guardabarranca_ell_pa	2.16	5	0.10 C D E
El Capetillo_es_cl	2.06	5	0.10 C D E F
Las Nubes_es_cl	2.05	5	0.10 C D E F
Guardabarranca_es_pb_cl	1.95	5	0.10 D E F
Corral Viejo_es_cl	1.78	5	0.10 E F
Guardabarranca_es_pa_cl	1.62	5	0.10 F
Moran es pa cl	1.12	5	0.10 G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

## 10.2 Análisis de la varianza de IVCM *L. lecanii*

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
IVCM	55	0.99	0.99	5.27

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	77.66	10	7.77	817.53	<0.0001
Época	0.33	1	0.33	34.35	<0.0001
Hiperparásito	0.00	0	0.00	sd	sd
Finca	77.34	9	8.59	904.55	<0.0001
Error	0.42	44	0.01		
Total	78.08	54			

#### Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.05319

Error: 0.0095 gl: 44

Época Medias n E.E.

lluviosa 1.93 25 0.02 A

seca 1.78 30 0.02 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

#### Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.05319

Error: 0.0095 gl: 44

Hiperparásito Medias n E.E.

Lecanicillium 1.85 55 0.01 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

#### Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.20915

Error: 0.0095 gl: 44

Finca	Medias	n	D.E.	
San Sebastián_es_lc	4.34	5	0.04	A
San Sebastián_ell_lc	4.11	5	0.04	B
Corral Viejo_ell_pb_lc	1.98	5	0.04	C
Las vegas_ell_lc	1.94	5	0.04	C
Morán_es_pb_lc	1.50	5	0.04	D
El Portal_ell_lc	1.45	5	0.04	D
El Capetillo_ell_lc	1.41	5	0.04	D
El Portal_es_lc	1.19	5	0.04	E
La Soledad_es_lc	1.03	5	0.04	E
La Soledad_ell_lc	0.73	5	0.04	F
Corral Viejo es pb lc	0.68	5	0.04	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

### 10.3 Análisis de la varianza de la producción de conidiosporas *C. hemileiae*

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Conidios/ml	36	0.92	0.88	2.67

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	60.15	11	5.47	24.65	<0.0001
Finca	60.15	11	5.47	24.65	<0.0001
Hiperparásito	0.00	0	0.00	sd	sd
Época	0.00	0	0.00	sd	sd
Error	5.32	24	0.22		
Total	65.47	35			

#### Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.38662

Error: 0.2218 gl: 24

Finca	Medias	n	E.E.			
Guardabarranca_es_pb_cl	19.08	3	0.27	A		
El Capetillo_es_cl	18.74	3	0.27	A		
Guardabarranca_es_pa_cl	18.60	3	0.27	A	B	
Morán_es_pb_cl	18.44	3	0.27	A	B	
Corral Viejo_es_cl	18.36	3	0.27	A	B	
San Sebastián_es_cl	18.20	3	0.27	A	B	C
La Soledad_es_cl	17.94	3	0.27	A	B	C
Guardabarranca_ell_pa_cl	17.90	3	0.27	A	B	C
El Portal_es_cl	17.23	3	0.27		B	C
Las Vegas_es_cl	16.87	3	0.27		C	D
Las nubes_es_cl	15.69	3	0.27			D E
Moran es pa cl	14.54	3	0.27			E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

#### Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.38662

Error: 0.2218 gl: 24

Hiperparásito	Medias	n	E.E.
Cladosporium	17.63	36	0.08

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

#### Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.58620

Error: 0.2218 gl: 24

Época	Medias	n	E.E.
lluviosa	17.90	3	0.27
seca	17.61	33	0.08

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

#### 10.4 Análisis de la varianza de la producción de conidiosporas *L. lecanii*

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Conidios/ml	33	0.95	0.92	2.13

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	56.85	10	5.69	39.90	<0.0001
Finca	56.85	10	5.69	39.90	<0.0001
Hiperparásito	0.00	0	0.00	sd	sd
Época	0.00	0	0.00	sd	sd
Error	3.14	22	0.14		
Total	59.99	32			

##### Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.10183

Error: 0.1425 gl: 22

Finca	Medias	n	E.E.		
Corral Viejo_es_pb_lc	19.53	3	0.22	A	
San Sebastián_es_lc	19.24	3	0.22	A	B
La Soledad_ell_lc	18.80	3	0.22	A	B
El Capetillo_ell_lc	18.65	3	0.22	A	B
El Portal_ell_lc	18.64	3	0.22	A	B
La Soledad_es_lc	18.26	3	0.22	B	C
El Portal_es_lc	17.45	3	0.22	C	D
Morán_es_pb_lc	16.78	3	0.22		D E
Las vegas_ell_lc	16.45	3	0.22		D E F
Corral Viejo_ell_pb_lc	15.93	3	0.22		E F
San Sebastián_ell_lc	15.62	3	0.22		F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

##### Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.10183

Error: 0.1425 gl: 22

Hiperparásito	Medias	n	E.E.
Lecanicillium	17.76	33	0.07

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

##### Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.27369

Error: 0.1425 gl: 22

Época	Medias	n	E.E.
seca	17.95	18	0.09
lluviosa	17.53	15	0.10

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

### **11. Actividades de gestión, vinculación y divulgación**

Se realizaron actividades de gestión de recursos durante el tiempo que duró el proyecto, alcanzándose los objetivos propuestos en la investigación. La vinculación y divulgación fueron de la mano con la ejecución del proyecto ya que mensualmente se realizaron informes y presentaciones de los avances del proyecto a las autoridades y socios de la Asociación de Reservas Naturales Privadas de Guatemala (ARNPG) involucrados en el estudio. Se realizó la presentación de resultados finales del estudio el 6 de noviembre del presente en las instalaciones de la Unidad de Vinculación y Gestión de Recursos (UVIGER), dirigida a profesionales, profesores, estudiantes de la Facultad de agronomía, personal de la Dirección General de Investigación (DIGI), representantes y socios de ARNPG-ANACAFE.

## 12. Orden de pago

### LISTADO DE TODOS LOS INTEGRANTES DEL EQUIPO DE INVESTIGACIÓN

Contratados por la contraparte y colaboradores	
Ing. Agr. Gustavo Adolfo Álvarez Valenzuela	Coordinador
Ing. Agr. Soren Sherwood Ramírez Barillas	Investigador
P. Agr. José Miguel Escobar Sandoval	Auxiliar de Investigación II

### CONTRATADOS POR LA DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN

CONTRATADOS POR LA DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN				
NOMBRE	CATEGORÍA	REGISTRO DE PERSONAL	PAGO	
			SI	NO
Soren Sherwood Ramírez Barillas	Investigador		X	
José Miguel Escobar Sandoval	Auxiliar de Investigación II		X	

Nombre	Firma
Soren Sherwood Ramírez Barillas	
José Miguel Escobar Sandoval	

\_\_\_\_\_  
Ing. Agr. Gustavo Adolfo Álvarez Valenzuela

**COORDINADOR**

\_\_\_\_\_  
Ing. Agr. Julio Rufino Salazar  
**Coordinador PUICB**

\_\_\_\_\_  
Ing. Agr. Julio Rufino Salazar  
**Coordinador General de Programas**