

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

Informe final

**“Formulación y evaluación de *Cladosporium hemileiae* biocontrolador de *Hemileia vastatrix*”**

Equipo de investigación

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

Nombre del Investigador: Soren Sherwood Ramírez Barillas

Nombre del Auxiliar de Investigación II: José Miguel Escobar Sandoval

**27 de noviembre 2016**

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

Partida Presupuestaria

4.8.63.4.03

Año de ejecución: 2016

## Índice

<b>1. Introducción.....</b>	<b>- 3 -</b>
<b>2. Marco teórico y estado del arte.....</b>	<b>- 4 -</b>
2.1 Roya del café ( <i>Hemileia vastatrix</i> Berk & Broome 1869).....	- 4 -
2.2 El cambio climático y la roya del café en Guatemala.....	- 6 -
2.3 Manejo de la roya del café.....	- 7 -
2.4 Control biológico aplicado a la roya del café.....	- 8 -
2.5 <i>Cladosporium hemileiae</i> biocontrolador de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	- 10 -
2.6 Tecnologías para producción de hongos biocontroladores.....	- 10 -
<b>5. Hipótesis.....</b>	<b>- 12 -</b>
<b>6. Objetivos.....</b>	<b>- 12 -</b>
6.1 General.....	- 12 -
6.2 Específicos.....	- 12 -
<b>7. Materiales y métodos.....</b>	<b>- 13 -</b>
7.1 Descripción y delimitación en tiempo y espacio de la propuesta.....	- 13 -
7.2 Localización geográfica.....	- 13 -
7.3 Tipo de investigación.....	- 13 -
7.4 Técnicas e instrumentos.....	- 14 -
7.5 Metodología de análisis de la información.....	- 16 -
<b>8. Resultados.....</b>	<b>- 18 -</b>
8.1 Sustrato eficaz para la propagación masiva de <i>C. hemileiae</i> .....	- 18 -
8.2 Control de calidad de los conidios producidos en el sustrato.....	- 18 -
8.3 Aplicación en campo.....	- 19 -
8.4 Matriz de resultados.....	- 21 -
8.5 Impacto esperado.....	- 21 -
<b>9. Análisis y discusión de resultados.....</b>	<b>- 23 -</b>
<b>10. Conclusiones.....</b>	<b>- 25 -</b>
<b>11. Referencias.....</b>	<b>- 26 -</b>
<b>12. Apéndice.....</b>	<b>- 29 -</b>
<b>13. Actividades de gestión, vinculación y divulgación.....</b>	<b>- 32 -</b>

## 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> . fuente: proyecto digi 4.8.63.7.30.....	- 10 -
Figura 2: crecimiento de unidades formadoras de colonia (ufc) de las cepas en arroz blanco durante los períodos de tiempo evaluados.....	- 19 -

## Índice de tablas

Tabla 1: Coordenadas de los sitios de donde se realizaron los experimentos. ....	- 13 -
Tabla 2: Operacionalización de las variables .....	- 17 -
Tabla 3: Promedio de esporas por gramo de sustrato de las cepas desarrolladas en arroz blanco durante los períodos evaluados.....	- 18 -
Tabla 4: Control de calidad (germinación y pureza) de cepas en los distintos períodos de tiempo evaluados.....	- 19 -
Tabla 5: Cepas evaluadas en campo en la localidad de Villa Canales y San Miguel Dueñas, lecturas del primer, segundo y tercer monitoreo. ....	- 20 -
Tabla 6: Cepas evaluadas en campo en la localidad de Villa Canales y San Miguel Dueñas, lecturas del primer, segundo y tercer monitoreo. ....	- 21 -
Tabla 10: Matriz de resultados del proyecto: Formulación y evaluación de <i>Cladosporium hemileiae</i> biocontrolador de <i>Hemileia vastatrix</i> . ....	- 21 -
Tabla 11: Impacto esperado del proyecto: Formulación y evaluación de <i>Cladosporium hemileiae</i> biocontrolador de <i>Hemileia vastatrix</i> . ....	- 22 -

## Apéndice

Apéndice 1: ANDEVA factorial realizado a las cepas y períodos de propagación. ....	- 29 -
Apéndice 2: Fotografías de los experimentos realizados durante el proyecto.....	- 30 -

## **“Formulación y evaluación de *Cladosporium hemileiae* biocontrolador de *Hemileia vastatrix*”**

### **Resumen**

El control de la roya del café se ha enfocado al uso de fungicidas sintéticos pero el alto costo, la generación de resistencia y contaminación ambiental y a humanos demanda encontrar alternativas viables, no contaminantes y sostenibles para el manejo de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. Se reportó la presencia de antagonistas en el estudio “Bioprospección de hiperparásitos de *Hemileia vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café”. *Cladosporium hemileiae* Steyaert y *Lecanicillium lecanii* (Zimmerm.) Zare & W. Gams., fueron propuestos con potencial de propagación masiva en sustratos como el arroz blanco, arroz precocido y maíz amarillo quebrado. El estudio se realizó en las localidades de Villa Canales, Guatemala y San Miguel Dueñas Sacatepéquez y se evaluaron las cepas Guardabarranca, Morán y San Sebastián, las cuales fueron recomendadas en la bioprospección antes mencionada, solo Guardabarranca y Morán pudieron ser propagadas en arroz blanco obteniéndose concentraciones promedio a los siete días de  $1.02 \times 10^7 \text{ UFC/g} \pm 2.20 \times 10^7 \text{ UFC/g}$  para Guardabarranca y  $1.13 \times 10^7 \text{ UFC/g} \pm 1.35 \times 10^7 \text{ UFC/g}$  para Morán, se realizó control de calidad y los % de germinación y pureza fueron 93% y 100% para la cepa Guardabarranca y 96% y 100% para Morán. Las aplicaciones en campo evidenciaron la germinación de *C. hemileiae* sobre *H. vastatrix* y sugieren el aumento de concentración del inóculo y mayor frecuencia de aplicación en campo. Durante los monitoreos en época seca y lluviosa se evidenció la presencia de *L. lecanii* y *Mycodiplosis* sp., en las localidades donde se realizó el estudio.

**Palabras clave:** control biológico, roya del café, fermentación sólida, sustratos de crecimiento, propagación masiva.

## **"Formulation and evaluation of *Cladosporium hemileiae* biocontroller of *Hemileia vastatrix*"**

### **Abstract**

Control of coffee rust has focused on the use of synthetic fungicides, but high costs, resistance generation, environmental and human contamination demand to find viable, non-polluting and sustainable alternatives for the management of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. In 2015 where reported the presence of antagonists in the study "Bioprospecting hyperparasites of *Hemileia vastatrix* in voluntary natural reserves with coffee". *Cladosporium hemileiae* Steyaert and *Lecanicillium lecanii* (Zimmerm.) Zare & W. Gams., were proposed with massive propagation potential in substrates such as white rice, precooked rice and broken yellow maize. The study was carried out in Villa Canales, Guatemala, and San Miguel Dueñas Sacatepéquez and evaluated the Guardabarranca, Morán and San Sebastián strains, which were recommended in the aforementioned bioprospection, only Guardabarranca and Morán could be propagated in white rice, obtaining average concentrations at seven days of  $1.02 \times 10^7$  UFC/g $\pm 2.20 \times 10^7$  UFC/g for Guardabarranca and  $1.13 \times 10^7$  UFC/g $\pm 1.35 \times 10^7$  UFC/g for Morán, quality control was performed and the germination and purity % were 93% and 100% for Guardabarranca strain and 96% and 100% for Morán. Field applications evidenced the germination of *C. hemileiae* on *H. vastatrix* and suggest the increase of inoculum concentration and greater frequency of application in the field. During the monitoring in dry and rainy season the presence of *L. lecanii* and *Mycodiplosis* sp., was evidenced in the localities where the study was carried out.

**Keywords:** biological control, coffee rust, solid fermentation, growth substrates, mass propagation.

## 1. Introducción

El café de Guatemala en la región centroamericana se ubica en los primeros lugares en las exportaciones agropecuarias; se estima que las exportaciones de café tienen un valor neto anual de USD \$1750 millones, lo que representa un 27% de las exportaciones mundiales de café. La roya del café desde su ingreso a Centroamérica en 1976, no impactó en forma tan significativa como en los años 2012-2013 por lo que fue declarado un problema de urgencia nacional en los países del área por tratarse de una situación que impacta aspectos económicos, sociales, políticos y ambientales (Morales, 2015). La roya del café que fue reportada en 1869, ha causado grandes pérdidas en países de Asia, África y América. Cuando la enfermedad se establece en un lugar no ha sido posible erradicarla a pesar de múltiples estrategias implementadas por productores, en consecuencia, se han tenido que adaptar a convivir con la enfermedad y sus efectos no solo son significativos durante un ciclo de producción, sino también en los años subsiguientes (dos o tres años) (Virginio Filho & Astorga, 2014). Cuando el control químico se realiza con altos niveles de infección los fungicidas y las medidas tomadas resultan ineficientes lo que compromete seriamente la cantidad y calidad de la cosecha en la plantación y en su conjunto afecta la producción del país (Rivillas, Serna, Cristancho, & Gaitan, 2011). Los esfuerzos por alcanzar una agricultura sostenible con la utilización de métodos técnicamente efectivos, económicamente viables y compatibles con el ambiente deberían ser de primer orden, el control biológico debería tener una participación preponderante para ejercer una óptima y sana protección fitosanitaria de los cultivos (Hernández Mansilla & Rosón Álvarez, 2005). *Cladosporium Hemileiae* fue reportado por Alvarez (2015), como hiperparásito de la roya del café en el estudio: “Bioprospección de hiperparásitos de *Hemileia vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café” el cual evidenció la capacidad de *C. hemileiae* como potencial biocontrolador de *H. vastatrix*. El presente trabajo se realizó con el fin de contribuir a la agricultura sostenible, impulsando la utilización de métodos artesanales de producción de agentes de control biológico para la roya del café, el documento contiene resumen, introducción, marco teórico y estado del arte con la literatura más reciente respecto al tema desarrollado, metodología para la producción artesanal de productos biológicos, resultados, discusión y conclusiones alcanzadas por la investigación realizada.

## 2. Marco teórico y estado del arte

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

La roya del café es causada por el hongo *Hemileia vastatrix* que crece dentro del tejido de las hojas del café y llega a la superficie de la hoja donde produce pústulas anaranjadas, cada pústula libera decenas de miles de esporas que se diseminan en los cafetales por efecto del viento y la lluvia o viajan transportadas por insectos, animales y personas; cuando la epidemia de roya es severa, produce la caída prematura de las hojas y en consecuencia, al siguiente año se produce una disminución del rendimiento en las plantaciones (McCook, 2009).

La temperatura óptima para el desarrollo de la roya del café es de 22-23°C, la cual favorece el proceso de germinación de la uredosporas, la penetración a los tejidos y colonización de la hoja (Virginio Filho & Astorga, 2014).

Cuando las manchas de la roya envejecen, se tornan de color naranja pálido, el centro de la lesión se torna de color marrón y apariencia seca, puede observarse un halo color amarillo, donde se producen esporas 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, este tipo de lesiones representa el inóculo inicial del período lluvioso siguiente (Barquero, 2013).

La roya sigue un patrón de alta y baja intensidad en los años agrícolas de alta y baja carga de producción, en años de alta producción se debe tener mayor cuidado con la incidencia y severidad de roya. En los años de alta carga productiva, la incidencia de la enfermedad puede llegar a 80% o 90%, en tal situación, la temperatura, humedad de la hoja y la lluvia son los factores que junto a la incidencia de la enfermedad deben ser monitoreados para determinar el inicio, intervalo, número de aplicaciones, tipo de fungicida y modo de aplicación. Después de cosechar el café la intensidad de la enfermedad desciende debido a las bajas temperaturas y a la caída de las hojas durante la cosecha debido al ataque de la roya, a la senescencia natural y al efecto de la cosecha manual (Zambolim, 2015).

### 2.1.1 Taxonomía de la roya del café (Avelino & Rivas, 2013)

Reino:	Fungi
Phylum:	<i>Basidiomycota</i>
Clase:	<i>Urediniomycetes</i>
Orden:	<i>Uredinales</i>
Familia:	<i>Chaconiaceae</i>
Género:	<i>Hemileia</i>
Especie:	<i>Hemileia vastatrix</i> Berk. Broome 1869

### 2.1.2 Epidemiología de la roya del café

Las condiciones óptimas para la producción de café son las mismas que se requieren para el desarrollo de la roya, con una temperatura promedio de 22°C y una disminución en la diferencia entre temperaturas diarias máximas y mínimas (amplitud térmica) debidas al cambio climático (Rivillas O., 2015).

Avelino y Rivas (2013) sugieren que 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 gran capacidad de producción de esporas de una sola lesión, explica que, aun teniendo muy poco inóculo primario, éste sea capaz de originar una epidemia severa, si, posteriormente, se dan las condiciones adecuadas para la repetición del ciclo. En los países de influencia tropical, donde existe una sola época de lluvias, se describen cuatro fases de la epidemia en Centroamérica: una primera fase de desarrollo lento, generalmente observada entre mayo y julio, una segunda fase de crecimiento acelerado entre agosto y febrero, hasta llegar al máximo de infección (tercera fase) y finalmente una fase de descenso. La intensidad del ataque de una enfermedad depende de las interacciones entre el hospedero, patógeno, ambiente y manejo. En el caso de la roya, factores biofísicos, características productivas del hospedero y características de manejo han sido reportadas como precursoras de la epidemia. Aunque se sabe que la agresividad y la virulencia del patógeno puede variar, no se ha documentado las implicaciones epidemiológicas de estas variaciones (Avelino & Rivas, 2013).

## **2.2 El cambio climático y la roya del café en Guatemala**

La variabilidad climática y el cambio climático son una realidad en Centroamérica y en el mundo y tienen impacto sobre el sector agrícola con daños evidentes sobre la producción de alimentos. Los eventos extremos son cada vez más frecuentes (fuertes lluvias, sequías, olas de calor, entre otros) en los países de Centroamérica se prevé que para el año 2030 el aumento en la temperatura media anual de 1.4°C en promedio y para el año 2050 disminución de la precipitación anual de 70 mm, lo que afectará severamente al sector agricultura (Villarreyña Acuña, 2016).

En el caso particular de la roya del café, se ha hecho 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 complicadas para el cultivo del café, reducción de calidad y problemas relacionados con la fisiología, las plagas y enfermedades, especialmente roya del café y la broca por los cambios de incidencia bruscos que podrían presentar, los que podrían ser determinantes en la desaparición del cultivo en las áreas más bajas y a menos que se hagan esfuerzos para fortalecer la capacidad de adaptación es probable que haya grandes pérdidas económicas en toda la cadena productiva del café. (Avelino & Rivas, 2013).

Orozco (2015), menciona que lo ocurrido en Guatemala del año 2010 al 2013 con la roya del café, ha sido la acumulación de varios acontecimientos años atrás, donde no se prestó la debida atención. De acuerdo a los registros, en algunas localidades productoras de café, se ha duplicado la precipitación en relación con otros años, se cuantifican menos horas de radiación solar, variación de temperatura, humedad relativa alta y prolongada (90% durante mucho tiempo), por ello el cambio climático debe ser estudiado y relacionado con las enfermedades del café. El cambio del tiempo y del clima modifica el ambiente en donde se produce el café, se incrementan las poblaciones de fitopatógenos y se favorece el desarrollo de enfermedades, se modifica la biología del cultivo y desarrollo general, floración, fructificación, cosecha, requerimientos nutricionales y resistencia a enfermedades.

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

El principal método de manejo de plagas y enfermedades de los cultivos ha sido el control químico, sin embargo, problemas de contaminación ambiental impactando negativamente la biodiversidad de los agroecosistemas, seguridad y salud pública, inherentes a la fabricación y uso inadecuado de los agroquímicos, ha conducido a la búsqueda y desarrollo de alternativas ecológicas (Zavaleta-Mejía, 1999).

Los agroquímicos para el control de la roya presentan un gradiente de toxicidad, precio y efectividad, entre ellos están los preventivos como el caldo sulfocálcico a base de azufre y cal, que es el menos tóxico y permite alguna protección contra la infección de las hojas cuando no han sido infectadas previamente. Los compuestos que utilizan cobre dan mayor protección contra ataque de hongos, sin embargo, son más tóxicos al inhalarlos (cuando se preparan o aplican las mezclas), al contacto con la piel y son nefastos para la vida acuática; los compuestos más utilizados son el oxiclورو de cobre, el caldo Bordelés a base de sulfato de cobre y el caldo Visosa a base de cobre, zinc, magnesio, boro, urea y cal, que ha resultado muy efectivo por su aporte a la nutrición mineral. Este tipo de compuestos deben ser usados como preventivos, ya que una vez infectada la hoja, no pueden detener la infección. Los compuestos más tóxicos y más caros son los sintéticos de acción sistémica, detienen el proceso de infección y sólo son efectivos aplicados en etapas tempranas, su aplicación en etapas avanzadas sólo contamina el ambiente y produce pérdidas económicas (Hernández-Martínez & Velázquez-Premio, 2016).

En la agricultura moderna, se ha soslayado la sostenibilidad de la productividad agrícola. El uso de agroquímicos ha permitido obtener incrementos substanciales en la producción; no obstante, sus efectos adversos están impactando de manera significativa la sostenibilidad de la agricultura. La práctica del monocultivo y la contaminación por el uso indiscriminado de agroquímicos ha reducido la biodiversidad de los agroecosistemas, causando la inestabilidad de los mismos, la cual se manifiesta en una mayor incidencia de plagas y enfermedades en los cultivos. Así surge el interés por el control ecológico que puede definirse como: “cualquier forma de control que reduce la incidencia y severidad de la enfermedad, o incrementa la producción del cultivo, aún cuando no haya aparentemente un efecto significativo en la reducción de la enfermedad o inóculo y su impacto nocivo en el ambiente sea mínimo o nulo” (Zavaleta-Mejía, 1999).

Una alternativa relativamente poco estudiada para el manejo de la roya del café es el control biológico utilizando especies del microbioma foliar del café, ésta alternativa se encuentra en fase experimental pues el desarrollo de productos de control biológico requiere de estudios sobre la ecología y biología de los agentes de control biológico en condiciones naturales, incluyendo su interacción con el ambiente y organismo que se quiere controlar. Estos estudios usualmente toman varios años, pero tienen el potencial de proveer soluciones a largo plazo y sobre todo son amigables con el ambiente y las personas. El control biológico de la roya del café podría ser particularmente importante en sistemas de producción orgánica o con bajo uso de fungicidas. Por ejemplo, la aplicación en campo de hongos con capacidad de controlar biológicamente roya del café no sería compatible con alto uso de fungicidas químicos ya que estos además de afectar a la roya, afectarían al agente de control biológico. El uso de control biológico puede considerarse imperativo en el caso de producción de cafés especiales donde se prohíbe el uso de plaguicidas. Diversas son las estrategias de control biológico que pueden ser utilizadas y una selección de las mismas dependerá de factores como objetivos, a qué tipo de recursos naturales se tiene acceso, infraestructura y recursos financieros (Mejía, 2015).

#### **2.4 Control biológico aplicado a la roya del café**

El control biológico 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, sostenible y como una solución a los problemas generados por el uso desmedido a través de los años de plaguicidas, 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 micoparasitismo, lisis enzimática, e inducción de resistencia (Cook & Baker, 1983). El control biológico de organismos tipo roya ha sido evaluado en muchos cultivos con buenos resultados y en el caso del café se han usado hongos y bacterias para su control (Haddad, Saraiva, Mizubuti, Romeiro, & Maffia, 2014) (Vandermeer, Perfecto, & Liere, 2009) (Canjura Saravia, Sánchez Garita, Krauss, & Somarriba, 2002) (González & Surís, 2007) (Díaz-Vicente, y otros, 2014) (Alvarez Valenzuela, Santos Bravo, & Centes Carrillo, Extracción y formulación artesanal de *Cladosporium uredinicola* biocontrolador de *Puccinia horiana*, 2015) (Carrión, 1988).

Tres tipos o estrategias de control biológico son generalmente reconocidas en la literatura y todas tienen potencial de ser utilizadas exitosamente en el control biológico de la roya del café (Mejía, 2015):

- a) Control biológico clásico: comprende el uso de un agente de control biológico que proviene del mismo sitio de origen y que ha coevolucionado con el organismo que se quiere controlar.
- b) Control biológico aumentativo: implica la detección de enemigos naturales del organismo que se quiere controlar en sitios diferentes a su lugar de origen y el posterior aumento de los niveles del mismo en áreas seleccionadas para que los mismos supriman las actividades o poblaciones del organismo a ser controlado.
- c) Control biológico mediante conservación: involucra el manejo del ambiente para incrementar la sobrevivencia, capacidades fisiológicas y/o efectividad de los agentes de control biológico sobre el organismo objetivo en un área específica.

#### **2.4.1 Enemigos naturales de la roya del café**

Vandermeer (2009) y Rolz (2013) mencionan la importancia de los enemigos naturales en el filoplano [microambiente en la superficie de la hoja] por varios autores: Blakeman y Fokkema (1982), Kushalappa y Eskes (1989), Andrews (1992). Uno de esos enemigos sugiere que es el hiperparásito, *Lecanicillium lecanii* [previamente conocido como *Cephalosporium lecanii*, parte de lo que fue identificado como el complejo de especies de *Verticillium lecanii* (Zare & Gams, 2001)], conocido por colonizar a *H. vastatrix* bajo condiciones de laboratorio (Eskes, Mendes, & Robbs, 1991), (Carrión, 1988), Carrión y Ruiz-Berlín (1988), Leguizamón (1989), Alarcón y Carrión (1994), Vélez (1995), Rivas (1996) y Carrión (1999). En Guatemala, Arriola (1998) aisló de lesiones de *H. vastatrix* en el campo los hongos siguientes: *Aphanocladium meliolarae*, *Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium leptobactum* y *Verticillium* sp. En Xalapa, Veracruz, Carrión y Rico-Garay (2002) aislaron los hongos siguientes: *Acremonium byssoides*, *Calcarisporium arbuscula*, *C. ovalisporum*, *Sporothrix guttuliformis* y *Fusarium pallidoroserum* (Rolz, De León, & Paniagua, 2013).

## 2.5 *Cladosporium hemileiae* biocontrolador de *Hemileia vastatrix*

Alvarez (2015), realizó la bioprospección de hiperparásitos de *Hemileia vastatrix* en la zona central de Guatemala, los resultados determinaron que *Cladosporium hemileiae* Steyaert (*Digitopodium* U. Braun, Heuchert & K. Schub., gen. nov.) (Heuchert, Braun, & Schubert, 2005) es hiperparásito de la roya del café y un potencial biocontrolador.

García et al (2005) menciona que entre sus características, *C. hemileiae* tiene abundante micelio de coloración oscura desarrollado sobre las pústulas de roya, el hongo penetra y colapsa la pared celular de las uredosporas, disminuyendo la cantidad de inóculo e inhibiendo el crecimiento y desarrollo de la roya. La Figura 1 muestra micelio de *C. hemileiae* sobre *H. vastatrix*, en vista macro y microscópica.

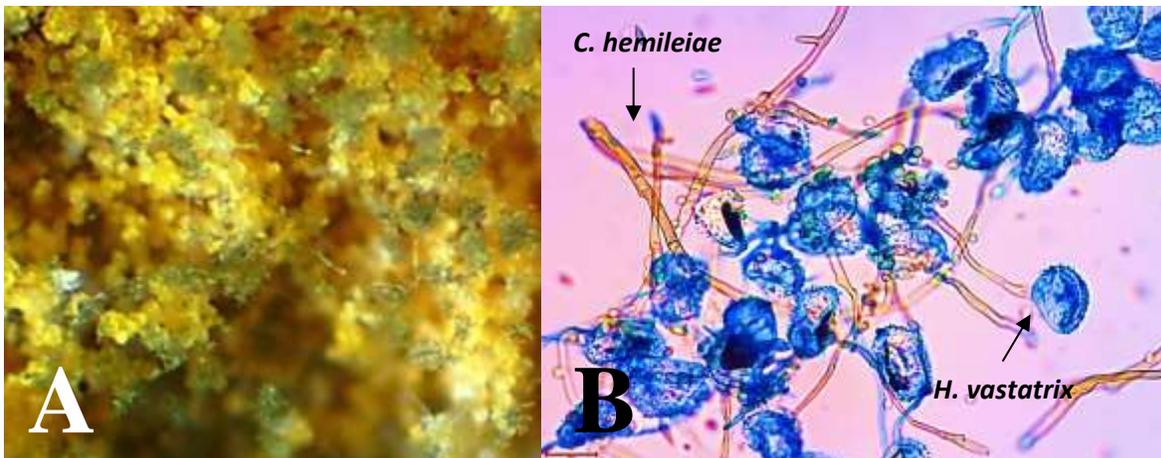


Figura 1: A. *C. hemileiae* (micelio oscuro) parasitando *H. vastatrix*, B. Vista microscópica de *C. hemileiae*, se observa colapso de uredosporas de *H. vastatrix*. Fuente: Alvarez, 2015.

## 2.6 Tecnologías para producción de hongos biocontroladores

### 2.6.1 Tecnologías básicas

Los métodos de producción varían considerablemente, muchos están basados en fermentaciones sobre sustrato sólido con granos de cereales donde el arroz es el más universal, otros usan sustratos no nutritivos como gránulos de arcilla, algunos rinden conidios aéreos en la superficie de cultivos líquidos estáticos, otras tecnologías se desarrollan en tanques de fermentación para obtener productos a base de micelio, blastosporas o conidios sumergidos (Elósegui Claro, 2006).

Según Elósegui (2006), existen 4 formas de producción para hongos:

1. Cultivos bifásicos: se desarrolla el inóculo en cultivo líquido agitado (de forma rápida) o líquido estático (más lento) y luego se pasa al soporte sólido. En los sistemas

bifásicos siempre se debe optimizar el cultivo de la fase líquida para que promueva un rápido crecimiento del aislado. Es el más usado a nivel mundial por obtenerse estructuras infectivas de alta calidad y acortarse el tiempo cuando la fase líquida se hace por cultivo líquido agitado, son semiartesanales.

2. Cultivos sobre soporte sólido: se requiere menos equipamiento y se realizan muchas operaciones manuales y se obtiene estructuras infectivas de alta calidad a concentraciones altas, son artesanales.
3. Cultivos líquidos agitados o fermentaciones líquidas: requieren de un grado de automatización que puede ser muy alto, son muy rápidos, pero tienen como desventaja el que muchos aislados tienden a crecer como pellets miceliales discretos y/o forman abundantes blastosporas (esporas formadas propagadas por germinación a partir de fragmentos de micelio original), que no son apropiadas por la baja estabilidad intrínseca y poseer bajo o nulo poder infectivo. Estos sistemas logran un óptimo aprovechamiento de los nutrientes y pueden llegar a niveles industriales.
4. Cultivos líquidos estáticos: los que constituyen una forma de producción donde se requiere menos equipamiento y se realizan muchas operaciones manuales, pero se obtiene estructuras infectivas de alta calidad a concentraciones bajas pues solamente hay formación de estructuras deseadas en la interface líquido-gaseosa, son artesanales completamente.

## 5. Hipótesis

Se puede producir *C. hemileiae* utilizando un sustrato natural y en forma artesanal para utilizarlo como biocontrolador de *H. vastatrix*.

## 6. Objetivos

### 6.1 General

- a. Obtener un producto de control biológico específico para *H. vastatrix* con tecnología básica formulado a base de *C. hemileiae*.

### 6.2 Específicos

- a. Obtener un sustrato eficaz para la propagación masiva de *C. hemileiae*
- b. Establecer la prevalencia de cepas de *C. hemileiae* sobre la roya del café.

## 7. Materiales y métodos

### 7.1 Descripción y delimitación en tiempo y espacio de la propuesta

La investigación se desarrolló de febrero a noviembre del 2016, en dos fincas de socios de la Asociación de Reservas Naturales Privadas de Guatemala (ARNPG), ubicadas en Villa Canales, Guatemala y San Miguel Dueñas, Sacatepéquez.

### 7.2 Localización geográfica

La tabla 1 muestra las coordenadas donde se realizaron los experimentos, los datos se obtuvieron en formato UTM (Universal Transversa Mercator) con el equipo GARMIN GPSMAP@62sc, como se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 1

*Coordenadas de los sitios de donde se realizaron los experimentos.*

Localidad	Coordenadas UTM	Altura (msnm)*
Finca Morán, Villa Canales, Guatemala.	N 14.49706 W 90.53359	1201 msnm
Finca San Sebastián, San Miguel Dueñas, Sacatepéquez	N 14.51618 W 90.80862	1431 msnm

Nota: \*msnm = metros sobre el nivel del mar

### 7.3 Tipo de investigación

Esta investigación es aplicada y experimental de seguimiento, dados los hallazgos obtenidos en dos proyectos anteriores con la finalidad de generar tecnología aplicada al biocontrol de la roya, que es una enfermedad de alto impacto en el agro nacional en estos momentos. El estudio se realizó de febrero a noviembre de 2016, en tres etapas de trabajo las cuales fueron:

- Fase de laboratorio: producción masiva del *C. hemileiae* por fermentación sólida y sus controles de calidad.
- Fase campo: pruebas de capacidad como biocontrolador de *C. hemileiae*, toma de muestras de hojas de plantas de café para contabilizar la prevalencia del biocontrolador en *H. vastatrix*.

- Fase de gabinete: obtención de datos para las variables de respuesta. La fase de laboratorio comprenderá de febrero a octubre, fase de campo iniciara en marzo y se intensificará de abril a octubre y la fase de gabinete iniciara de marzo a noviembre.

## **7.4 Técnicas e instrumentos**

### **7.4.1 Obtención de cepas**

Alvarez (2015) en el estudio “Bioprospección de hiperparásitos de *Hemileia vastatrix* en Reservas Naturales Voluntarias con café” seleccionó las cepas con potencial de sobre *H. vastatrix*, las cuales fueron conservadas y para el presente estudio se repicaron y propagaron en medios Agar-Agua y PDA.

### **7.4.2 Evaluación de sustratos de crecimiento masivo**

Se evaluaron tres sustratos, arroz blanco, arroz precocido y maíz amarillo quebrado, se utilizaron tres cepas, Guardabarranca, Morán y San Sebastián en tres períodos de incubación, siete, 14 y 21 días.

### **7.4.3 Procedimiento experimental**

1. El arroz blanco, el arroz pre cocido y el maíz amarillo quebrado se lavaron con agua corriente para remover el polvo y luego se sumergieron en una solución de 500ppm de Tetraciclina por 45 minutos para evitar crecimiento bacteriano.
2. Los sustratos se esterilizaron en tres momentos con distintos parámetros:
  - a. Primera esterilización: 300 g de cada sustrato en beakers de 1 L con 300 cc de agua destilada estéril por 15' a 121 °C y 20 PSI, luego de esterilizados se extendieron los granos en bandejas para dejarlos enfriar durante 24 horas.
  - b. Segunda esterilización: se colocaron los sustratos nuevamente en los beakers de 1 L, sin agregar agua por 15' a 121 °C y 20 PSI, luego de esterilizados se extendieron los granos en bandejas de plástico para dejarlos enfriar durante 24 horas.
  - c. Tercera esterilización: los sustratos se colocaron en bolsas de nylon calibre tres y se esterilizaron por 10' a 121 °C y 20 PSI, se dejaron enfriar durante 24 h y posteriormente se inocularon.

3. Los sustratos estériles se inocularon con cada una de las cepas seleccionadas a densidad de  $1 \times 10^6$  UFC/ml de *C. hemileiae* en suspensión.
4. Se incubaron durante tres días a 25 °C, una vez esporulado se trasladó el contenido de las bolsas a bandejas plásticas para favorecer la aireación y mantener la temperatura entre 18 y 22 °C en oscuridad para favorecer el proceso de esporulación hasta los 21 días.
5. Se realizó el conteo de conidiosporas y control de calidad a las cepas a los siete, 14 y 21 días y se evaluó el período de formación óptimo de conidios en cada uno de los sustratos.

#### **7.4.4 Control de calidad para formulaciones biológicas**

##### **7.4.4.1 Germinación de esporas**

La prueba estableció la viabilidad del hongo. Se prepararon cajas Petri con agar-agua y se definieron cuatro puntos en los cuales se depositaron alícuotas de 5  $\mu$ l, se incubaron a 25°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se agregó una gota de azul de lactofenol a cada punto de inoculación para detener la germinación y ayudar a teñir las esporas del hongo. Se realizó conteo en los cuatro discos de agar donde fueron depositadas las alícuotas, estos se cortaron y colocaron sobre portaobjetos y se observaron en 40x y se contaron 100 conidios (germinados y no germinados), con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de germinación.

##### **7.4.4.2 Prueba de pureza**

Esta prueba tuvo como fin establecer la proporción del agente biológico en la formulación e identificar los microorganismos contaminantes, contribuyendo a mejorar el proceso de producción y formulación de los hongos. Se tomaron nuevamente las diluciones preparadas para el conteo de conidiosporas y se sembraron alícuotas de 0.1 ml en cajas Petri con PDA realizándoles un estriado; las cajas inoculadas se incubaron a 25°C. Se cuantificó la cantidad de unidades formadoras de colonia (UFC) diariamente por 7 días y con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de pureza.

#### **7.4.5 Aplicación en campo**

El sustrato con mayor producción conidios/gramo y porcentaje de viabilidad fue seleccionado para la aplicación en campo. Se utilizó el diseño de bloques al azar con cuatro tratamientos (T1=cepa 1 dosis alta, T2=cepa 2, dosis alta, T3=cepa1 dosis baja, T4=cepa 2 dosis baja) y un testigo absoluto que fue lo que el productor hace en campo. Las dosis a evaluar fueron:  $1.10 \times 10^9$  UFC/g (100g de producto en 16 litros de mezcla) y  $2.15 \times 10^9$  UFC/g (200g de producto en 16 litros de mezcla) y el testigo, todos con cinco repeticiones. La evaluación en campo se realizó en época seca (abril) y época de lluviosa (julio), la parcela bruta fue de 50 m<sup>2</sup> (25 plantas) y parcela neta 10 m<sup>2</sup> (5 plantas).

##### **7.4.5.1 Toma de datos de frecuencia de presencia**

Se extrajeron 15 hojas de los cuatro puntos cardinales, cinco por cada estrato (bajo, medio y alto) para dar representatividad a las muestras, las lecturas se realizaron durante 3 semanas.

##### **7.4.5.2 Definición de variables**

Debido a que se efectuó el proyecto en laboratorio y campo se tuvo diferentes variables para cada una de las etapas. Las variables a obtener en laboratorio fueron: concentración de esporas en cada sustrato, porcentaje de viabilidad (germinación de esporas), porcentaje de pureza y número de días óptimo para aplicación en campo. La variable de campo fue: frecuencia de presencia de *C. hemileiae* sobre *H. vastatrix* en las pústulas de las hojas seleccionadas en campo.

#### **7.5 Análisis de la información**

##### **7.5.1 Sustratos de crecimiento**

Los datos obtenidos de la producción de conidiosporas de los tres sustratos, las tres cepas y los tres momentos de lectura se arreglaron factorialmente (3x3x3), se realizó análisis de varianza con prueba de medias Tukey a nivel de significancia del 5% para establecer diferencias significativas entre los tratamientos evaluados con el programa InfoStat® versión 2016.

### 7.5.2 Aplicación en campo

Los datos obtenidos de la frecuencia de presencia fueron analizados descriptivamente (media y desviación estándar).

Tabla 2  
*Operacionalización de las variables*

<b>Objetivo</b>	<b>Variable</b>	<b>Definición teórica de la variable</b>	<b>Definición operativa</b>	<b>Técnica</b>	<b>Instrumento</b>	<b>Escala de medición</b>
Determinar un sustrato eficaz para la propagación masiva de <i>C. hemileiae</i>	Concentración de conidios	Número de conidios por gramo de sustrato	Conteo en cámara Neubauer	Conteo	Cámara de Neubauer	Conidios/ gramo de sustrato
	Viabilidad	Número de conidios germinados y no germinados	Conteo de conidios germinados y no germinados en campo visual de 40X	Conteo	Microscopio	Porcentaje %
	Pureza	Proporción del agente biológico en la formulación e identificación de los microorganismos contaminantes	Conteo de UFC y contaminantes en medio de cultivo PDA	Conteo	Microscopio	Porcentaje %
Evaluar la capacidad hiperparasítica de <i>C. hemileiae</i> sobre la roya del café	Frecuencia de <i>C. hemileiae</i> sobre <i>H. vastatrix</i>	Presencia o ausencia de <i>C. hemileiae</i> sobre pústulas de <i>H. vastatrix</i> en hojas seleccionadas	Número de pústulas de roya parasitadas con <i>C. hemileiae</i> en hojas seleccionadas	Conteo	Estereoscopio, microscopio	Número de pústulas de <i>H. vastatrix</i> hiperparasitadas con <i>C. hemileiae</i>

## 8. Resultados

### 8.1 Sustrato eficaz para la propagación masiva de *C. hemileiae*

El sustrato donde desarrollaron dos de las tres cepas (Guardabarranca y Morán), fue en arroz blanco. En arroz precocido y maíz quebrado no se obtuvo crecimiento y la cepa San Sebastián no tuvo crecimiento en ninguno de los tres sustratos.

La producción de conidios de las dos cepas en el arroz blanco se cuantificó a los siete, 14 y 21 días después de sembrado (dds). Los resultados de concentración de conidias obtenidos, fueron analizados con ANDEVA factorial (Apéndice 1) y no se observaron diferencias significativas entre cepas ( $p=0.1634$ ), tiempos ( $p=0.1242$ ) y tampoco hubo interacción cepa-tiempo ( $p=0.6849$ ). En la Tabla 3, se presentan los resultados de las lecturas en cada periodo de tiempo por cepa, la media y de la desviación estándar (DE). En la Figura 1 se muestra la tendencia de producción de conidios de los tratamientos al comparar UFC/g y Cepas/Tiempo.

Tabla 3

*Promedio de esporas por gramo de sustrato de las cepas desarrolladas en arroz blanco durante los períodos evaluados.*

Cepa	Período	Medias (e/g)*	DE (e/g)*
Guardabarranca	siete días	$1.02 \times 10^7$	$2.20 \times 10^7$ ns**
Morán	siete días	$1.13 \times 10^7$	$1.35 \times 10^7$ ns**
Guardabarranca	14 días	$1.03 \times 10^7$	$1.72 \times 10^7$ ns**
Morán	14 días	$1.13 \times 10^7$	$2.24 \times 10^7$ ns**
Guardabarranca	21 días	$1.02 \times 10^7$	$1.02 \times 10^7$ ns**
Morán	21 días	$6.30 \times 10^6$	$4.74 \times 10^6$ ns**

Nota: \*e/g = esporas/gramo. ( $p > 0.05$ ) (C.V.=2.09) límite de confianza al 95%. \*\*ns = no significativo

### 8.2 Control de calidad de los conidios producidos en el sustrato

En la Tabla 4, se presenta el análisis de control de calidad que fue realizado simultáneamente a los siete, 14 y 21 dds demostró que, en las dos cepas producidas, el período óptimo de % de germinación y pureza en arroz blanco es de siete días.

Tabla 4  
Control de calidad (germinación y pureza) de cepas en los distintos períodos de tiempo evaluados.

Cepas/Período de tiempo	7 días %G*	7 días %P**	14 días %G*	14 días %P**	21 días %G*	21 días %P**
Guardabarranca	93%	100%	76%	100%	73%	100%
Morán	96%	100%	84%	100%	96%	100%

Nota: %G\*=Porcentaje de Germinación, %P\*\*=Porcentaje de Pureza

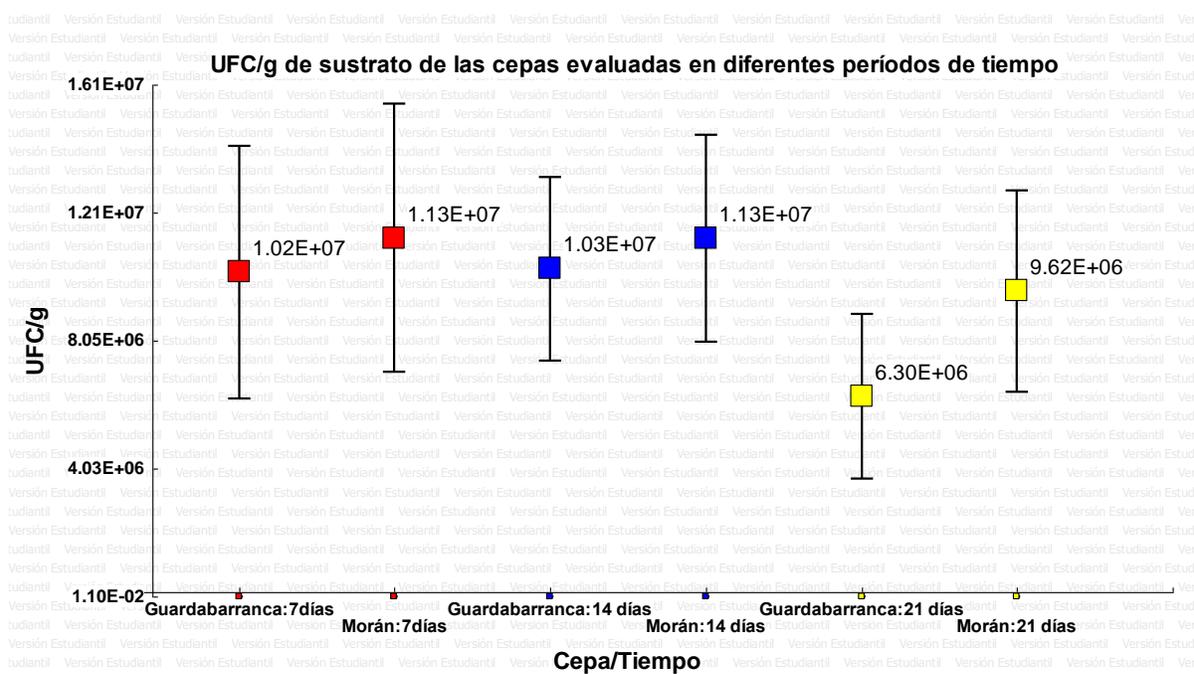


Figura 2. Crecimiento de unidades formadoras de colonia (UFC) de las cepas en arroz blanco durante los períodos de tiempo evaluados.

### 8.3 Aplicación en campo

Se realizaron aplicaciones de las cepas propagadas en época seca y lluviosa, los resultados de los monitoreos se detallan a continuación:

#### 8.3.1 Época seca

La prevalencia de las cepas aplicadas en campo se evidenció en el tercer monitoreo a los 21 días después de la aplicación (dda), cuando se colectaron hojas de café de los diferentes estratos y se examinaron en estereoscopio y microscopio confirmando la presencia o ausencia de *C. hemileiae* hiperparasitando *H. vastatrix*. En la Tabla 5 se muestran las medias de

pústulas de *H. vastatrix* y las medias de pústulas de *H. vastatrix* infectadas por *C. hemileiae* en las dos localidades de aplicación y las dos concentraciones de las cepas aplicadas.

Tabla 5  
Cepas evaluadas en campo en la localidad de Villa Canales y San Miguel Dueñas, lecturas del primer, segundo y tercer monitoreo.

Cepas aplicadas en Villa Canales	Pústulas <i>H. Vastatrix</i> /hoja $\bar{x}$ (DE)			Pústulas infectadas por <i>C. hemileiae</i> $\bar{x}$ (DE)		
	1	2	3	1	2	3
<b>Monitoreos</b>						
<b>Guardabarranca *(d.b.)</b>	0	0	9.76 (20.01)	0	0	0.04 (0.20)
<b>Guardabarranca **(d.a.)</b>	0	0	4.68 (10.46)	0	0	0.20 (0.40)
<b>Morán *(d.b.)</b>	0	0	1.4 (2.40)	0	0	0
<b>Morán **(d.a.)</b>	0	0	1.28 (1.19)	0	0	0
<b>Cepas aplicadas en San Miguel Dueñas</b>						
<b>Monitoreos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Guardabarranca *(d.b.)</b>	0	0	1.76 (5.06)	0	0	0
<b>Guardabarranca **(d.a.)</b>	0	0	0.56 (1.03)	0	0	0
<b>Morán *(d.b.)</b>	0	0	2.24 (5.40)	0	0	0
<b>Morán **(d.a.)</b>	0	0	0.72 (1.09)	0	0	0

Nota: \*(d.b.) = dosis baja, \*\*(d.a.) = dosis alta

### 8.3.2 Época lluviosa

La prevalencia de las cepas aplicadas en campo se monitoreó colectando hojas de café de los diferentes estratos de la planta, se examinaron en estereoscopio y microscopio confirmando la presencia o ausencia de *C. hemileiae* hiperparasitando *H. vastatrix*.

En la Tabla 6 en la localidad de Villa Canales, ambas cepas fueron infectivas en el primer monitoreo, en San Miguel Dueñas ninguna de las dos cepas fue infectiva, en el segundo monitoreo no se evidenció la presencia de *C. hemileiae* sobre *H. vastatrix* con ninguna de las cepas y en las dos localidades, posterior al segundo monitoreo se realizó una segunda aplicación de las cepas y en el tercer monitoreo se evidenció la presencia de las cepas Guardabarranca y Morán en sus dosis altas en la localidad de Villa Canales y la cepa Morán en sus dosis baja y alta en la localidad de San Miguel Dueñas.

Tabla 6  
*Cepas evaluadas en campo en la localidad de Villa Canales y San Miguel Dueñas, lecturas del primer, segundo y tercer monitoreo.*

Cepas aplicadas en Villa Canales	Pústulas <i>H. Vastatrix</i> /hoja			Pústulas infectadas por <i>C. hemileiae</i>		
	$\bar{x}$ (DE)			$\bar{x}$ (DE)		
Monitoreos	1	2	3	1	2	3
Guardabarranca *(d.b.)	12.71 (8.12)	23.36 (15.29)	14.39 (9.43)	0.95 (1.47)	0	0
Guardabarranca **(d.a.)	15.20 (9.96)	24.56 (12.75)	26.43 (19.58)	0.41 (0.66)	0	0.04 (0.20)
Morán *(d.b.)	17.71 (7.72)	17.29 (6.86)	20.61 (9.99)	0.24 (0.52)	0	0
Morán **(d.a.)	22.45 (25.08)	20.71 (11.16)	16.37 (9.21)	0.15 (0.59)	0	0.12 (0.43)
Cepas aplicadas en San Miguel Dueñas						
Monitoreos	1	2	3	1	2	3
Guardabarranca *(d.b.)	11.65 (6.58)	30.29 (13.11)	23.16 (15.98)	0	0	0
Guardabarranca **(d.a.)	11.12 (7.01)	29.04 (13.74)	20.01 (11.00)	0	0	0
Morán *(d.b.)	10.83 (6.00)	12.67 (8.13)	12.83 (8.35)	0	0	0.17 (0.60)
Morán **(d.a.)	8.32 (3.97)	18.80 (10.98)	32.51 (20.71)	0	0	0.04 (0.20)

Nota: \*(d.b.) = dosis baja, \*\*(d.a.) = dosis alta

#### 8.4 Matriz de resultados

Tabla 7  
*Matriz de resultados del proyecto: Formulación y evaluación de Cladosporium hemileiae biocontrolador de Hemileia vastatrix.*

Objetivos específicos	Resultado Esperado	Resultado Obtenido
Obtener un sustrato eficaz para la propagación masiva de <i>C. hemileiae</i>	Propagación masiva de tres cepas de <i>C. hemileiae</i> en tres sustratos, y tres períodos de producción de conidios/gramo, porcentaje de viabilidad y porcentaje de pureza.	Se realizó la propagación masiva de <i>C. hemileiae</i> en arroz blanco con control de calidad para formulaciones biológicas.
Establecer la capacidad de virulencia de cepas de <i>C. hemileiae</i> sobre la roya del café.	Aplicación en campo de <i>C. hemileiae</i> sobre roya del café, en dos localidades con tres tratamientos y testigo, se evaluó la frecuencia de presencia de <i>C. hemileiae</i> sobre <i>H. vastatrix</i> .	Se evidenció la frecuencia de presencia de <i>C. hemileiae</i> sobre <i>H. vastatrix</i> en las localidades seleccionadas, sin patrón de comportamiento.

#### 8.5 Impacto esperado

Los objetivos propuestos por el estudio fueron completados satisfactoriamente ya que se propagó exitosamente a *C. hemileiae* en uno de los sustratos propuestos y se logró evidenciar la prevalencia de *C. hemileiae* sobre *H. vastatrix* en campo.

Tabla 8

*Impacto esperado del proyecto: Formulación y evaluación de Cladosporium hemileiae biocontrolador de Hemileia vastatrix.*

Impacto esperado	Beneficiario potencial	Indicador verificable
Obtener un sustrato eficaz para la propagación masiva de <i>C. hemileiae</i> y establecer la capacidad de virulencia de cepas de <i>C. hemileiae</i> sobre <i>H. vastatrix</i> .	Productores de café a nivel nacional.	Se realizó la propagación masiva de <i>C. hemileiae</i> en arroz blanco y se evidenció la frecuencia de presencia de <i>C. hemileiae</i> sobre <i>H. vastatrix</i> en Villa Canales, Guatemala y San Miguel Dueñas, Sacatepéquez.

## 9. Análisis y discusión de resultados

Las cepas no se pudieron desarrollar en arroz precocido y maíz quebrado, las cepas Guardabarranca y Morán se propagaron en arroz blanco, la cepa San Sebastián no se propagó en ningún sustrato por lo que quedó descartada, estudios previos (Ottati-de-Lima, y otros, 2010) señalan que el arroz blanco es el medio idóneo para la reproducción masiva de hongos utilizados en control biológico, y la fermentación sólida el método idóneo para la producción de conidiosporas, por la tecnología básica y por bajo costo (Gervais & Molin, 2002).

El ANDEVA factorial y prueba de medias de Tukey no presentó diferencias significativas entre las variables propuestas, sin embargo al graficar los datos de la producción de UFC/gramo con los de cepa/tiempo, se observó en la figura uno que en la primera lectura correspondiente al séptimo día se obtuvo la concentración de  $1.02 \times 10^7 \pm 2.20 \times 10^7$  para Guardabarranca y  $1.13 \times 10^7 \pm 1.35 \times 10^7$  para Morán, a los 14 días la tendencia fue similar y a los 21 días decreció la concentración de esporas, por lo que se pudo establecer que el período óptimo de propagación es a los siete días con un porcentaje de germinación y pureza de 93% y 100% para la cepa Guardabarranca y 96% y 100% para Morán, cumpliendo con los estándares de control de calidad recomendados para la producción de biocontroladores (Centro Nacional de Investigaciones de Café [CENICAFE], 1997).

La aplicación de *C. hemileiae*, en Villa Canales y San Miguel Dueñas en época seca se realizó la última semana de abril bajo las siguientes condiciones climáticas: temperatura promedio 30°C, precipitación pluvial promedio 28.8mm y radiación solar 5.77kWh/m<sup>2</sup>/día y los monitoreos se realizaron las primeras tres semanas de mayo; en los dos primeros monitoreos no se observó presencia de *C. hemileiae* sobre las pústulas de *H. vastatrix* a simple vista *in situ*, por lo que en el tercer monitoreo se colectaron las hojas de la planta de café para ser observadas en estereoscopio y realizar montajes para confirmar la presencia o ausencia de *C. hemileiae* germinando sobre pústulas *H. vastatrix*, resultados positivos se obtuvieron con la cepa Guardabarranca en dosis baja y alta en la localidad de Villa Canales; en la localidad de San Miguel Dueñas no se observó parasitismo de *C. hemileiae* sobre *H. vastatrix*.

La aplicación y monitoreo de biocontroladores en época lluviosa se realizó en el mes de julio bajo las siguientes condiciones climáticas: temperatura promedio 28°C, precipitación pluvial 148mm y radiación solar 5.45kWh/m<sup>2</sup>/día, se colectaron hojas de la planta para ser observadas y establecer la prevalencia de *C. hemileiae* sobre las pústulas de *H. vastatrix*, los

resultados obtenidos en el primer monitoreo muestran germinación de *C. hemileiae* en pústulas de *H. vastatrix* con las cepas Guardabarranca y Morán en dosis baja y alta en la localidad de Villa Canales, en San Miguel Dueñas no se observó germinación de las cepas. En el segundo monitoreo no se observó prevalencia de *C. hemileiae* sobre *H. vastatrix* de ninguna de las cepas en dosis baja y alta ni en las dos localidades. Entre el segundo y tercer monitoreo se efectuó una segunda aplicación con el objeto de documentar el efecto del biocontrolador sobre las pústulas de roya y en el tercer monitoreo se evidenció prevalencia en la localidad de Villa Canales de la cepa Guardabarranca y Morán en sus dosis altas y en la localidad de San Miguel Dueñas se obtuvo resultado positivo con la cepa Morán en sus dosis alta y baja.

Se evidenció la germinación de los biocontroladores en condiciones de campo, sin embargo los resultados obtenidos en el tercer monitoreo de la estación lluviosa nos sugieren que debemos incrementar la concentración del inóculo y la frecuencia de las aplicaciones para que la prevalencia sea mayor. Los resultados de la investigación determinaron que el sustrato efectivo para la reproducción masiva de *C. hemileiae* es el arroz blanco y que su período óptimo de esporulación es a los siete días teniendo % de germinación y pureza aceptables para su formulación y posterior aplicación en campo. Las aplicaciones aunque no tuvieron un efecto significativo sobre la disminución de incidencia y severidad de *H. vastatrix*, indican que *C. hemileiae* puede germinar en distintas condiciones climáticas y se tiene que evaluar nuevas técnicas de protección de conidiosporas (yeso, aceite vegetal), formulación de productos a aplicar en el campo (emulsiones o polvos mojables), mayores concentraciones de inóculo, incremento en la frecuencia de aplicaciones y evaluar momentos óptimos de aplicación en donde la radiación solar no afecte la viabilidad de las esporas.

Durante los monitoreos realizados se observó la presencia de *Lecanicillium lecanii* y *Mycodiplosis sp.* de manera constante en la época seca y lluviosa en las localidades donde se realizaron los monitoreos.

## 10. Conclusiones

- a. Se obtuvo un producto potencial de control biológico para *H. vastatrix* con tecnología básica formulado a base de *C. hemileiae* y se determinó que las cepas Guardabarranca y Morán pueden ser propagadas masivamente en arroz blanco y el período óptimo de producción de conidiosporas es de siete días.
- b. Se evidenció la capacidad de germinación de *C. hemileiae* sobre *H. vastatrix* en época seca y lluviosa en condiciones de campo, sin embargo deberá probarse el incremento del inóculo de *C. hemileiae* y de la frecuencia de las aplicaciones.

## 11. Referencias

- Alvarez Valenzuela, G. A., Ramírez Barillas, S. S., & Escobar Sandoval, J. M. (2015). Bioprospección de hiperparásitos de *Hemileia vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café. (Informe de proyecto 4.8.63.7.30) Guatemala: Dirección General de Investigación.
- Alvarez Valenzuela, G. A., Santos Bravo, M. C., & Centes Carrillo, L. F. (2015). Extracción y formulación artesanal de *Cladosporium uredinicola* biocontrolador de Puccinia horiana. (Informe de proyecto 4.8.63.7.26) Guatemala: Dirección General de Investigación.
- Avelino, J., & Rivas, G. (2013). La roya anaranjada del cafeto. *Hal Archives-Ouvertes*, 48. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Barquero, M. M (2013). Recomendaciones para el combate de la roya del cafeto. ISBN 978-9977-55-045-9 Barva-Heredia.
- Brenner, D. J., Krieg, N. R., & Stanley, J. T. (2005). Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol 2: The Proteobacteria. New York: Springer.
- 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.
- Carrión, G. (1988). Estudios sobre el control biológico de la roya del cafeto mediante *Verticillium lecanii* en México. *Micología Neotropical Aplicada*, 1, 79-86.
- Centro Nacional de Investigaciones de Café [CENICAFE]. (1997). Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos (Primera ed.). (H. F. Ospina Ospina, Ed.) Chinchiná, Caldas, Colombia: CENICAFÉ.
- 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.
- Elósegui Claro, O. (2006). Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. La Habana: Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV).
- Eskes, A. B., Mendes, M. D., & Robbs, C. F. (1991). Laboratory and field studies on parasitism of *Hemileia vastatrix* with *Verticillium lecanii* and *V. leptobactrum*. *Café, cacao, thé*, 35(4), 275-282.
- Fletcher, J., & Wayadane, A. (2002). Bacterias fastidiosas colonizadoras vasculares. *The plant health instructor*, 1-17. doi:10.1094/PHI-I-2009-0323-01

- 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.
- Gervais, P., & Molin, P. (2002). The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2003), 85-101.
- 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.
- Hernández Mansilla, A. A., & Rosón Álvarez, C. (2005). Medios de cultivo para la reproducción masiva de *Aschersonia aleyrodalis* Webber. *Fitosanidad*, 9(4), 21-28.
- Hernández-Martínez, G., & Velázquez-Premio, T. (2016). Análisis integral sobre la roya del café y su control. *Revista Internacional de Desarrollo Regional Sustentable*, 1(1), 92-99. Recuperado de <http://rinderesu.com/index.php/rinderesu/article/view/9>
- Heuchert, B., Braun, U., & Schubert, K. (2005). Morphotaxonomic revision of fungicolous *Cladosporium* species (hyphomycetes). *Schlechtendalia*, 13, 1-78.
- McCook, S. (2009). La Roya del café en Costa Rica: Epidemias, innovación y medio ambiente, 1950-1995. *Revista de Historia*, (59-60), 99-117. doi:1012-9790
- Mejía, L. C. (2015). Seminario científico internacional, manejo agroecológico de plagas y enfermedades del café. *Microbiomas y control biológico como alternativa de manejo de la roya anaranjada del cafeto* (págs. 47-54). Panamá: Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura.
- Morales, C. (2015). Memorias de seminario científico internacional: manejo agroecológico de la roya del café. *Impacto socioeconómico y productivo de la roya del café en los países de la región. Situación actual y perspectivas*. (pág. 6). Panamá: FAO.
- Orozco Miranda, E. F. (2015). Roya del cafeto, manejo integrado y perspectivas de la caficultura en Guatemala. *Memorias del seminario científico internacional: Manejo agroecológico de la roya del café* (págs. 26-34). Panamá: FAO.
- Ottati-de-Lima, E. L., Batista Filho, A., Almeida, J., Gassen, M. H., Wenzel, I. M., de Almeida, A., & Zapellini, L. O. (2010). Produção semissólida de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre propágulos desses entomopatógenos. *Arquivos do Instituto Biológico*, 77(4), 651-659.

- Rivillas, C. A., Serna, C. A., Cristancho, M. A., & Gaitan, A. . L. (2011). La roya del cafeto en Colombia: Impacto manejo y costos del control. *Cenicafé*, 1, 53. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Rivillas O., C. A. (2015). Memorias del seminario científico internacional: Manejo agroecológico de la roya del café. Acciones emprendidas por Colombia en el manejo de la roya del cafeto (págs. 11-16). Panamá: FAO.
- 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.
- Acuña V., Antonio R., Van den Meerseche, K., Rapidel, B. & Avelino, J. (2016). Efecto de los árboles de sombra sobre el suelo, en sistemas agroforestales con café, incluyendo la fenología y fisiología de los cafetos, 1–36.
- Virginio Filho, E. de M., & Astorga, C. (2014). Prevención y control de la roya del café Manual de buenas prácticas para técnicos y facilitadores.
- Zambolim, L. (2015). Memorias del seminario científico internacional: Manejo agroecológico de la roya del café. *La roya del cafeto en Brasil* (págs. 7-10). Panamá: FAO.
- 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.
- Zavaleta-Mejía, E. (1999). Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. *Terra*, 17 (3), 201-207.

## 12. Apéndice

Apéndice 1: ANDEVA factorial realizado a las cepas y períodos de propagación.

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
e/g	30	0.24	0.08	34.55

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

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	85279416666666.70	5	17055883333333.30	1.48	0.2337
Cepa	23852083333333.30	1	23852083333333.30	2.07	0.1634
Tiempo	52557166666666.60	2	26278583333333.30	2.28	0.1242
Cepa*Tiempo	8870166666666.66	2	4435083333333.33	0.38	0.6849
Error	27685800000000.00	24	11535750000000.00		
Total	362137416666667.00	29			

#### Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=2559650.08362

Error: 11535750000000.0020 gl: 24

Cepa	Medias	n	E.E.
Guardabarranca	8940000.00	15	876954.96 A
Morán	10723333.33	15	876954.96 A

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

#### Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=3793205.68536

Error: 11535750000000.0020 gl: 24

Tiempo	Medias	n	E.E.
21 días	7960000.00	10	1074046.09 A
7 días	10745000.00	10	1074046.09 A
14 días	10790000.00	10	1074046.09 A

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

#### Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=6641752.91843

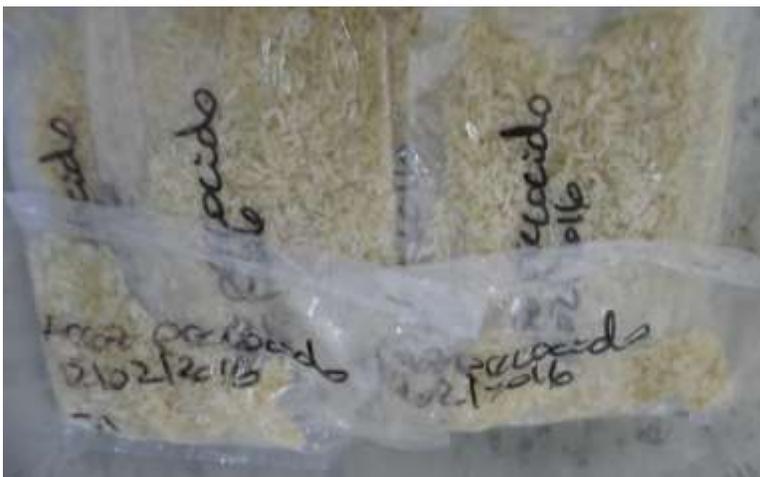
Error: 11535750000000.0020 gl: 24

Cepa	Tiempo	Medias	n	E.E.
Guardabarranca	21 días	6300000.00	5	1518930.54 A
Morán	21 días	9620000.00	5	1518930.54 A
Guardabarranca	7 días	10210000.00	5	1518930.54 A
Guardabarranca	14 días	10310000.00	5	1518930.54 A
Morán	14 días	11270000.00	5	1518930.54 A
Morán	7 días	11280000.00	5	1518930.54 A

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

Apéndice 2: Fotografías de los experimentos realizados durante el proyecto

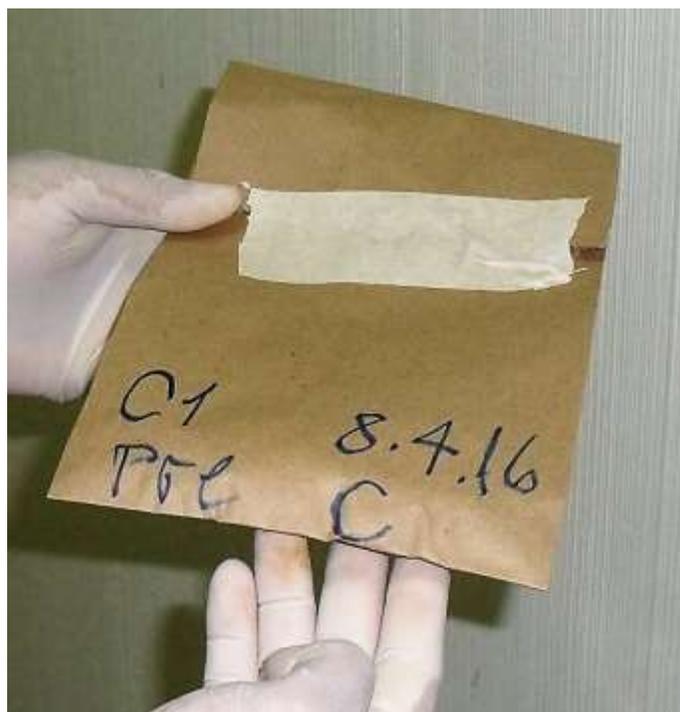
- Sustratos utilizados para propagar *C. hemileiae*, maíz, arroz, arroz precocido.



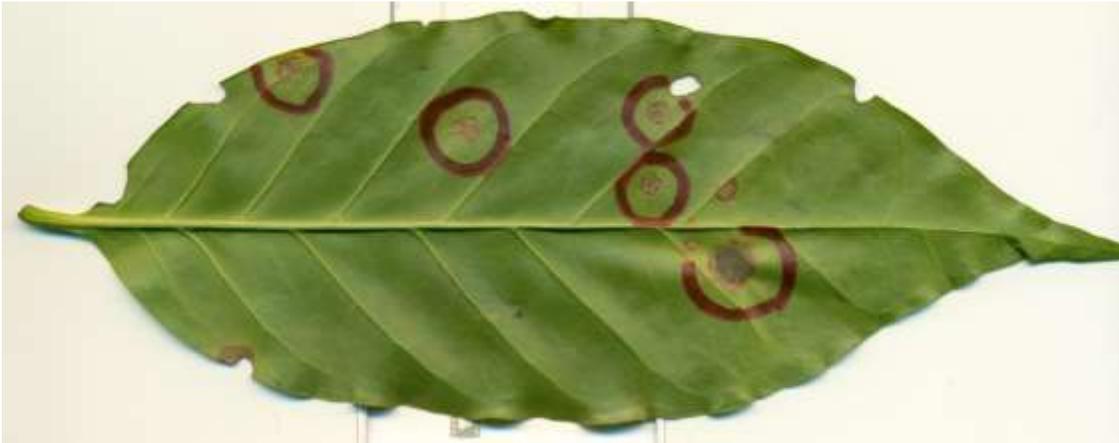
- Sustratos inoculados dispuestos en bandejas para el crecimiento de *C. hemileiae*.



- Sustratos embolsados y listos para su aplicación en campo



- Prevalencia de *C. hemileiae* posterior a la aplicación en campo.



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

La gestión, vinculación y divulgación fueron de la mano con la ejecución del proyecto con el fin de obtener apoyo para continuar con los proyectos de seguimiento. La metodología aplicada fue la realización de informes mensuales y presentación de avances del proyecto a las autoridades y socios de la Asociación de Reservas Naturales Privadas de Guatemala (ARNPG) y a los directivos de la Asociación Nacional del Café (ANACAFE).

#### 14. Orden de pago

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

<b>Contratados por la contraparte y colaboradores</b>	
Ing. Agr. Gustavo Adolfo Alvarez Valenzuela	Coordinador
Ing. Agr. Soren Sherwood Ramirez Barillas	Investigador
P. Agr. José Miguel Escobar Sandoval	Auxiliar de Investigación II

#### CONTRATADOS POR LA DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN

<b>Contratados por la Dirección General de Investigación</b>				
Nombre	Categoría	Registro de personal	Pago	
			Si	No
Gustavo Adolfo Alvarez Valenzuela	Profesor Titular VII (Coordinador)	12935		X
Soren Sherwood Ramirez Barillas	Investigador	20150343	X	
José Miguel Escobar Sandoval	Auxiliar de Investigación II	20151645	X	

<b>Nombre</b>	<b>Firma</b>
Soren Sherwood Ramirez Barillas	
José Miguel Escobar Sandoval	

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

**COORDINADOR**

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

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