

Universidad de San Carlos de Guatemala  
Dirección General de Investigación  
Programa Universitario de Investigación  
Programa Universitario de Investigación en Recursos Naturales y Ambiente

Informe final

**“Formulación y evaluación de *Lecanicillium lecanii* 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

**10 de septiembre 2018**

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

4.8.63.2.04

Año de ejecución: 2017

## Índice

1. Introducción .....	- 3 -
2. Marco teórico y estado del arte .....	- 4 -
2.1 Roya del café ( <i>Hemileia vastatrix</i> Berk & Broome 1869).....	- 4 -
2.2 Taxonomía de la roya del café .....	- 5 -
2.3 Epidemiología de la roya del café .....	- 5 -
2.4 El cambio climático y la roya del café en Guatemala.....	- 6 -
2.5 Manejo de la roya del café .....	- 7 -
2.6 Control biológico aplicado a la roya del café.....	- 8 -
2.7 Enemigos naturales de la roya del café .....	- 9 -
2.8 <i>Lecanicillium lecanii</i> biocontrolador de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	- 10 -
2.9 Tecnologías para producción de hongos biocontroladores .....	- 10 -
2.9.1Tecnologías básicas .....	- 10 -
5. Materiales y métodos .....	- 12 -
5.1 Descripción y delimitación en tiempo y espacio del estudio .....	- 12 -
5.2 Localización geográfica .....	- 12 -
5.3 Tipo de investigación .....	- 12 -
5.4 Técnicas e instrumentos .....	- 13 -
5.4.1Obtención de cepas de <i>L. lecanii</i> .....	- 13 -
5.4.2Evaluación de sustratos de crecimiento masivo .....	- 13 -
5.4.3Procedimiento experimental .....	- 13 -
5.5 Control de calidad para formulaciones biológicas .....	- 14 -
5.5.1Germinación de esporas.....	- 14 -
5.5.2Prueba de pureza.....	- 14 -
5.6 Aplicación en campo.....	- 15 -
5.7 Toma de datos del porcentaje de infección de <i>L. lecanii</i> sobre <i>H. vastatrix</i> .....	- 15 -
5.8 Definición de variables.....	- 15 -
5.9 Análisis de la información.....	- 15 -
5.9.1Sustratos de crecimiento .....	- 15 -
5.9.2Aplicación en campo .....	- 16 -
6. Resultados .....	- 16 -
6.1 Sustrato eficaz para la propagación masiva de <i>L. lecanii</i> .....	- 16 -
6.2 Control de calidad de los conidios producidos en el sustrato .....	- 17 -
6.3 Aplicación en campo.....	- 18 -
6.4 Matriz de resultados .....	- 20 -
6.5 Impacto esperado.....	- 20 -
7. Análisis y discusión de resultados.....	- 21 -
8. Conclusiones .....	- 23 -
9. Referencias .....	- 24 -
10. Apéndice.....	- 28 -
11. Actividades de gestión, vinculación y divulgación.....	- 33 -
12. Orden de pago .....	- 34 -

## Índice de figuras

Figura 1. A) <i>L. lecanii</i> (micelio blanco) parasitando <i>H. vastatrix</i> , B) Vista microscópica de <i>L. lecanii</i> , se observa colapso de uredosporas de <i>H. vastatrix</i> .....	- 10 -
Figura 2. Crecimiento de unidades formadoras de colonia (UFC) de la cepa en los sustratos y períodos de tiempo evaluados. ....	- 18 -
Figura 3. Porcentaje de infección de <i>L. lecanii</i> sobre <i>H. vastatrix</i> durante los siete monitoreos en las dos localidades y las dosis aplicadas.....	- 19 -

## Índice de tablas

Tabla 1: Coordenadas de los sitios de donde se realizaron los experimentos .....	- 12 -
Tabla 2: Promedio de esporas por gramo de sustrato de la cepa San Sebastián, desarrollada en maíz amarillo quebrado, arroz blanco y arroz precocido durante los períodos evaluados.....	- 17 -
Tabla 3: Control de calidad (germinación y pureza) de la cepa en los distintos sustratos y períodos de tiempo evaluados .....	- 17 -
Tabla 4: Promedio de infección de pústulas de <i>H. vastatrix</i> por <i>L. lecanii</i> en los lugares de aplicación y las dosis formuladas.....	- 18 -
Tabla 5: Cepa evaluada en campo en la localidad de Villa Canales y San Miguel Dueñas, porcentaje de infección de <i>L. lecanii</i> sobre <i>H. vastatrix</i> en los siete monitoreos realizados.....	- 19 -
Tabla 6: Matriz de resultados del proyecto: Formulación y evaluación de <i>Lecanicillium lecanii</i> biocontrolador de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	- 20 -
Tabla 7: Impacto esperado del proyecto: Formulación y evaluación de <i>Lecanicillium lecanii</i> biocontrolador de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	- 20 -

## Apéndice

Apéndice 1: ANDEVA factorial realizado a las cepas y períodos de propagación. ....	- 28 -
Apéndice 2: ANDEVA factorial realizado a las cepas y períodos de propagación. ....	- 29 -
Apéndice 3: Fotografías de los experimentos realizados durante el proyecto.....	- 30 -

## **“Formulación y evaluación de *Lecanicillium lecanii* biocontrolador de *Hemileia vastatrix*”**

### **Resumen**

En 2015 se reportó presencia *Cladosporium hemileiae* Steyaert y *Lecanicillium lecanii* (Zimmerm.) Zare y Gams como agentes de control biológico para *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., en el informe “Bioprospección de hiperparásitos de *Hemileia vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café”. Con base en ello se realizó la evaluación de *Lecanicillium lecanii* en las localidades de Villa Canales, Guatemala y San Miguel Dueñas Sacatepéquez, se evaluaron las cepas San Sebastián y Corral Viejo recomendadas en la bioprospección antes mencionada, se evaluaron tres sustratos de crecimiento para ambas cepas, arroz blanco, arroz precocido y maíz amarillo quebrado, solo la cepa San Sebastián pudo ser propagada en maíz amarillo quebrado, y se obtuvo mayor concentración de conidios  $1.02 \times 10^8$  ( $9.97 \times 10^1$ ) UFC/g ( $p < .001$ ) en promedio (desviación estándar) a los siete días de cultivo. El control de calidad y los porcentajes de germinación y pureza fueron del 100% en ambos casos. Las aplicaciones en campo determinaron que el porcentaje de infección de *L. lecanii* sobre *H. vastatrix* oscila entre 46% y 65% según la localidad y no existe diferencia significativa entre utilizar dosis de 300 g y 600 g de inóculo con concentración de conidios de  $1.02 \times 10^8$  ( $9.97 \times 10^1$ ) UFC/g ( $p > .05$ ), también se considera que se deben evaluar aplicaciones próximas y posteriores a la cosecha, cuando el inóculo primario permanece latente a la espera de las condiciones ideales para la reproducción de la roya. Considerando el comportamiento de la cepa en ambas localidades también sugiere que deben realizarse nuevas prospecciones para obtener una cepa con mayor virulencia y capacidad de adaptación.

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

## **"Formulation and evaluation of *Lecanicillium lecanii* biocontroller of *Hemileia vastatrix*"**

### **Abstract**

In 2015, *Cladosporium hemileiae* Steyaert and *Lecanicillium lecanii* (Zimmerm.) Zare y Gams presence was reported as biologic control agents for *Hemileia vastatrix* Berk. & Br, on the report "Bio prospection of *Hemileia vastatrix* hyperparasites in voluntary natural reserves with coffee". Based on it, a *Lecanicillium lecanii* evaluation was performed in locations of Villas Canales, Guatemala and San Miguel Dueñas Sacatepéquez, strains from San Sebastián and Corral Viejo were evaluated as a recommendation of the aforementioned bioprospection, three growth substratum were evaluated for both strains, white rice, precooked rice and broken yellow corn, only San Sebastián's strain was spread in broken yellow corn, the biggest concentration of conidia  $1.02 \times 10^8$  UFC/g ( $9.97 \times 10^1$ ) ( $p < .001$ ) in average (standard deviation) seven days after crop. Quality control and percentage of germination and purity were of 100% in both cases. Field applications determined that the percentage of infection of *L. lecanii* over *H. vastatrix* varies between 46% and 65% according to location and there is no significant difference between using 300 g and 600 g dosage of inoculum with conidia concentration of  $1.02 \times 10^8$  UFC/g ( $9.97 \times 10^1$ ) ( $p < .001$ ), it is also considered that the next applications should be evaluated as well as posterior to crop, when the primary inoculum remains latent awaiting for ideal conditions for reproduction of rust. Considering the behavior of the strain in both locations it is also suggested to perform new prospections to obtain a strain with higher virulence and adaptation capacity.

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

## 1. Introducción

Guatemala exporta café con valor neto anual cercano a USD \$1750 millones, 27% de las exportaciones mundiales de café (Morales, 2015). La roya del café fue considerada como problema de urgencia nacional en los países del área el impacto económico, social, políticos y ambientales (Morales, 2015).

Las pérdidas estimadas a nivel centroamericano 2012-2013 fueron aproximadamente 20% según lo reportado por el Programa Cooperativo Regional para el Desarrollo Tecnológico y Modernización de la Caficultura (Promecafé), en Guatemala se perdieron 115,000 empleos, seguidos por Honduras con 100,000, El Salvador con 90,000 (Comisión Pastoral de Movilidad Humana, 2013).

Los fungicidas resultan ineficientes y comprometen la cantidad y calidad de la cosecha y en su conjunto afecta la producción del país (Rivillas, Serna, Cristancho, & Gaitan, 2011).

La alternativa amigable con el ambiente es el control biológico. Los agentes de control biológico tienen cuatro posibles formas de acción, ninguna de las cuales es mutuamente exclusiva: parasitismo (hiperparasitismo), depredación, antibiosis y competencia, (Leguizamón-Caycedo, Vélez-Arango, & González-Serna, 1989). 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 (Alvarez, Santos & Centes, 2015; Canjura, Sanchez, Krauss & Somarriba, 2002; Carrión, 1988; Díaz-Vicente et al., 2014; Gonzalez & Surís, 2007; Haddad, Saraiva, Mizubuti, Romeiro & Maffia, 2014; Vandermeer, Perfecto & Liere, 2009).

*Lecanicillium lecanii* fue reportado por Alvarez, Ramírez, y Escobar (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 *L. lecanii* como potencial biocontrolador de *H. vastatrix*. Se evaluaron las dos cepas promisorias y los métodos de producción con sustrato orgánicos a nivel artesanal de producción para establecer la capacidad reproductiva de *L. lecanii*, además métodos de aplicación y el grado de control que puede alcanzar bajo condiciones naturales sobre la roya del café y la capacidad como biocontrolador para poder incluirlo dentro de programas de manejo integrado del cultivo para alternarlo con el control químico tradicional y así ofrecer una alternativa amigable con el ambiente. Los resultados indican que una de las cepas es

promisoria y que no hay diferencia entre dosis evaluadas lo que si difiere es la capacidad de eficiencia según la región donde fueron evaluadas. Este fenómeno puede deberse a que 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 da mayor prevalencia y severidad de roya (Zambolim, 2015), dicho factor de oscilación pudo haber influido en la eficiencia de *L. lecanii*, ya que el año anterior a la presente evaluación, la roya se manifestó con alta prevalencia con defoliación y según (McCook, 2009) al siguiente año de condiciones de alta incidencia se produce una disminución del rendimiento en las plantaciones que incluye baja cobertura foliar, dicho fenómeno se deriva y de lo que se considera cambio climático y que según 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, esto quiere decir que a medida que el inóculo perceptible.

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

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

La roya, hongo que crece en el tejido parenquimatoso de las hojas y en la superficie produce pústulas de color anaranjado. Cada pústula libera 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 provoca defoliación 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 & Astorga, 2015).

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 (Zambolim, 2015). 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).

## **2.2 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

## **2.3 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, 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).

#### **2.4 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 climáticos 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 (Villareyna, 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, se estima reducción de calidad, 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 climáticos y mutaciones genéticas años atrás, donde no se prestó la debida atención. 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, por ello el cambio climático debe ser estudiado y relacionado con las enfermedades del café. El cambio

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.

## **2.5 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, la contaminación ambiental impactando 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 el tipo de recursos naturales se tiene acceso, infraestructura y recursos financieros (Mejía, 2015).

## **2.6 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 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 (Alvarez, Santos & Centes, 2015; Canjura, Sanchez, Krauss & Somarriba, 2002; Carrión, 1988; Díaz-Vicente et al., 2014; Gonzalez & Surís, 2007; Haddad, Saraiva, Mizubuti, Romeiro & Maffia, 2014; Vandermeer, Perfecto & Liere, 2009). 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.

## **2.7 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 (Alarcón & Carrión, 1994; Carrión, 1988, 1999; Carrión & Ruiz-Berlin, 1988; Eskes, Mendes & Robbs, 1991; Leguizamón, 1989; Rivas, 1996, Veles, 1995).

En Guatemala, Arriola (1998) aisló de lesiones de *H. vastatrix* en el campo los hongos siguientes: *Aphanocladium meliolae*, *Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium leptobactum* y *Verticillium* sp. En Xalapa, Veracruz en 2002 se aislaron *Acremonium byssoides*,

*Calcarisporium arbuscula*, *C. ovalisporum*, *Sporothrix guttuliformis* y *Fusarium pallidoroserum* (Rolz, De León, & Paniagua, 2013).

## 2.8 *Lecanicillium lecanii* biocontrolador de *Hemileia vastatrix*

Alvarez, Santos y Centes, (2015), realizaron la bioprospección de hiperparásitos de *Hemileia vastatrix* en la zona central de Guatemala, los resultados determinaron que *Lecanicillium lecanii* (Zimmerm.) (Zare & Gams, 2001) es hiperparásito de la roya del café y un potencial biocontrolador.

*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 1 muestra micelio de *L. lecanii* sobre *H. vastatrix*, en vista macro y microscópica.

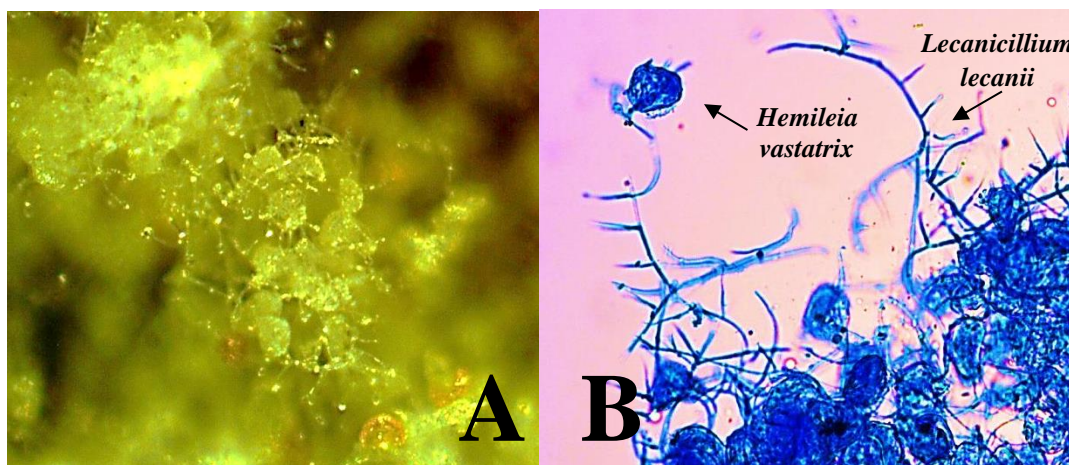


Figura 1. A) *L. lecanii* (micelio blanco) parasitando *H. vastatrix*; B) Vista microscópica de *L. lecanii*, se observa colapso de uredosporas de *H. vastatrix*. Fuente: Alvarez, Santos, y Centes, (2015).

## 2.9 Tecnologías para producción de hongos biocontroladores

### 2.9.1 Tecnologías básicas

Los métodos de producción de biocontroladores varían considerablemente, varios se basan en fermentaciones sólidas y líquidas, las sólidas sobre sustratos como cereales, de los cuales el arroz es el más común; otros usan sustratos de tipo orgánico como restos de tejidos vegetales como lo son las mazorcas de maíz, el bagazo de la caña, pulpa de café etc., no nutritivos como gránulos de arcilla, algunos producen 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, 2006).

Según Elósegui (2006), existen 4 formas de producción de 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 corto periodo cuando 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 comprimidos 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. Materiales y métodos

### 5.1 Descripción y delimitación en tiempo y espacio del estudio

El estudio se realizó de febrero a octubre de 2017, la reproducción masiva se realizó en el Centro de Diagnóstico Parasitológico, de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala (CDP–Fausac), las aplicaciones de campo se realizaron de julio a octubre en Villa Canales, Guatemala y San Miguel Dueñas, Sacatepéquez.

### 5.2 Localización geográfica

La tabla 1 muestra las coordenadas donde se realizaron las aplicaciones de campo, 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.*

<b>Localidad</b>	<b>Coordenadas (grados decimales)</b>	<b>Altura (msnm)*</b>
Finca Morán, Villa Canales, Guatemala.	14.49706, -90.53359	1201 msnm
Finca San Sebastián, San Miguel Dueñas, Sacatepéquez	14.51618, -90.80862	1431 msnm

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

### 5.3 Tipo de investigación

La investigación es cuantitativa, 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 2017, en tres etapas de trabajo las cuales fueron:

- Fase de laboratorio: producción masiva del *L. lecanii* por fermentación sólida y sus controles de calidad.
- Fase de campo: pruebas de capacidad como biocontrolador de *L. lecanii*, toma de muestras de hojas de plantas de café para establecer el porcentaje de infección de *L. lecanii* sobre *H. vastatrix*.
- Fase de gabinete: obtención de datos para las variables de respuesta comprendida de marzo a noviembre.



## **5.4 Técnicas e instrumentos**

### **5.4.1 Obtención de cepas de *L. lecanii***

Alvarez, Ramírez y Escobar (2015) colectaron muestras durante la época seca y lluviosa en 10 fincas con reserva natural, dando como resultado la obtención de cepas sobre la roya del café de *Lecanicillium lecanii* (Zimmerm.), del cual se obtuvo 11 cepas, la caracterización de las cepas se hizo morfológicamente con las claves y descripción de Zare y Gams (2001).

### **5.4.2 Evaluación de sustratos de crecimiento masivo**

Se evaluaron tres sustratos; arroz blanco, arroz precocido y maíz amarillo quebrado. Se utilizaron dos cepas; San Sebastián y Corral Viejo en tres períodos de incubación, siete, 14 y 21 días, se arreglaron factorialmente (3x2x3) y se realizaron cinco repeticiones por factor. Previo a la inoculación, los sustratos fueron tratados con antibiótico y esterilizados en tres etapas a 121 °C, 20 PSI como lo sugiere Elósegui (2006). Posterior a la esterilización se inoculó una concentración de conidios de  $1 \times 10^6$  UFC/ml de *L. lecanii* en suspensión, se incubaron durante tres días a 25 °C, posteriormente se colocaron en bandejas a una temperatura entre 18 y 22 °C en oscuridad para favorecer el proceso de crecimiento y esporulación, se efectuaron 15 repeticiones por tratamiento y se realizó el conteo de conidiosporas y control de calidad estandarizado por el Centro Nacional de Investigaciones del Café (Cenicafé) (1997).

### **5.4.3 Procedimiento experimental**

1. El arroz blanco, el arroz precocido y el maíz amarillo quebrado se lavaron con agua corriente para remover el polvo y luego se sumergieron en una solución de 500 ppm 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 1L con 300 cc de agua destilada estéril por 15 minutos 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 1L, sin agregar agua por 15 minutos 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 minutos 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 *L. lecanii* 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.

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

### **5.5.1 Germinación de esporas**

La prueba de germinación de esporas 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 µl, se incubaron a 25 °C durante 24 h. 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 en el microscopio y se contaron 100 conidios (germinados y no germinados), con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de germinación.

### **5.5.2 Prueba de pureza**

La prueba de pureza estableció 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.

## **5.6 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 dos tratamientos (T1 = dosis baja, T2 = dosis alta) y un testigo absoluto que fue lo que el productor hace en campo. Las dosis evaluadas fueron:  $1.63 \times 10^{10}$  UFC/g (300 g de producto en 16 L de mezcla) y  $3.26 \times 10^{10}$  UFC/g (600 g de producto en 16 L de mezcla) y el testigo, todos con cinco repeticiones, a la mezcla de cada dosis se adicionaron los siguientes coadyuvantes: Tween 20 como dispersante, glicerina como humectante y goma arábica como adherente natural. La evaluación en campo se realizó de julio a octubre, la parcela bruta fue de  $50 \text{ m}^2$  (25 plantas) y parcela neta  $10 \text{ m}^2$  (cinco plantas).

## **5.7 Toma de datos del porcentaje de infección de *L. lecanii* sobre *H. vastatrix***

Se extrajeron 15 hojas de los cuatro puntos cardinales, cinco por cada estrato (bajo, medio y alto) los monitoreos se realizaron cada 15 días durante 4 meses.

## **5.8 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 obtenidas 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: porcentaje de infección de *L. lecanii* sobre *H. vastatrix* en las pústulas de las hojas seleccionadas en campo.

## **5.9 Análisis de la información**

### **5.9.1 Sustratos de crecimiento**

Los datos obtenidos de la producción de conidiosporas de los tres sustratos, las dos cepas y los tres momentos de lectura se arreglaron factorialmente ( $3 \times 2 \times 3$ ), se analizaron descriptivamente por medio de promedios y desviaciones estandar de cada uno de los tratamientos, además de graficas de caja para observar el comportamiento de los mismos. 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 2017 (Apéndice 1).

### 5.9.2 Aplicación en campo

Los datos obtenidos del porcentaje de infección de *L. lecanii* sobre *H. vastatrix* en campo se trataron con análisis de varianza con prueba de Tukey a nivel de significancia del 5% para establecer diferencias significativas entre los tratamientos evaluados con el programa Infostat® versión 2017 (Apéndice 2).

## 6. Resultados

### 6.1 Sustrato eficaz para la propagación masiva de *L. lecanii*

Los resultados de concentración de conidios de la cepa San Sebastián (Tabla 2) procesados con análisis de varianza factorial y prueba de medias de Tukey (Apéndice 1), indican diferencias significativas entre sustratos, tiempos y hubo interacción sustrato-tiempo (maíz amarillo quebrado, arroz blanco y arroz precocido a los siete, 14 y 21 días de sembrado) ( $p < .001$ ). En la Figura 2 se observa el comportamiento de la concentración de conidios en los diferentes sustratos y períodos de tiempo, a los siete días la concentración de conidios en el maíz amarillo quebrado  $1.02 \times 10^8 (9.97 \times 10^1)$  UFC/g es superior a la del arroz blanco  $3.93 \times 10^7 (6.49 \times 10^1)$  UFC/g y arroz precocido  $4.72 \times 10^7 (8.17 \times 10^1)$  UFC/g, a los 14 días empieza a decrecer la concentración en los tres sustratos y a los 21 días continuó con la misma tendencia. En la Tabla 3 se presenta el control de calidad (germinación y pureza) de la cepa, en los tres sustratos y períodos de tiempo evaluados y se observa que a los siete días el porcentaje de germinación y pureza para los sustratos oscilo de la siguiente manera, maíz amarillo quebrado 100%, arroz blanco 100% y arroz precocido 80%, a los 14 y 21 días disminuye el porcentaje de germinación y pureza en los tres sustratos lo que descarta su selección. Con los resultados descritos anteriormente se demuestra que el maíz amarillo quebrado en un período de tiempo de siete días obtiene la mejor concentración de conidios con el 100% de germinación y pureza. La cepa Corral Viejo no se reprodujo en ningún sustrato.

Tabla 2

*Promedio de esporas por gramo de sustrato de la cepa San Sebastián, desarrollada en maíz amarillo quebrado, arroz blanco y arroz precocido durante los períodos evaluados.*

Sustrato	Período	Medias (DE) (e/g)*
Maíz amarillo quebrado	siete días	1.02x10 <sup>8</sup> (9.97x10 <sup>1</sup> )**
Arroz Blanco	siete días	3.93x10 <sup>7</sup> (6.49x10 <sup>1</sup> )
Arroz precocido	siete días	4.72x10 <sup>7</sup> (8.17x10 <sup>1</sup> )
Maíz amarillo quebrado	14 días	7.05x10 <sup>7</sup> (9.78x10 <sup>1</sup> )
Arroz Blanco	14 días	5.69x10 <sup>7</sup> (1.11x10 <sup>2</sup> )
Arroz precocido	14 días	6.32x10 <sup>7</sup> (1.17x10 <sup>2</sup> )
Maíz amarillo quebrado	21 días	3.40x10 <sup>7</sup> (5.39x10 <sup>1</sup> )
Arroz Blanco	21 días	2.61x10 <sup>7</sup> (5.53x10 <sup>1</sup> )
Arroz precocido	21 días	2.01x10 <sup>7</sup> (3.31x10 <sup>1</sup> )

Nota: \*e/g = esporas/gramo. \*\*Interacción sustrato-tiempo ( $p < .001$ ) (C. V.= 26.25). El maíz amarillo quebrado en un período de siete días tuvo resultado significativamente diferente.

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

En la Tabla 3, se presenta el análisis de control de calidad que fue realizado simultáneamente a los siete, 14 y 21 dds que muestra los porcentajes de germinación y pureza de la cepa producida, en los diferentes sustratos.

Tabla 3

*Control de calidad (germinación y pureza) de la cepa en los distintos sustratos y períodos de tiempo evaluados.*

Sustrato/Período de tiempo	7 días %G*	7 días %P**	14 días %G*	14 días %P**	21 días %G*	21 días %P**
Maíz amarillo quebrado	100%	100%	65%	86%	0%	22%
Arroz precocido	88%	100%	61%	100%	6%	28%
Arroz blanco	100%	100%	75%	100%	24%	12%

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

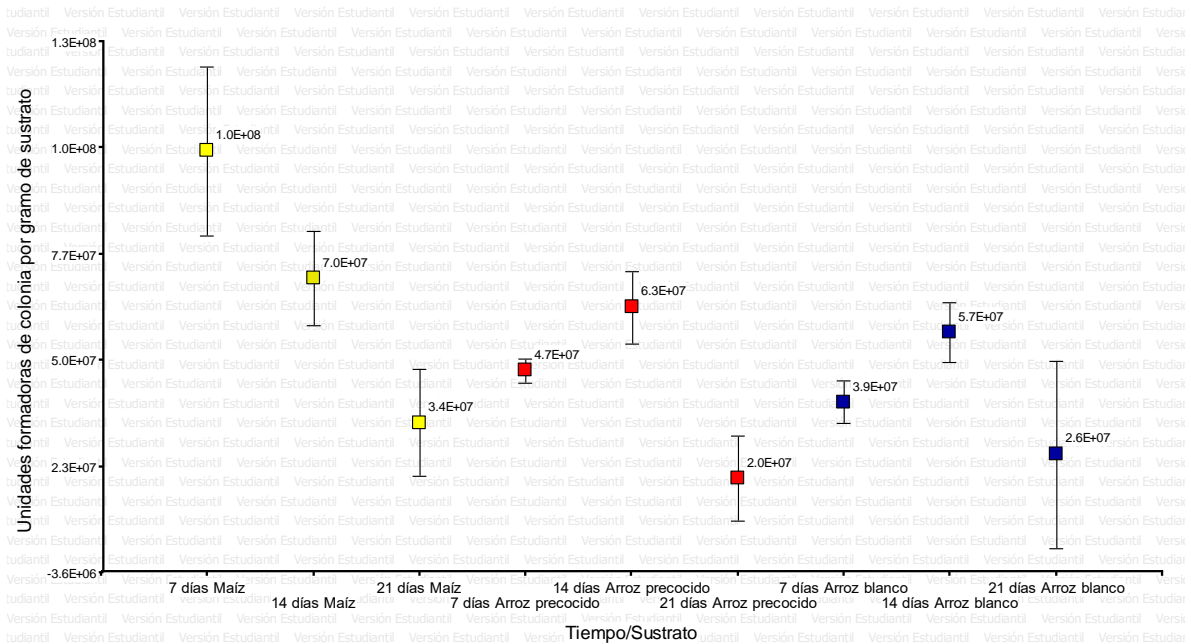


Figura 2. Crecimiento de unidades formadoras de colonia (UFC) de la cepa en los sustratos y períodos de tiempo evaluados.

### 6.3 Aplicación en campo

Se realizaron aplicaciones de la cepa San Sebastián propagada en maíz amarillo quebrado de julio a octubre de 2017 con las dosis y tratamientos propuestos en la metodología, los conteos realizados de la colecta de hojas de café de los diferentes estratos se examinaron en estereoscopio y microscopio y desde el primer monitoreo a los 15 días después de la aplicación (dda), se evidenció la presencia de *L. lecanii* sobre *H. vastatrix* (Tabla 5). El promedio de pústulas de *H. vastatrix* infectado por *L. lecanii* durante el estudio sugiere que en ambas localidades (Villa Canales y San Miguel Dueñas) no existió diferencia entre las dosis evaluadas (baja y alta), sin embargo, si existió diferencia entre las dosis evaluadas y el testigo absoluto (Tabla 4); esto se confirma al observar el análisis de varianza factorial con prueba de medias de Tukey (Apéndice 2) que no muestra diferencias entre en las dosis pero sí entre éstas y el testigo ( $p < .001$ ), en la interacción lugar-dosis ( $p = .694$ ) no existe diferencia significativa entre los lugares donde se aplicó y las dosis baja y alta por lo que se infiere que con la dosis baja se logró una óptima infección de *L. lecanii* sobre *H. vastatrix* y que el aumento en la dosis no representa una mayor infección del biocontrolador sobre la enfermedad.

Tabla 4

*Promedio de pústulas de H. vastatrix infectadas por L. lecanii.*

Lugar	Dosis	Medias (DE)
Villa Canales	Alta	44.14 (24.56)
Villa Canales	Baja	47.86 (25.74)
Villa Canales	Testigo	12.71 (18.33)
San Miguel Dueñas	Alta	65.43 (16.30) *
San Miguel Dueñas	Baja	64.86 (24.55) *
San Miguel Dueñas	Testigo	18.57 (33.86)

Nota: ( $p < .05$ )\* (C. V. = 58.10). Ninguno de los tratamientos fue significativamente diferente.

Tabla 5

*Cepa evaluada en campo en la localidad de Villa Canales y San Miguel Dueñas, porcentaje de infección de L. lecanii sobre H. vastatrix en los siete monitoreos realizados.*

Lugar	Monitoreos (% de infección)						
	1	2	3	4	5	6	7
Villa Canales db*	24%	2%	36%	64%	55%	70%	58%
Villa Canales da**	21%	9%	76%	67%	58%	67%	37%
Villa Canales t***	0%	0%	0%	0%	22%	48%	19%
San Miguel Dueñas db*	85%	36%	60%	74%	80%	61%	62%
San Miguel Dueñas da**	79%	34%	88%	45%	84%	86%	38%
San Miguel Dueñas t***	0%	0%	0%	0%	90%	6%	34%

Nota: db\* = dosis baja, da\*\* = dosis alta, t\*\*\* = testigo

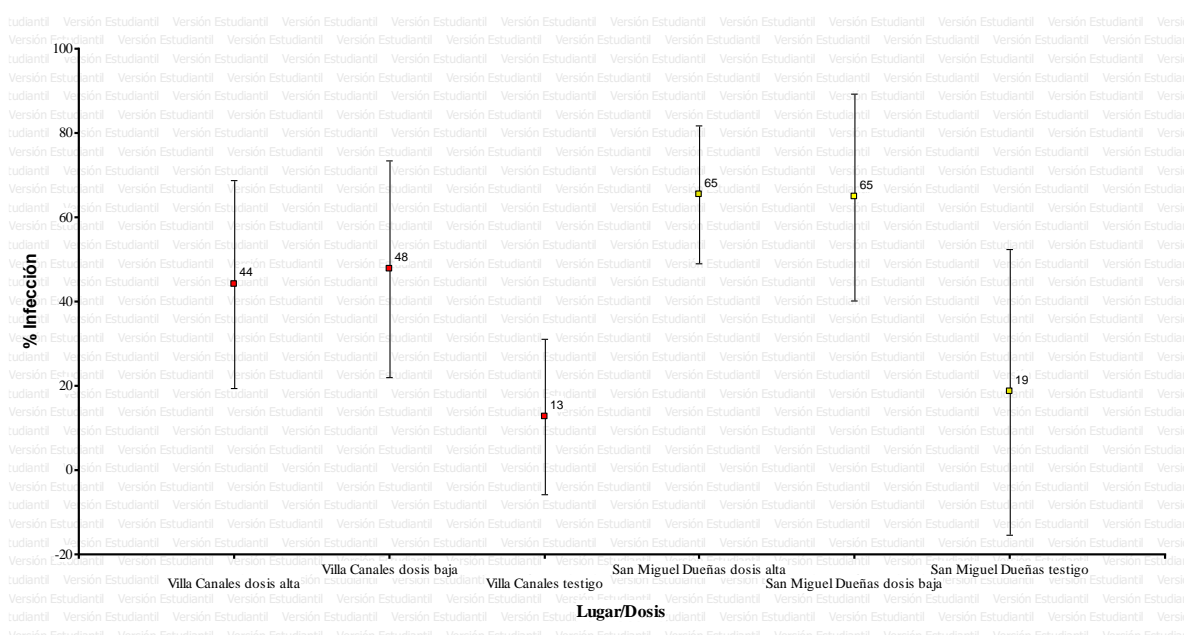


Figura 3. Porcentaje de infección de *L. lecanii* sobre *H. vastatrix* durante los siete monitoreos en las dos localidades y las dosis aplicadas.

## 6.4 Matriz de resultados

Tabla 6

*Matriz de resultados del proyecto: Formulación y evaluación de Lecanicillium lecanii biocontrolador de Hemileia vastatrix.*

<b>Objetivos específicos</b>	<b>Resultado Esperado</b>	<b>Resultado Obtenido</b>
Obtener un sustrato eficaz para la propagación masiva de <i>L. lecanii</i>	Propagación masiva de tres cepas de <i>L. lecanii</i> en tres sustratos, y tres períodos de producción de conidiosporas, cantidad de conidios/gramo, porcentaje de viabilidad y porcentaje de pureza.	Propagación masiva de <i>L. lecanii</i> en maíz amarillo quebrado con control de calidad para formulaciones biológicas.
Establecer la capacidad de virulencia de cepas de <i>L. lecanii</i> sobre la roya del café.	Aplicación en campo de <i>L. lecanii</i> sobre roya del café, en dos localidades con dos tratamientos y el testigo, se evaluó el porcentaje de infección de <i>L. lecanii</i> sobre <i>H. vastatrix</i> .	Se determinó el porcentaje de infección de <i>L. lecanii</i> sobre <i>H. vastatrix</i> con las dosis propuestas y las localidades donde se realizó el estudio.

## 6.5 Impacto esperado

Los objetivos propuestos por el estudio fueron completados satisfactoriamente ya que se propagó exitosamente a *L. lecanii* en uno de los sustratos propuestos y se logró evidenciar el porcentaje de infección de *L. lecanii* sobre *H. vastatrix* en campo.

Tabla 7

*Impacto esperado del proyecto: Formulación y evaluación de Lecanicillium lecanii biocontrolador de Hemileia vastatrix.*

<b>Impacto esperado</b>	<b>Beneficiario potencial</b>	<b>Indicador verificable</b>
Obtener un sustrato eficaz para la propagación masiva de <i>L. lecanii</i> y establecer la capacidad de virulencia de cepas de <i>L. lecanii</i> sobre <i>H. vastatrix</i> .	Productores de café de Guatemala.	Propagación masiva de <i>L. lecanii</i> en maíz amarillo quebrado. Porcentaje de infección de <i>L. lecanii</i> sobre <i>H. vastatrix</i> en Villa Canales, Guatemala y San Miguel Dueñas, Sacatepéquez durante siete monitoreos.



## 7. Análisis y discusión de resultados

De las dos cepas evaluadas, solo la denominada San Sebastián, pudo desarrollarse en los tres sustratos propuestos: maíz amarillo quebrado, arroz precocido y arroz blanco, la cepa Corral Viejo no se propagó en ningun sustrato por lo que quedó descartada, estudios previos (Ottati-de-Lima et all., 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), sin embargo en el presente estudio se determinó por analisis de varianza factorial con prueba de medias de Tukey que el medio idóneo para la reproducción masiva de *L. lecanii* fue el maíz amarillo quebrado.

El analisis de varianza factorial y prueba de medias de Tukey (Apéndice 1) presentó diferencias significativas entre las variables propuestas. En la tabla 3 se observa que la mayor producción de UFC/gramo fue a los siete días en maíz amarillo quebrado  $1.02 \times 10^8$  ( $9.97 \times 10^1$ ), con 100% de germinación y 100% de pureza, cumpliendo con los estándares de control de calidad recomendados para la producción de biocontroladores (Cenicafe, 1997).

La aplicación y moitoreo de *L. lecanii* de julio a octubre de 2017, en ambos lugares se realizó después de las 16:00 horas, cuando las condiciones climáticas no fueron tan intensas, además se utilizaron coadyuvantes que potencializaron el efecto del biocontrolador; en Villa Canales las condiciones climáticas obtenidas mediante la aplicación: The weather Chanel: Radar consultada in situ y en el momento de la aplicación mediante la consulta en The Weather Company (2018) promedio fueron: temperatura 24°C, humedad relativa 63%, precipitación pluvial 0.71 mm, índice UV 3kWh/m<sup>2</sup>/día; en San Miguel Dueñas las condiciones climáticas promedio fueron: temperatura 21 °C, humedad relativa 70%, precipitación pluvial 0.6 mm, índice UV 4kWh/m<sup>2</sup>/día. Al momento de realizar la primera aplicación se realizó monitoreo, evidenciándose infección de *L. lecanii* sobre *H. vastatrix* en ambos sitios de aplicación, sin embargo, a pesar de que la precipitación pluvial no fue alta, la humedad relativa, la temperatura y el índice UV fueron idóneos para el desarrollo del biocontrolador, que aunque no disminuyó la incidencia y severidad de la enfermedad en esta etapa de alta incidencia y severidad de roya en el cultivo, sugiere que se debe realizar la evaluacion bajo condiciones de menor presion de incidencia y severidad de *H. vastatrix*, previo a la floración cuando el cultivo tiene nueva foliación.

El porcentaje de infección varia según la localidad donde se realizaron las aplicaciones, en Villa Canales en dosis alta y baja oscila entre 2% como mínimo y 76% como máximo, con promedio ponderado de 46% , y en San Miguel Dueñas con dosis alta y baja oscila entre 34% como mínimo y 86% como máximo, con promedio ponderado de 65%. Esto sugiere que la cepa se adapta mejor a las condiciones ecológicas de San Miguel Dueñas y que en la región de Villa Canales algún factor ecológico influye sobre el potencial de virulencia. Por lo que en futuras evaluaciones debería realizarse nuevas bioprospecciones y evaluar la adaptabilidad de las cepas en diferentes regiones del país.

No se observa diferencia real entre las dosis de concentración de conidias aplicadas en ambas localidades, ya que para Villa Canales se tiene que el promedio de incidencia en los siete monitoreos en dosis baja es de 44.14% y para dosis alta es de 47.85%, mientras que en San Miguel Dueñas se tiene que el promedio de incidencia en los siete monitoreos en dosis baja es de 65.43% y para dosis alta es de 64.85%.

Las aplicaciones evidenciaron que la dosis efectiva de aplicación de *L. lecanii* con 300 g de producto conteniendo  $1.02 \times 10^8$  ( $9.97 \times 10^1$ ) UFC/g, se obtienen porcentajes de infección arriba del 40%; y que con una dosis de 600 g de producto conteniendo la misma concentración no se obtuvo diferencia significativa entre ambas dosis (Apéndice 2). Por lo consiguiente se considera que la cepa San Sebastian es eficiente bajo las condiciones de San Miguel Dueñas y tiende a tener menos eficacia en la región de Villa Canales. También se establece plenamente que no existe diferencia entre utilizar dosis de 300 o 600 g de producto con concentración de  $1.02 \times 10^8$  ( $9.97 \times 10^1$ ) UFC/g.

## 8. Conclusiones

- a. Se establece que la cepa de *L. lecanii* denominada San Sebastián puede propagarse y masificarse por el método de fermentación sólida en condiciones de medio ambiente natural sobre sustrato orgánico y que el período óptimo de producción de conidiosporas es de siete días.
- b. La cepa de *L. lecanii* denominada San Sebastián, propagada y masificada de forma artesanal, tiene potencial como agente de control biológico de *H. vastatrix* bajo las condiciones de las regiones donde se efectuó la evaluación.
- c. Se obtuvo un producto con potencial de control biológico para *H. vastatrix* con tecnología básica formulado a base de *L. lecanii* y se determinó que la cepa San Sebastián puede ser propagada masivamente en maíz amarillo quebrado.
- d. Se establece que la cepa San Sebastian aplicada en dosis de 300 g de producto con contenido de  $1.02 \times 10^8$  ( $9.97 \times 10^1$ ) UFC/g, es la dosis óptima para las localidades donde se realizó la evaluación.
- e. El porcentaje de infección varía según la localidad donde se realizaron las aplicaciones, en Villa Canales 46% y en San Miguel Dueñas 65%.

## 9. Referencias

- Alvarez, G. A., Ramírez, S. S., & Escobar, J. M. (2015). *Bioprospección de hiperparásitos de Hemileia vastatrix en reservas naturales voluntarias con café*. (Inf-2015-07). Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación y Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales.
- Alvarez, G. A., Santos, M. C., & Centes, L. F. (2015). *Extracción y formulación artesanal de Cladosporium uredinicola biocontrolador de Puccinia horiana*. (Inf-2015-31). Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación y Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales.
- Andrews, J. H. (1992). Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology*, 30(1), 603-635.
- Avelino, J., & Rivas, G. G. (2013). La roya anaranjada del cafeto. Recuperado de [hal.archives-ouvertes.fr/hal-01071036/file/LA\\_ROYA\\_ANARANJADA\\_DEL\\_CAFETO\\_V1.pdf](http://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01071036/file/LA_ROYA_ANARANJADA_DEL_CAFETO_V1.pdf)
- Barquero, M. (2013). *Recomendaciones para el combate de la roya del cafeto*. San José: Instituto del Café de Costa Rica.
- Blakeman, J. P., & Fokkema, N. J. (1982). Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annual Review of Phytopathology*, 20(1), 167-190.
- Canjura, E. M., Sánchez, 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. (1997). *Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos*. En H. F. Ospina (Ed). Chinchiná, Caldas, Colombia: Autor.
- Comisión Pastoral de Movilidad Humana. (2013). *La roya del café: sus efectos directos en la pérdida de empleo y emigración*. Guatemala: Conferencia Episcopal de 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*, 7(3), 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.
- 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, R., Zavaleta, E., Rojas, R. I., Leyva, S. G., Kilpatrick, J., & Fuentes, 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.
- Garrity, G., Brenner, D. J., Krieg, N. R., & Stanley, J. R. (Eds). (2005). *Bergey's manual® of systematic bacteriology, Vol 2: The Proteobacteria*. New York: Springer.
- 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*, 139(4), 763-772. doi: 10.1007/s10658-014-0430-9
- Hernández, A. A., & Rosón, C. (2005). Medios de cultivo para la reproducción masiva de *Aschersonia aleyrodis* Webber. *Fitosanidad*, 9(4), 21-28.
- Hernández-Martínez, G., & Velázquez-Premio, T. (2016). Análisis integral sobre la roya el café y su control. *Revista Internacional de Desarrollo Regional Sustentable*, 1(1), 92-99.
- Heuchert, B., Braun, U., & Schubert, K. (2005). Morphotaxonomic revision of fungicolous *Cladosporium* species (hyphomycetes). *Schlechtendalia*, 13, 1-78.
- Hueso, J. J. (2016). *Xylella fastidiosa: Nueva amenaza para el olivar* (Fichas de transferencia, 15). Fundación Cajamar. Recuperado de <https://www.cajamar.es/pdf/bd/agroalimentario/innovacion/investigacion/documentos-y-programas/015-xylella-fastidiosa-1456405538.pdf>.
- Kushalappa, A. C., & Eskes, A. B. (1989). Advances in coffee rust research. *Annual Review of Phytopathology*, 27(1), 503-531.

- Leguizamón-Caycedo, J. E., Vélez-Arango, P. E., & González-Serna, A. (1989). Efectos de extractos metabólicos de *Verticillium lecanii* sobre *Hemileia vastatrix*. *Cenicafé*, 40(2), 31-39.
- López, M. M. (2014). Riesgo para el cultivo de ornamentales de bacteriosis emergentes y exóticas: Prevenir es mejor que curar. *Las buenas prácticas en la horticultura ornamental* (pp.p 16-24). Valencia, España: Sociedad Española de ciencias Hortícolas.
- 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). Microbiomas y control biológico como alternativa de manejo de la roya anaranjada del cafeto. En *Memorias del seminario científico internacional, manejo agroecológico de la roya del café*. (pp. 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*. (p. 6). Panamá: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- Orozco, 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* (pp. 26-34). Panamá: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- Ottati-de-Lima, E. L., Batista, 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. *Arq. Inst. Biol.*, 77(4), 651-659.
- Purcell, S., & Almeida, R. (2015). The bacterium *Xylella fastidiosa*: Now found in Pears in Oregon. *Western Plant Diagnostic Network*, 8(4), 2-6.
- 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* (pp. 11-16). Panamá: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- Rolz, C. E., De León, L. R., & Paniagua, O. (2013). Evidencia de un antagonismo in vitro de especies de Trichoderma contra *Hemileia vastatrix* (roya del café). Centro de Ingeniería Bioquímica, Instituto de Investigaciones. Universidad del Valle de Guatemala. *Revista* 25.

- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria. (2013). *Enfermedad de Pierce: Xylella fastidiosa subsp. fastidiosa* (Ficha Técnica 26), México: Autor.
- 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.
- Virginio, E. de M., & Astorga, C. (2015). *Prevención y control de la roya del café. Manual de buenas prácticas para técnicos y facilitadores* (Serie técnica, No. 131). Turrialba, Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.
- Villarreyna, R.A., 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. Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.
- 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: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- 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.

## 10. 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	45	0.80	0.76	26.25

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

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	26115769777777800.00	8	3264471222222220.00	18.15	<0.0001
Sustrato	727421111111110.00	2	363710555555550.00	20.22	<0.0001
Tiempo	13327013777777800.00	2	666350688888890.00	37.05	<0.0001
Sustrato*Tiempo	551454488888890.00	4	137863622222220.00	7.67	0.0001
Error	647405600000000.00	36	17983488888889.00		
Total	3258982577777800.00	44			

#### Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=11969068.05293

Error: 179834888888888.8440 gl: 36

Sustrato	Medias	n	E.E.
Arroz blanco	40760000.00	15	3462512.47 A
Arroz precocido	43493333.33	15	3462512.47 A
Maíz	68993333.33	15	3462512.47 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > .05)

#### Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=11969068.05293

Error: 179834888888888.8440 gl: 36

Tiempo	Medias	n	E.E.
21 días	26746666.67	15	3462512.47 A
7 días	62986666.67	15	3462512.47 B
14 días	63513333.33	15	3462512.47 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > .05)

#### Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=27963901.68096

Error: 179834888888888.8440 gl: 36

Sustrato	Tiempo	Medias	n	E.E.
Arroz precocido	21 días	20140000.00	5	5997247.52 A
Arroz blanco	21 días	26060000.00	5	5997247.52 A
Maíz	21 días	34040000.00	5	5997247.52 A B
Arroz blanco	7 días	39340000.00	5	5997247.52 A B C
Arroz precocido	7 días	47160000.00	5	5997247.52 A B C D
Arroz blanco	14 días	56880000.00	5	5997247.52 B C D
Arroz precocido	14 días	63180000.00	5	5997247.52 C D
Maíz	14 días	70480000.00	5	5997247.52 D
Maíz	7 días	102460000.00	5	5997247.52 E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > .05)



Apéndice 2: ANDEVA factorial realizado a las cepas y períodos de propagación.

**% Infección**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% Infección	42	0.45	0.37	58.10

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

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	17614.69	5	3522.94	5.84	0.0005
Lugar	2273.36	1	2273.36	3.77	0.0600
Dosis	14897.33	2	7448.67	12.35	0.0001
Lugar*Dosis	444.00	2	222.00	0.37	0.6946
Error	21705.43	36	602.93		
Total	39320.12	41			

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=15.36832**

Error: 602.9286 gl: 36

Lugar	Medias	n	E.E.
Villa Canales	34.90	21	5.36 A
San Miguel Dueñas	49.62	21	5.36 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > .05)

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=22.68495**

Error: 602.9286 gl: 36

Dosis	Medias	n	E.E.
Testigo	15.64	14	6.56 A
Alta	54.79	14	6.56 B
Baja	56.36	14	6.56 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > .05)

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=39.48751**

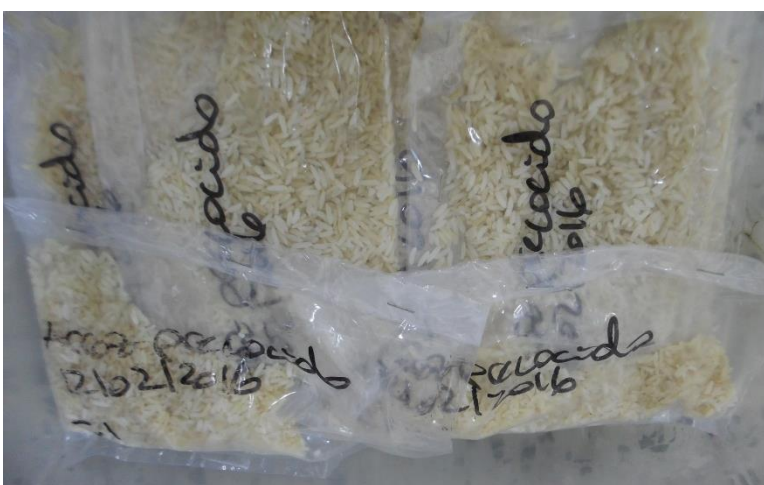
Error: 602.9286 gl: 36

Lugar	Dosis	Medias	n	E.E.
Villa Canales	Testigo	12.71	7	9.28 A
San Miguel Dueñas	Testigo	18.57	7	9.28 A
Villa Canales	Alta	44.14	7	9.28 A B
Villa Canales	Baja	47.86	7	9.28 A B
San Miguel Dueñas	Baja	64.86	7	9.28 B
San Miguel Dueñas	Alta	65.43	7	9.28 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > .05)

Apéndice 3: Fotografías de los experimentos realizados durante el proyecto.

- Sustratos utilizados para propagar *L. lecanii*, maíz amarillo quebrado, arroz, arroz precocido.



- Sustratos inoculados dispuestos en bandejas para el crecimiento de *L. lecanii*



- Sustrato embolsado y listo para su aplicación en campo



- Infección de *L. lecanii* sobre *H. vastatrix* posterior a las aplicaciones en campo.



### **11. 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).

## 12. 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. Saúl Guerra  
**Coordinador PUICB**

---

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