

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

PROGRAMA DE ENSEÑANZA

ÁREA DE POSGRADO

DISTRIBUCIÓN DE *Verticillium* sp EN TRES ZONAS CAFETALERAS DE NICARAGUA, Y EVALUACIÓN DE DOS AISLAMIENTOS DEL HONGO COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO DE LA ROYA (*H. vastatrix*) DEL CAFETO (*Coffea arabica* L.).

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico Académico del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza para optar al grado de

MAGISTER SCIENTIAE

Por

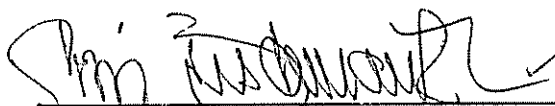
Arnulfo José Monzón Centeno

Turrialba, Costa Rica  
1992.

Esta tesis ha sido aceptada, en su presente forma, por la coordinación del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del CATIE aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

*MAGISTER SCIENTIAE*

FIRMANTES:



---

Elkin Bustamante, Ph.D.  
Profesor Consejero

---

Assefaw Tewolde, Ph.D.  
Jefe, Area de Posgrado

---

Ramón Lastra, Ph.D.  
Director, Programa de Enseñanza



---

Arnulfo José Monzón Centeno  
Candidato

## DEDICATORIA

A mis padres:

Reyes Monzón Gómez

y

María Tomasa Centeno

A mis hermanos

A mi hijo:

Dariel Ulises Monzón Mena

A mi compañera de vida:

Silma Mena Ortega

A mis amigos

## AGRADECIMIENTOS

Expreso mi sincero agradecimiento al Dr Elkin Bustamante, que como Profesor Consejero supo darme su apoyo y sus buenos consejos para la realización del presente trabajo.

Al Dr David Monterroso quien se desempeñó como mi Profesor Consejero Auxiliar y supo orientarme en mi trabajo.

Al proyecto UNA-LUW, quienes facilitaron el financiamiento para la realización de mis estudios de maestría.

Expreso mi agradecimiento al proyecto de hongos entomopatógenos del Centro Nacional de Protección Vegetal, así como al Centro Experimental del Café, Matagalpa, al Centro Experimental Jardín Botánico, por el apoyo brindado para la ejecución del presente trabajo.

A la Universidad Nacional Agraria por proporcionarme esta oportunidad de capacitación.

A mis compañeros quienes fueron solidarios conmigo en los duros momentos que compartimos durante esta jornada de estudios.

## CONTENIDO.

|   | Página |
|---|--------|
| RESUMEN.....  | vii    |
| SUMMARY.....  | ix     |
| INDICE DE CUADROS.....  | xi     |
| INDICE DE FIGURAS.....  | xii    |
| INDICE DE ANEXOS.....   | xiv    |
| 1. INTRODUCCION.....  | 1      |
| 2. OBJETIVOS.....   | 4      |
| 3. REVISION DE LITERATURA.....  | 5      |
| 3.1. Descripción del hongo.....   | 12     |
| 4. METODOLOGIA.....   | 15     |
| 4.1. Muestreo de <i>Verticillium</i> sp como hiperparásito de <i>H. vastatrix</i> .....                     | 15     |
| 4.1.1.Descripción de las zonas de estudio.....  | 15     |
| 4.1.1.1. Zona El Crucero.....   | 16     |
| El Jardín 1.....  | 16     |
| El Jardín 2.....  | 17     |
| 4.1.1.2. Zona de Carazo.....  | 17     |
| El Asilo.....   | 17     |
| El Paraiso.....   | 17     |
| 4.1.1.3. Zona de Matagalpa.....   | 18     |
| El Coyolar 1.....   | 18     |
| El Coyolar 2.....   | 19     |
| 4.2. Evaluación de aislamientos y concentraciones de <i>Verticillium</i> sp, contra la roya del cafeto..... | 20     |

|   |    |
|---|----|
| 4.2.1. Aislamiento y producción de <i>Verticillium</i> sp.....  | 20 |
| 4.2.2. Establecimiento de experimentos.....   | 22 |
| 4.2.2.1. Inoculación de la roya.....  | 22 |
| 4.2.3. Evaluación de <i>Verticillium</i> sp como colonizador del<br>filoplano.....                          | 23 |
| 4.2.4. Evaluación de <i>Verticillium</i> sp como hiperparásito de <i>H.</i><br><i>vastatrix</i> .....       | 25 |
| 4.2.5. Efecto de <i>Verticillium</i> sp sobre la germinación de<br>uredosporas de <i>H. vastatrix</i> ..... | 26 |
| 4.3. Análisis de los datos.....   | 27 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSION.....  | 29 |
| 5.1. Muestreo de <i>Verticillium</i> sp como hiperparásito de <i>H.</i><br><i>vastatrix</i> .....           | 29 |
| 5.2. Evaluación de <i>Verticillium</i> sp como colonizador del<br>filoplano.....                            | 43 |
| 5.3. Evaluación de <i>Verticillium</i> sp como hiperparasito de <i>H.</i><br><i>vastatrix</i> .....         | 47 |
| 5.4. Efecto de <i>Verticillium</i> sp sobre la germinación de<br>uredosporas de <i>H. vastatrix</i> .....   | 55 |
| 6. CONCLUSIONES.....  | 59 |
| 7. RECOMENDACIONES.....   | 61 |
| 8. BIBLIOGRAFIA.....  | 62 |

Distribución de *Verticillium* sp en tres zonas cafetaleras de Nicaragua, y evaluación de dos aislamientos del hongo como agente de control biológico de la roya (*H. vastatrix*) del café (*Coffea arabica* L.)

Palabras claves: *Verticillium*, *Hemileia*, roya, control biológico, hiperparasitismo, incidencia, uredosporas.

#### RESUMEN.

*Verticillium* sp es un hongo que comúnmente se encuentra como hiperparásito de la roya del café. El presente estudio se planteó como objetivos los siguientes: a) Evaluar la incidencia natural de *Verticillium* sp sobre la roya del café en tres zonas cafetaleras de Nicaragua. b) Evaluar el efecto de *Verticillium* sp sobre la roya, cuando se aplica antes de la aparición de los síntomas de la enfermedad. c) Evaluar el efecto de *Verticillium* sp como hiperparásito de *H. vastatrix*; d) Conocer el efecto de *Verticillium* sp sobre la germinación de uredosporas de *H. vastatrix*.

Los resultados indican que aún con altos niveles de incidencia de roya encontrados en algunas de las fincas muestreadas, *Verticillium* sp permanece estable a lo largo del tiempo y su nivel de incidencia no supera el 14 %. La mayor incidencia de *Verticillium* sp se presentó en la finca El Jardín en la zona del Crucero, en cafetos variedad caturra de 17 años de edad y con nivel de sombra del 45 %. No se encontró una relación clara entre las condiciones climáticas y la incidencia del hiperparásito.

Posteriormente *Verticillium* sp fue aislado del campo y cultivado, para emplearse en experimentos en el invernadero. Al evaluar en condiciones de invernadero el efecto de *Verticillium* sp sobre la roya del café al ser aplicado 72 horas después de la inoculación, se observó actividad epifítica, que permitió al hongo en especial a las concentraciones más altas, parasitar las pustulas de roya que aparecieron 22 días después de la aplicación de *Verticillium* sp.

La evaluación de la actividad hiperparasítica de *Verticillium* sp, se hizo aplicando diferentes aislamientos y concentraciones del hongo sobre pustulas de roya. Se encontró que el nivel de incidencia aumenta en los primeros 10 días hasta alcanzar valores desde 50 hasta 80 %. Esto indica que el hongo se comporta eficientemente como hiperparásito. Así mismo el mayor grado de incidencia se observó en el aislamiento procedente de El Coyolar, Matagalpa, en concentraciones de  $10^8$  y  $2.5 \times 10^8$  esporas/ml. Después de 10 días la incidencia del hiperparásito tiende a estabilizarse. Para evaluar el efecto de *Verticillium* sp sobre la germinación de uredosporas, se condujo un experimento donde las uredosporas se sometieron a la acción del hiperparásito,

en medio agar-agua al 2%, encontrando que la germinación es significativamente menor en presencia de *Verticillium* sp. Los experimentos realizados indican que, aunque en las condiciones de campo estudiadas el hiperparasitismo es bajo, *Verticillium* sp posee propiedades importantes para ser usado como agente de control de *H. vastatrix*, basándose éstas en su capacidad de colonización y supervivencia del filoplano, capacidad de colonizar pústulas establecidas, y el efecto que presenta sobre la germinación de uredosporas del patógeno.



Distribution of *Verticillium* sp in three coffee areas of Nicaragua, and evaluation of two fungus isolations as coffee (*Coffea arabica* L.) rust (*H. vastatrix*) biologic control agent.

Key words: *Verticillium*, *Hemileia*, rust, biologic control, hyperparasitism, incidence, spores, germination

#### SUMMARY

The *Verticillium* sp is a commonly found hyperparasite fungus of coffee rust. The objectives of this research were: a) To evaluate the natural incidence of *Verticillium* sp on coffee rust in three coffee areas of Nicaragua. b) To appraise the *Verticillium* sp effect on rust when applied before the appearance of the disease's symptoms. c) To estimate the effect of *Verticillium* sp as hyperparasite of *H. vastatrix*; and d) To evaluate the effect of *Verticillium* sp on the germination of *H. vastatrix* spores.

The results of this research indicate that even with the high rust incidence levels found in some of the farms surveyed, *Verticillium* sp remains stable through time and its incidence level does not exceeds 14%. The highest *Verticillium* sp incidence was found in "El Jardin" farm located in the region of Crucero, in 17 years old Caturra plants with 45% shade level. It was not possible to found a clear relation between weather conditions and the hyperparasite incidence.

When *Verticillium* sp was applied on coffee rust 72 hours after its inoculation, under greenhouse conditions, it was possible to observe some epiphytic activity, allowing the fungus, specially at the highest concentrations, to parasitize the rust spots which appeared 22 days after the application of *Verticillium* sp.

The evaluation of *Verticillium* sp hyperparasitic activity was done using different fungus isolations and concentrations on rust spots. It was found that the incidence level increases during the first 10 days, attaining values from 50 to 80%. Such situation indicates an efficient performance of the fungus as hyperparasite. Likewise the highest incidence level was observed with the isolation of "El Coyolar", Matagalpa at concentrations of  $10^5$  and  $2.5 \times 10^5$  spores/ml. After 10 days the hyperparasite's incidence tends to become stable.

In order to evaluate the *Verticillium* sp effect on the spores germination, an assay was conducted placing the spores in an agar-water medium at 2% under the action of the hyperparasite, founding a significantly lower germination level in the presence of *Verticillium* sp.

The experiments conducted indicate that although under the field conditions surveyed the hyperparasitism is low, *Verticillium* sp has important qualities as control agent of *H. vastatrix* based on its colonization capacity and survival of the phyloplane, its ability to colonize established spots and also its effect on the pathogens spores germination.

LISTA DE CUADROS.

| Cuadro N <sup>o</sup>   | Página |
|---|--------|
| 1. Promedio de pustulas de roya por bandola para las diferentes fincas y fechas de muestreo.....  | 29     |
| 2. Promedio de pústulas de roya hiperparasitadas por bandola para las diferentes fincas y fechas de muestreo.....   | 30     |
| 3. Características principales de las fincas donde se realizó el muestreo de Verticillium sp sobre roya.....  | 42     |
| 4. Numero promedio de pustulas y pústulas hiperparasitadas por planta, para los diferentes tratamientos aplicados 72 horas después de la inoculación..... | 47     |
| 5. Resultados de Análisis de Varianza para el parámetro área debajo de la curva de incidencia de Verticillium sp.....                                     | 49     |
| 6. Valores promedios para el parámetro area debajo de la curva de incidencia de Verticillium sp en los diferentes tratamientos.....                       | 50     |
| 7. Numero promedio de pústulas de roya y pústulas hiperparasitadas por planta, para los diferentes tratamientos .....                                     | 52     |

## LISTA DE FIGURAS.

| Figura Nº   | Página |
|---|--------|
| 1. Comportamiento de la roya del cafeto y de <i>Verticillium</i> sp, en la finca El Jardín1.....  | 31     |
| 2. Comportamiento de la roya del cafeto y de <i>Verticillium</i> sp, en la finca El Jardín2.....  | 32     |
| 3. Comportamiento de la roya del cafeto y de <i>Verticillium</i> sp, en la finca El Asilo.....  | 34     |
| 4. Comportamiento de la roya del cafeto y de <i>Verticillium</i> sp, en la finca El Paraíso.....  | 36     |
| 5. Comportamiento de la roya del cafeto y de <i>Verticillium</i> sp, en la finca El Coyolar1.....   | 38     |
| 6. Comportamiento de la roya del cafeto y de <i>Verticillium</i> sp, en la finca El Coyolar2.....   | 40     |
| 7. Incidencia de roya en respuesta a la aplicación de <i>Verticillium</i> sp 72 horas después de la inoculación, en condiciones de invernadero..... | 45     |
| 8. Incidencia de <i>Verticillium</i> sp aplicado 72 horas después de la inoculación de roya, en condiciones de invernadero.....                     | 46     |
| 9. Incidencia de roya del cafeto sometida a la actividad hiperparasítica de <i>Verticillium</i> sp en condiciones de invernadero .....              | 48     |
| 10. Incidencia de <i>Verticillium</i> sp sobre pústulas de roya del cafeto, en condiciones de invernadero.....                                      | 51     |
| 11. Incidencia de <i>Verticillium</i> sp sobre roya a nivel de pústulas.....  | 53     |

12.Efecto de *Verticillium* sp sobre la germinación de  
uredosporas de *H. vastatrix*.....55

## LISTA DE ANEXOS.

| Anexo Nº   | Página |
|--|--------|
| 1. Comportamiento de la temperatura y las precipitaciones durante el periodo en estudio, en la zona El Crucero.... | 65     |
| 2. Comportamiento de la temperatura y las precipitaciones durante el periodo en estudio, en la zona de Carazo..... | 65     |
| 3. Comportamiento de la temperatura y las precipitaciones durante el periodo de estudio, en la zona de Matagalpa.. | 66     |

## 1. INTRODUCCION

El café es el primer producto agrícola de exportación y ocupa, después del petróleo, el segundo lugar en el comercio mundial. De ahí que el café constituya una de las ocupaciones agrícolas más importantes, sobre la cual se basa la economía de más de 50 países (Choleur 1972, citado por Becker Raterink, 1991).

En Nicaragua, el café es el mas importante bien de exportación. Este aportó entre el 20 y 35 % del total de las exportaciones en los últimos tres años. Además se estima que hay aproximadamente 28,000 productores y cerca de 170,000 hogares dependen directamente del café como fuente de ingresos (World Bank, 1992).

En Nicaragua el café se produce en seis regiones. Sin embargo, la mayor producción se concentra en las regiones I, IV y VI, aportando 9, 23 y 59 % respectivamente de la producción nacional en el ciclo 1990-1991.

A pesar de la importancia del cultivo del cafeto en la actividad económica y social del país, la producción cafetalera enfrenta grandes problemas, entre los que sobresalen los altos costos de producción y los bajos precios que se pagan al productor. Estos problemas se agudizan debido a la afectación que sufre la producción por la incidencia de plagas y enfermedades.

Rayner (1972), afirma que la roya del cafeto causada por *Hemileia vastatrix* Berk and Br. es sin duda la enfermedad más seria del cafeto.

La roya del cafeto es una enfermedad devastadora que ha causado grandes daños en las plantaciones comerciales en Africa , Brasil y Centro America, debido a que su ataque provoca una fuerte defoliación prematura de la planta de cafeto, que termina con la muerte de la misma, si no es tratada a tiempo y de manera preventiva. Es una enfermedad de difícil erradicación debido a la rápida e incontrolable diseminación del patógeno cuando existen condiciones favorables. Como tal, constituye una gran amenaza para la caficultura puesto que casi la totalidad de las plantaciones tradicionales están sembradas con variedades susceptibles (Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 1988).

En los países donde *H. vastatrix* se ha establecido, uno de los principales métodos de control es el uso de fungicidas. Wellman citado por Thurston (1989) afirma que los rendimientos aumentan en 50 % cuando se aplican fungicidas para el control de la enfermedad.

Dentro de las prácticas de manejo, han cobrado importancia aquellas que aprovechan al máximo los factores naturales de control y complementa éste con el uso de fungicidas en los momentos más oportunos (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, 1983).

En los cafetales de Nicaragua es muy común encontrar un hongo blanco creciendo sobre las pústulas de roya, según



aislamientos realizados éste hongo corresponde al género *Verticillium*.

Ante la situación que enfrenta la caficultura en el país, sería de mucho valor aprovechar al máximo aquellos organismos que se presentan de forma natural, y que ejercen en alguna medida control sobre la enfermedad. Entre éstos el hongo *Verticillium* sp es el hiperparásito más común, por lo tanto podría ser de mucho valor como factor complementario de otras prácticas que realiza el agricultor para el control de *H. vastatrix*.

Todo esto nos impulsó a realizar el presente trabajo, cuyos objetivos se definen a continuación.

## 2. OBJETIVOS.

- Evaluar la incidencia natural de *Verticillium* sp sobre *H. vastatrix* en seis fincas ubicadas en tres diferentes zonas cafetaleras del país.
- Evaluar el efecto de *Verticillium* sp sobre la roya, cuando se aplica 72 horas después de la inoculación del patógeno, en condiciones de invernadero.
- Evaluar la actividad hiperparasitica de *Verticillium* sp sobre pústulas de *H. vastatrix* en condiciones de invernadero.
- Conocer el efecto de *Verticillium* sp sobre la germinación de uredosporas de *H. vastatrix*.

### 3. REVISION DE LITERATURA.

Dentro de los componentes del manejo integrado, el control biológico constituye una forma de control importante, puesto que se da en forma natural y resulta complementario de las otras medidas de control (Ministerio de agricultura ganadería y alimentación, 1983).

Baker and Cook (1982) plantean que desde el punto de vista fitopatológico control biológico, consiste en la reducción de la densidad del inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito en su estado activo o de reposo, por uno o más organismos que ocurren naturalmente o a través de manipulación del medio ambiente, hospedante, o antagonistas o por introducción masiva de uno o más antagonistas.

Los patógenos que invaden las partes aéreas de las plantas, ya sea de forma directa, aberturas naturales, heridas o tejido senescente o muerto; en su fase epifítica antes de la infección son vulnerables al control biológico (Baker and Cook, 1982). De acuerdo a este planteamiento, la roya del cafeto causada por *Hemileia vastatrix* es una enfermedad vulnerable al control biológico, y como tal deben estudiarse aquellos organismos potenciales de control.

Intentos de control biológico de patógenos ha involucrado más frecuentemente la aplicación de microorganismos antagonistas a la planta. Para que sea exitoso el antagonista preferiblemente debe ser capaz de multiplicarse y colonizar la superficie de la planta. También

puede ser posible bajo ciertas condiciones ayudar al desarrollo del organismo antagonista, a través de la manipulación del ambiente del filoplano. Alterar el microclima de la superficie de la planta probablemente es impracticable en condiciones de campo, pero puede ser parcialmente logrado en condiciones de invernadero (Blakeman y Fokkema, 1982).

Carrión (1988), afirma que *H. vastatrix* tiene enemigos naturales capaces de afectar su población, tal es el caso de *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas, el cual se desarrolla sobre las uredosporas impidiendo su dispersión y afectando su viabilidad.

Un gran número de hongos y bacterias tienen la capacidad de crecer sobre las pústulas de royas. Estos hiperparásitos viven obteniendo su nutrición del huésped, el cual es afectado en el desarrollo de sus esporas (Forrer, 1979).

Kranz y Carling et al (1969, 1976), citados por Forrer (1979), afirman que los hiperparásitos mejor conocidos son: *Darluka filum* (Biv) Cast. y *Tuberculina maxima* Rost. El micoparásito biotrófico *D. filum* está asociado con muchas especies de royas. Suendsurd y Calpouzoz (1970, 1972), citados por Forrer, 1979, sostienen que conociendo algunos estados críticos del desarrollo de las royas, *D. filum* puede convertirse en un efectivo medio de control de royas.

*Cladosporium hemileiae*, *Fusarium* sp, *Paranectria hemileiae* y *Verticillium hemileiae* son conocidos hiperparásitos de la roya del café *H. vastatrix*. Frohlich,

1974 (citado por Forrer, 1979) menciona que estos hiperparásitos están reduciendo la infectividad de las uredosporas y que constituyen una considerable ayuda en el control de la roya del café. Por otro lado Robinson 1964, y Sundaram, 1962 (citados por Forrer, 1979), reportan que éstos hiperparásitos no son suficientemente numerosos para proveer un control natural de la roya del cafeto.

Los más importantes enemigos naturales de la roya del cafeto hasta ahora reportados son hongos hiperparásitos como *Verticillium lecanii* (antes *V. hemileiae*), *V. laptobactrum*, *V. psalliotae*, *Cladosporium hemileiae* y *Paranectria hemileiae*. En algunos países especialmente con condiciones de alta humedad, frecuentemente éstos hongos ocurren de forma natural (Kushalappa, 1989).

El hongo mejor conocido es *V. hemileiae*, encontrado comunmente en muestras de roya. En condiciones de campo en Brasil, éstos presentan una tasa de supervivencia baja, probablemente debido a que su principal factor limitante es la humedad; ya que en condiciones de laboratorio son efectivos. La búsqueda de otros, probablemente más efectivos antagonistas es una área abierta a la investigación (Kushalappa, 1989).

La utilización de hiperparásitos en el control de la roya del cafeto demanda de un mejor conocimiento de la biología, así como de las necesidades ecológicas de éstos hongos. También se requiere de estudios sobre las posibilidades de diseminación artificial en condiciones de

campo y sobre métodos que nos posibiliten una mayor dispersión natural de antagonistas de las royas. Además se debe evaluar la actividad y efecto de hiperparásitos importados de otros continentes y de otras royas (Forrer, 1979).

Durante un muestreo de la roya del cafeto en Papúa Nueva Guinea (PNG), en Junio 1987, en cafetos que no habían recibido aspersiones de fungicidas, se detectó que algunas lesiones de roya tenían un hongo blanco creciendo sobre ellas. Posteriormente el hongo fue identificado como *Verticillium lecanii* (Zimmerm.) hiperparásito de *H. vastatrix* (Shaw, 1988).

Vélez (1989), al aplicar cultivo licuado (micelio y conidias) de *V. lecanii* sobre lesiones establecidas de *H. vastatrix*, observó cubrimiento e invasión de la pústula por el micelio blanco del hongo con la subsecuente pérdida de ésta. El hongo origina una depresión central en la pústula, la cual se acentúa a través del tiempo.

*Verticillium lecanii* ha sido reportado principalmente como un hongo entomopatógeno de mucha importancia para el control de plagas fundamentales en algunos cultivos, entre los cuales se encuentran los áfidos y las escamas. a éste respecto Hall (1981), reporta que la especie *Verticillium lecanii* está bien documentado como un entomopatógeno de extremadamente amplia distribución, sin embargo espectaculares epizootias solamente han sido observadas en

sus hospederos más comunes áfidos y escamas en regiones tropicales y subtropicales.

Entre sus hospedantes y sustratos *V. lecanii* parasita todos los estados de desarrollo de insectos de todos los grupos, aracnidos, y además hiperparasita royas.

Diferentes trabajos de investigación realizados han demostrado la efectividad de las aplicaciones de *Verticillium* sp en el control de la roya del cafeto, en condiciones de invernadero, y en algunos casos en condiciones de campo.

Carrión (1988), en un experimento aplicando tres diferentes concentraciones conidiales de *V. lecanii* ( $2.14 \times 10^4$  ml<sup>-1</sup>,  $2.14 \times 10^5$  ml<sup>-1</sup>,  $4.28 \times 10^5$  ml<sup>-1</sup>) no encontró diferencias relevantes, ya que el incremento de la infección fue similar para cada tratamiento, sin embargo el número de aspersiones realizadas tuvo una influencia significativa en el incremento de la incidencia de *V. lecanii* y en la disminución de la tasa de defoliación. El autor recomienda que para establecer un posible control biológico de la roya del cafeto, debería mantenerse una tasa constante de infección de *V. lecanii*, asperjando de 4-5 veces durante el período de noviembre a Abril.

En el mismo experimento, Carrión (1988) encontró que la incidencia de roya y la defoliación fueron reducidos significativamente. Las plantas asperjadas 5 veces presentaron la mayor incidencia de *V. lecanii* (38 %), mientras que las asperjadas 4 veces presentaron el menor índice de defoliación (0.2 %). Concluyendo que la población

de *V. lecanii* puede ser mantenida al nivel necesario para controlar la enfermedad durante el período en estudio.

Eskes et al.(1987), afirman que varios aislamientos obtenidos de lesiones de roya del cafeto fueron identificados como *V. lecanii* y uno como *V. leptobactrum*. Los autores afirman que en experimentos realizados ambas especies germinaron mejor y más rápido en presencia de uredosporas de *H. vastatrix* que en agua destilada. Así mismo afirman que el hiperparasitismo de éstas especies sobre lesiones de roya se completa de 5 a 7 días con humedades relativas de 99%. Con humedad relativa de 95% el crecimiento de los hiperparásitos fue más lento, siendo nulo a 66%. Además las esporas de ambas especies aplicadas junto con las uredosporas de *H. vastatrix* sobre hojas de café redujeron el número de lesiones de roya. Filtrados de macerados de micelio y esporas de éstos hongos inhibieron parcialmente la germinación de las uredosporas de *H. vastatrix*.

*V. lecanii* se ha identificado previamente en PNG en escamas (coccidos) del café y en una palomilla (Lepidoptera). Además se han observado epizootias de éste hongo sobre áfidos y escamas en regiones tropicales y subtropicales. Además se han formulado preparaciones insecticidas con cepas de éste hongo: Vertalec (patogénica contra áfidos), y Mycotal (patogénica contra mosca blanca). *V. lecanii* se ha aislado del suelo, hongos y muchos otros sustratos (Shaw, 1988)..



Silveira y Rodríguez (1971), reportan que filtrados de *Verticillium hemileiae* Bour. resultantes del crecimiento del hongo en medio Czapeck suplementado con caseína o caseína hidrolizada, indujeron al rompimiento de uredosporas de *Puccinia hordei*, *Uromyces fabas* y *Uromyces trifolii*. Al inyectar éstos filtrados en hojas de café con o sin roya causaron desecación de los tejidos y aceleramiento de caída de hojas. Filtrados obtenidos a partir del cultivo del hongo en suspensión de esporas de *H. vastatrix*, originan también desecación de hojas al ser inyectadas.

La asociación de *H. vastatrix*-*V. hemileiae* estudiada mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido, demostró la esporulación de *V. hemileiae* en uredosporas de *H. vastatrix* penetrando a través de su pared celular. El estado final de la infección resulta en una degeneración progresiva de las uredosporas con el consecuente colapso de toda su estructura (Locci, Minervi y Rodríguez, 1971).

De 40 especies de *Verticillium* que fueron estudiadas para probar la capacidad de provocar lisis del tubo germinativo de 11 especies de roya, solamente *Verticillium hemileiae* mostró esa actividad lítica. La reacción de las royas al agente lítico no difiere sensiblemente. El agente lítico es termoestable, no dializable y se precipita por el sulfato de amonio, lo que quiere decir que es de naturaleza enzimática. Su ataque a las pústulas de la roya en las hojas presenta la posibilidad de su uso en el control biológico (García, Leal y Villanueva, 1965).

*Verticillium hemileiae*, *Cladosporium* sp y *Penicillium* sp todos hiperparásitos de *Hemileia vastatrix* crecieron muy facilmente en un medio artificial y pudieron reinfectar a *H. vastatrix*. Un amplio rango del género *Hemileia* fue infectado por *V. hemileiae*, hongo que se desarrolló óptimamente a temperatura de 22-23 °C, sin embargo a mayores temperaturas *H. vastatrix* permanece libre del hiperparásito (Centro de Investigacao Das Ferrugens Do Cafeeiro, 1965).

Existe una alta correlación entre la actividad proteolítica de las especies de *Verticillium* y el efecto lítico observado en la roya. Las especies patogénicas de *Verticillium* estudiadas son pectolíticas y no proteolíticas, en cambio en las no patogénicas como *V. hemileiae* se caracterizan por su actividad proteolítica (Leal y Villanueva, 1962; Leal, García y Villanueva, 1963).

Lim y Nik (1983), reportan haber encontrado un hongo blanco (*Verticillium psalliotae*) parasitando uredosporas de roya en varias plantaciones, en Selangor, Malasia. El micoparasitismo fue estudiado con microscopia electrónica y por interferencia de luz. *V. psalliotae* creció vigorosamente entre las rugosidades de las superficies de las uredosporas formando muchos conidióforos y conidias.

### 3.1. Descripción del hongo en estudio

*Verticillium lecanii* es un hongo que se desarrolla bien en todos los medios micológicos hasta ahora evaluados, p.e. Czapeck-Dox, Extracto de malta, medio de Sabourand y papa-

dextrosa-agar (PDA). Las conidias de *V. lecanii* requieren alta humedad para germinar, y posiblemente solo logran germinar en presencia de una lámina de agua (Hall, 1981).

La germinación de las esporas y el crecimiento de colonias para un aislado de *V. lecanii* tienen una temperatura óptima similar. Las conidias germinan más rápidamente entre 20 y 25 °C. La tasa de crecimiento de las colonias fue óptima entre 23 y 24 °C. La germinación y el crecimiento declinó poco a poco a temperaturas mayores de 25 °C, hasta detenerse a temperaturas mayores de 30 °C. La esporulación responde a un rango más estrecho de temperaturas, que el crecimiento y la germinación, cesando a los 30 °C (Hawker, 1950; Cochrane, 1958, citados por Hall, 1981).

Las colonias de 10 días en malta-agar, avena-agar o papa-dextrosa-agar, son blancas a crema, delicadas, con el reverso incoloro a pálido o amarillo intenso. Las hifas son de 1-2 micras de ancho. Las fiálidas se desarrollan en forma solitaria, en pares o en verticilos de 3 a 4 en conidióforos pobremente desarrollados. Estas son delicadas de tamaño muy variable dependiendo esto de la raza y la edad del cultivo (Revista do Instituto de Café do Estado de Sao Paulo, 1939).

En Extracto de malta agar a 20 °C las colonias alcanzan un diámetro de 1.8 - 2.2 cm en 10 días, éstas son algodonosas, raramente fasciculadas, blancas o amarillo pálido. El reverso de la colonia es incoloro, amarillo u ocráceo. Fiálidas solitarias o en verticilos, surgiendo de conidióforos o de hifas aéreas solitarias diferenciadas,

variables en tamaño, mayormente de 12-40 \* 0.8-3 micras. Las conidias usualmente uniceldadas en cabezas o arregladas oblicuamente, cilíndricas con ambos bordes redondeados o elipsoidales, 2.3-10 \* 1-0.26 micras. Clamidosporas ausentes.

Una de las características que diferencia a *Verticillium lecanii*, de las especies patogénicas, es la producción de blastosporas que se forman en cultivo sumergido.

#### 4. METODOLOGIA

El presente trabajo se llevó a cabo en diferentes localidades de Nicaragua durante los meses de noviembre 1991 a octubre 1992, y consistió en cuatro etapas: muestreo de *Verticillium* sobre la roya en fincas de diferentes zonas cafetaleras del país, evaluación de la actividad de *Verticillium* como colonizador del filoplano (en invernadero), evaluación de *Verticillium* como hiperparásito de *H. vastatrix*, y evaluación del efecto de *Verticillium* sobre la germinación de las uredosporas de *H. vastatrix*.

##### 4.1. Muestreo de *Verticillium* sp como hiperparásito de la roya del cafeto en diferentes zonas cafetaleras del país.

Esta etapa se desarrolló durante el periodo de Diciembre 1991 a Febrero 1992, en las regiones III, IV y VI del país.

Se seleccionaron tres zonas cafetaleras, una en la zona norte central y dos en el pacífico sur del país.

##### 4.1.1. Descripción y ubicación de las zonas de estudio.

El Crucero (Región III) está ubicado entre los 11º 58' de latitud Norte, y 86º 18' de longitud Oeste; presenta elevaciones de hasta 910 msnm. La temperatura promedio anual es de 22 ºC, y la precipitación promedio anual es de 1693 mm. Predomina la formación ecológica bosque húmedo premontano.

La Región IV está ubicada entre los 11º 05' latitud Norte, y 85º, 53' de longitud Oeste. Limita al noreste con

los departamentos de Boaco y Chontales, al noroeste con el Océano Pacífico y Managua, al sur con el Océano Pacífico, y al sureste con el lago Cocibolca. Presenta elevaciones que van desde 50 hasta 923 msnm. La temperatura promedio anual es de 26.6 °C (mínima de 14.5 °C, máxima de 38 °C); la precipitación promedio anual es de 1477 mm, y la humedad relativa es de 76 %. Presenta bosques húmedos y bosques secos como formaciones ecológicas dominantes.

El departamento de Matagalpa (Región VI) está ubicado en la región interior central de Nicaragua. Sus coordenadas son : 13° 18' y 12° 31' de latitud Norte, y 86° 16' y 85° 5' de longitud Oeste. Limita al norte con el departamento de Jinotega, al sur con los departamentos de Boaco y Managua, al este con el departamento de Zelaya y al oeste con los departamentos de Estelí y León. La precipitación anual varía de 1000 a 2500 mm. La temperatura varía entre 20 y 30 °C.

En cada zona se seleccionaron dos fincas y en cada finca se escogieron al azar cuatro sitios de muestreo, en cada uno de los cuales se marcaron seis plantas, escogiendo de éstas seis bandolas.

Las fincas seleccionadas presentaban las siguientes características:

#### 4.1.1.1 Zona El Crucero.

##### Finca El Jardín 1.

Ubicada en la localidad de El Crucero, Managua, región III.

Altitud: 890 msnm, la variedad de café es Caturra; presenta edad aproximada de 17 años.

Distancias de siembra: 1.5 m entre surco y 1.5 m entre planta, para una población aproximada de 4400 plantas/ha.

Los cafetales se manejan con aproximadamente 45 % de sombra.

Uso de agroquímicos: el uso de éstos es muy irregular, en los dos últimos años (1990-92) no se han hecho ningún tipo de aplicaciones.

La segunda finca de esta zona, El Jardín 2, presenta las mismas características que la primera.

#### **4.1.1.2. Zona Carazo.**

##### **Finca El Asilo.**

Ubicada en la localidad de San Marcos, Carazo región IV del país, y presenta las siguientes características:

Altitud: 670 msnm. La variedad de café es Catuai, con edad de 7 años.

Las distancias de siembra son de: 1.5 m entre surcos y 0.7 m entre plantas, para una población aproximada de 9400 plantas/ha, y el nivel de sombra es de 20%.

La aplicación de fertilizantes se hace de manera regular, es decir existe un sistema planificado de fertilización. Además se hace control químico de malezas. En el ciclo 1991-92 se realizó aplicación de insecticidas contra broca y cochinilla.

##### **Finca El Paraíso.**

Ubicada en la misma zona que El Asilo, en el departamento de Carazo en la región IV del país. Presenta las siguientes características:

Altitud: 685 msnm. La variedad de café es Catuai, y presenta edad aproximada de 14 años.

Patrón de siembra tradicional, cuyas distancias de siembra son de 2.1 m entre surco y 0.7 m entre plantas, para una población aproximada de 6700 plantas/ha. Los cafetales presenta un nivel de sombra de 40%.

La aplicación fertilizantes es irregular, ya que no se tiene un programa establecido de fertilización. Se hace control químico de malezas y se aplica poco insecticidas. Durante el ciclo 1991-92 no se hicieron aplicaciones de fungicidas.

#### **4.1.1.3. Zona de Matagalpa.**

##### **Finca El Coyolar I.**

Ubicada en la localidad de El Tuma, Matagalpa, región VI, a una altitud: 700 msnm.

Variedad de café: Caturra, 11 años de edad.

Patrón de siembra es tradicional, con distancias de 1.4 m entre surcos y 1.4 m entre plantas, para una densidad aproximada de 5100 plantas/ha. El nivel de sombra de los cafetales es aproximadamente del 50%.

El uso de agroquímicos es bastante irregular, durante el ciclo 1991-92, en agosto se aplicó una mezcla de cobre más endosulfan.



### Finca El Coyolar II.

Ubicación: Está situada en El Tuma ,Matagalpa, región VI.

Altitud: 700 msnm.

Variedad de café: Caturra, de aproximadamente 12 años de edad.

El sistema de siembra es tradicional, con distancias de 1.75 m entre surcos y 1.4 m entre plantas, para una población de aproximadamente 4000 plantas/ha. Los cafetales presentan un nivel de sombra aproximado del 50 %.

Durante los dos últimos años (1990-92), no se han aplicado agroquímicos.

Para todas las fincas, los datos se tomaron cada 15 días. Las variables evaluadas fueron:

- Número de hojas totales (NHT).
- Número de hojas con roya (NHR).
- Número de hojas con *Verticillium* (NHRV).
- Número de pústulas.
- Número de pústulas hiperparasitadas.

Con estos datos se procedió a calcular la incidencia de la roya, así como la incidencia de *Verticillium*, basados en las siguientes fórmulas:

Incidencia de roya=  $NHR/NHT$ .

Incidencia de *Verticillium*=  $NHRV/NHR$ .

#### 4.2. Evaluación de dos aislamientos y cuatro concentraciones del hongo *Verticillium* sp contra la roya del cafeto.

##### 4.2.1. Aislamiento y producción de *Verticillium* sp, para ser utilizado en experimentos a nivel de invernadero.

La metodología empleada para la producción del hongo es similar a la usada en el proyecto de hongos entomopatógenos del Centro Nacional de Protección Vegetal, para la producción masiva de *Beauveria bassiana*.

El hongo fue aislado de muestras frescas de roya que estaban hiperparasitadas, y luego cultivado en platos de petri conteniendo el medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar) y mantenido a temperaturas entre 23 y 25 °C. Cuando las colonias del hongo estaban bien desarrolladas (15 días), éste fue transferido a un medio líquido contenido en erlenmeyers de 250 ml. El medio estaba constituido por :

|                                 |          |
|---------------------------------|----------|
| Afrecho                         | 25.00 g. |
| Levadura de cerveza             | 10.00 g. |
| CaCl <sub>2</sub>               | 0.25 g.  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 13.60 g. |
| NaOH                            | 2.32 g.  |
| Agua destilada                  | 1 litro. |

Al cabo de 15 días el hongo logró colonizar completamente la superficie del medio. Entonces se procedió a cultivarlo en un medio sólido que consistía en sorgo precocado, a una

precocido, a una proporción de 30 cc de inóculo por 100 g de sorgo, contenido en erlenmeyers de 500 ml.

Después de un mes de haber sido sembrado el hongo se establece plenamente en el medio sólido y está listo para ser cosechado. La cosecha se hizo de la siguiente manera:

- El contenido de cada erlenmeyer se lavó con 2 litros de agua destilada estéril con tween-20 al 0.01%. Se filtró el lavado en un tamiz de 200 micras. Posteriormente este lavado fue centrifugado a 3800 rpm durante 20 minutos, obteniéndose finalmente una crema del hongo, a partir de la cual se preparan las diferentes concentraciones que van a ser usadas.

El cultivo del hongo se hizo con la finalidad de obtener material suficiente, con una buena producción de conidias. Se usó esta metodología de producción, dado que la producción de conidias en PDA era muy baja. Sin embargo, al final se logró observar que en el medio líquido se presentaba una buena producción de conidias, y que la viabilidad de éstas era superior a la de las producidas en el medio sólido. Por esta razón, la fuente de material del *Verticillium* para las evaluaciones en el experimento de invernadero fueron los cultivos en el medio líquido. La preparación del material se hizo, agregando 100 ml de agua destilada estéril a cada erlenmeyer que contenía el cultivo, agitando luego para lograr homogenizar la suspensión de conidias.

#### 4.2.2. Establecimiento del Experimentos.

Este se desarrolló de Agosto a Octubre 1992, en el Centro Experimental del Café, San Ramón Matagalpa.

Se emplearon plantas de café variedad catuai amarillo de ocho meses de edad y sembradas en bolsas de polietileno en un sustrato de suelo.

##### 4.2.2.1. Inoculación de la roya.

La inoculación de la roya en las plantas de cafeto se hizo por aspersión de un volumen de 5 ml de suspensión de uredosporas en concentración de 2 mg/ml Tween-20 al 0.2 % en agua destilada estéril. La suspensión de uredosporas era aplicada en el envés de las hojas, inoculando todas las hojas de la planta. La aspersión de la suspensión de esporas se hizo con un atomizador Devilbiss Nº 15.

Las plantas se mantuvieron en la oscuridad, con alta humedad relativa (99%), y temperatura entre 23 y 25 °C durante 36 horas después de la inoculación.

Para garantizar condiciones de alta humedad relativa se utilizó una cámara húmeda forrada con cubierta plástica, además se colocó un humidificador al momento de depositar las plantas inoculadas en la cámara, el cual se mantuvo durante 18 horas. Posteriormente, las plantas fueron trasladadas de la cámara húmeda al invernadero, donde se les dio el seguimiento establecido para el experimento.

En el invernadero, las condiciones de humedad fueron bastantes estables variando durante el día desde 75% hasta 99% de humedad relativa. La temperatura varió desde 21 °C por

las noches, hasta 29 °C en las horas más calientes durante el periodo del experimento.

El inóculo de roya consistió en una mezcla de uredosporas frescas (colectadas inmediatamente antes de ser inoculadas), más uredosporas almacenadas por 7 días mediante el método descrito por Zambolim, 1973, (citado por Alvarez y Sierra, 1989). Este método consiste en colectar las esporas directamente de las pústulas luego son depositadas en cápsulas de gelatina las cuales a su vez son depositadas en tubos de ensayo que se sumergen en un medio de ácido sulfúrico al 32.6 %(v/v) hasta 1/3 del tubo. Posteriormente el recipiente que los contiene es colocado a temperatura de 4 °C. El porcentaje de germinación de las uredosporas empleadas como inóculo fue de 80 %.

Para la evaluación de la actividad de *Verticillium* sp como agente de control de la roya, se realizaron dos experimentos, los cuales se describen a continuación:

#### **4.2.3 Evaluación de la actividad *Verticillium* sp como hongo colonizador del filoplano (en condiciones de invernadero).**

Los tratamientos consistieron en dos aislamientos de *Verticillium* sp provenientes de la zona Norte Central (El Coyolar, Tuma, Matagalpa) y del Pacífico Sur del país (El Crucero, Managua) respectivamente, aplicados en cuatro

concentraciones, siendo éstas  $2.5 \times 10^4$ ,  $10^5$ ,  $1.75 \times 10^5$  y  $2.5 \times 10^5$  esporas/ml.

Estas concentraciones fueron determinadas en un hematocímetro con cámara de conteo Neubauer de 0.1 mm de profundidad.

La aplicación de los tratamientos se hizo 72 horas después de la inoculación con roya, utilizando para ello un atomizador Devilbiss Nº 15.

Las diferentes concentraciones conidiales de *Verticillium* sp fueron preparadas en una solución de Tween-20 al 0.01 %.

Una vez establecido el experimento se hicieron observaciones semanales para ver la aparición de los primeros síntomas.

La toma de datos se hizo cada 7 días a partir de la aparición de los primeros síntomas, lo cual ocurrió 25 días después de la inoculación.

Las variables medidas fueron las siguientes:

- Número de hojas totales (NHT).
- Número de hojas con roya (NHR).
- Número de hojas con roya y *Verticillium* (NHRV).
- Número de pústulas (NP).
- Número de pústulas hiperparasitadas (NPV).

Con éstos datos se procedió a calcular la incidencia de roya y la incidencia de *Verticillium* sp.

Incidencia de roya=  $NHR/NHT$

Incidencia de *Verticillium*=  $NHRV/NHR$ .

Incidencia de *Verticillium* = NPV/NP (a nivel de pústula).

#### 4.2.4. Evaluación de *Verticillium* sp como hiperparásito de *H. vastatrix*.

Para hacer estas evaluaciones se emplearon plantas de cafeto las cuales habían sido inoculadas previamente con roya y que al momento de el establecimiento del experimento presentaban pústulas. Los tratamientos aplicados consistieron en los mismos aislamientos del hongo empleados en el experimento anterior, pero usando unicamente dos concentraciones, siendo éstas  $10^5$  y  $2.5 \times 10^5$  esporas por mililitro en una solución de Tween-20 al 0.01%. La aplicación de las esporas de los dos aislamientos se hizo en el envés de la hoja, y el volumen asperjado fue de 5 ml por planta.

Los datos se tomaron cada 5 días a partir del quinto día después de la aplicación de *Verticillium* sp.

Para los dos experimentos la planta constituía la unidad experimental, y se tenían 10 repeticiones, incluyendo un testigo al cual solamente se le aplicó agua destilada al momento que se aplicaron los demás tratamientos.

Los datos que se obtuvieron fueron los siguientes:

- Número de hojas totales (NHT).
- Número de hojas con roya (NHR).
- Número de hojas con roya y *Verticillium* (NHRV).
- Número de pústulas (NP).
- Número de pústulas hiperparasitadas (NPV).

Con éstos datos se procedió a calcular la incidencia de roya y la incidencia de *Verticillium sp* de la siguiente manera:.

Incidencia de roya=  $NHR/NHT$

Incidencia de *Verticillium*=  $NHRV/NHR$ .

Incidencia de *Verticillium* =  $NPV/NP$  (a nivel de pústula).

#### 4.2.5. Evaluación de *Verticillium sp* como inhibidor de la germinación de uredosporas de *H. vastatrix*.

La suspensión de las uredosporas de roya utilizada tenía una concentración de  $10^8$  uredosporas/ml, y para *Verticillium sp* la concentración empleada fue de  $2.5 * 10^8$  esporas/ml.

Las pruebas de germinación de uredosporas de roya se hicieron en platos de petri conteniendo el medio de agar-agua al 2%. Sobre la superficie del medio se depositaban de manera distribuida 5 gotas de la suspensión de uredosporas. Para el caso de prueba de germinación con *Verticillium sp*, sobre la gota de la suspensión de uredosporas se colocaba la gota de la suspensión conidial de *Verticillium sp*.

Una vez que las esporas de ambos hongos eran depositadas en el medio, los platos de petri se colocaban en incubadora a temperatura de 21 °C. Las lecturas de germinación de las uredosporas de roya se hacían 16 horas después, observando 5 campos microscópicos en cada una de las 5 gotas de las suspensiones colocadas en el medio.



### 4.3. Análisis de los datos.

La incidencia de *H. vastatrix* y de *Verticillium* sp para cada finca en las diferentes zonas fue analizada mediante análisis de regresión, para obtener la ecuación de mejor ajuste que representara la curva de desarrollo de ambos hongos en el tiempo. En la ecuación ajustada se definió a Y como incidencia; y a X como número de muestreo, el cual equivale a períodos quincenales.

En los experimentos en invernadero, para evaluar la incidencia de roya, cuando la aplicación de los aislamientos de *Verticillium* se hizo 72 horas después de la inoculación, se realizaron análisis de varianza empleando la técnica de contrastes ortogonales, para conocer el efecto de cada uno de los tratamientos sobre el comportamiento de la enfermedad, y saber si hay diferencias entre éstos, incluyendo al testigo.

Además se estimó el parámetro área debajo de la curva de progreso de la enfermedad, el cual fue también sometido a análisis de varianza, empleando la técnica de contrastes ortogonales.

No se analizó la incidencia de *Verticillium* sp debido a que ésta fue muy baja, y no se presentó, si no hasta el final del estudio, y no en todo los tratamientos.

En el experimento establecido para evaluar el hiperparasitismo de *Verticillium* sp sobre las pústulas de roya, se obtuvieron datos de incidencia de roya y de *Verticillium* sp. En ambos casos para hacer comparaciones entre tratamientos se hicieron análisis de contrastes

ortogonales entre tratamientos y entre grupos de tratamientos incluyendo el testigo, para la variable incidencia.

Por otro lado, tanto para la incidencia de roya, como para la incidencia de *Verticillium*, se estimó el parámetro área debajo de la curva de progreso para cada tratamiento, el cual fue sometido a análisis de varianza mediante contrastes ortogonales.

Para evaluar el efecto de *Verticillium* sp sobre la germinación de las royas, la variable porcentaje de germinación de uredosporas de roya en presencia y/o en ausencia de *Verticillium* sp fue analizada mediante a una prueba de t de Student.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION.

### 5.1. Muestreo de *Verticillium* como hiperparásito de la roya del cafeto en diferentes zonas cafetaleras.

La incidencia de roya que se presenta en este análisis es relativamente alta para la mayoría de las fincas muestreadas; sin embargo, el número promedio de pústulas por bandola es bajo (Cuadro 1), lo mismo sucede con las pústulas hiperparasitadas (cuadro 2). Esto se debe a que la incidencia de roya se calcula dividiendo el número de hojas que presentan roya, entre el número total de hojas, sin considerar el número de pústulas que éstas presenten.

Para *Verticillium* sp, la incidencia es calculada dividiendo el número de hojas con roya que están hiperparasitadas, entre el total de hojas que presentan roya.

Cuadro 1. Promedio de pústulas de roya por bandola, en diferentes fincas y fechas de muestreo.

| Fincas    | Fechas de muestreo |      |      |       |      |      |      |      |         |      |
|-----------|--------------------|------|------|-------|------|------|------|------|---------|------|
|           | Diciembre          |      |      | Enero |      |      |      |      | Febrero |      |
|           | 10                 | 17   | 24   | 1     | 8    | 16   | 23   | 31   | 7       | 15   |
| Jardín 1  | --                 | 10.5 | --   | 13.9  | --   | 12.9 | --   | 16.3 | --      | 19.2 |
| Jardín 2  | --                 | 2.2  | --   | 3.0   | --   | 3.5  | --   | 6.4  | --      | 6.8  |
| Asilo     | --                 | 7.4  | --   | 10.4  | --   | 8.6  | --   | 9.5  | --      | 7.7  |
| Paraiso   | --                 | 31.2 | --   | 47.6  | --   | 30.6 | --   | 23.3 | --      | 14.3 |
| Coyolar 1 | 16.6               | --   | 25.0 | --    | 28.1 | --   | 41.0 | --   | 38.0    | --   |
| Coyolar 2 | 18.9               | --   | 29.9 | --    | 28.1 | --   | 32.4 | --   | 31.4    | --   |

Cuadro 2. Promedio de pústulas de roya hiperparasitadas por bandola, en diferentes fincas y fechas de muestreo.

| Finca     | Fechas de muestreo |     |     |       |     |     |     |     |         |     |
|-----------|--------------------|-----|-----|-------|-----|-----|-----|-----|---------|-----|
|           | Diciembre          |     |     | Enero |     |     |     |     | Febrero |     |
|           | 10                 | 17  | 24  | 1     | 8   | 16  | 23  | 31  | 7       | 15  |
| Jardín 1  | --                 | 1.1 | --  | 3.2   | --  | 0.9 | --  | 0.9 | --      | 0.9 |
| Jardín 2  | --                 | 0.3 | --  | 0.3   | --  | 0.3 | --  | 0.2 | --      | 0.5 |
| Asilo     | --                 | 0.2 | --  | 0.2   | --  | 0.2 | --  | 0.1 | --      | 0.0 |
| Paraiso   | --                 | 1.5 | --  | 0.6   | --  | 0.6 | --  | 0.2 | --      | 0.1 |
| Coyolar 1 | 0.5                | --  | 0.8 | --    | 0.4 | --  | 0.7 | --  | 0.7     | --  |
| Coyolar 2 | 0.5                | --  | 0.8 | --    | 1.1 | --  | 1.4 | --  | 0.5     | --  |

#### 5.1.1. Zona El Crucero, Región III.

##### Finca El Jardín 1.

En la Figura 1, se presenta la incidencia de roya y *Verticillium* para esta finca, y se observa que la roya tuvo un comportamiento ascendente comenzando desde 26 %, hasta alcanzar al final del estudio 50 % de incidencia. La ecuación  $Y = 17.5 + 6.7X$  ( $R^2 = 0.96$ ) describe el comportamiento de la curva de progreso de la enfermedad.

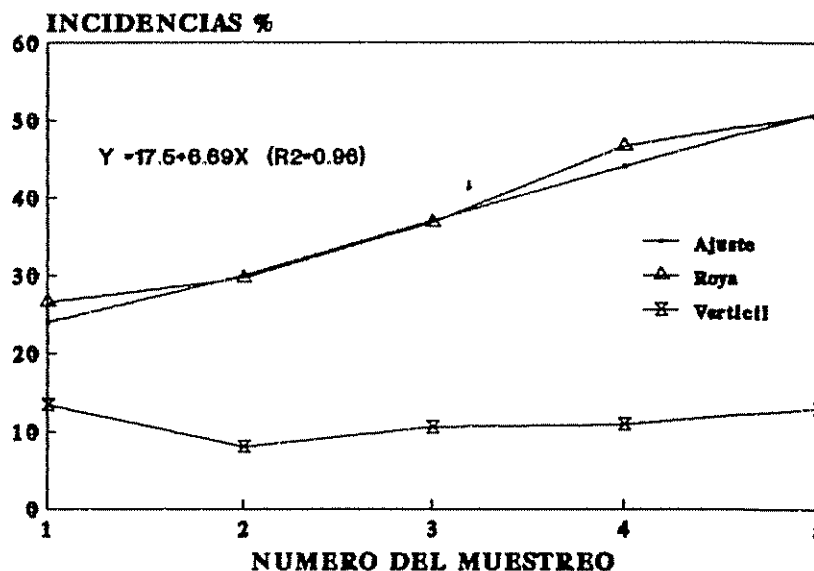


Figura 1. Comportamiento de la roya del cafeto y de *Verticillium* sp, en la finca El Jardín 1, de acuerdo a muestreos quincenales, iniciados en Diciembre 17/1992.

La incidencia de *Verticillium* sp fue baja, y presentó un comportamiento horizontal a lo largo del tiempo, es decir que aún con el avance del tiempo y el progreso de la roya, la incidencia del hiperparásito no progresa, ya que la incidencia al final del muestreo, es la misma que la que presentaba al inicio, siendo ésta de 13 % .

Durante el periodo de estudio se observó ausencia total de lluvias. Solamente antes del estudio durante el mes de noviembre y los primeros 10 días de diciembre se registraron algunas precipitaciones (Anexo 1).

Se asume que la falta de humedad, así como la cantidad de roya presente, influyeron sobre el progreso del hiperparásito.

### Finca El Jardín 2.

En esta finca la incidencia de roya presentó un comportamiento ascendente, y fue menor que en la anterior, presentando al inicio del muestreo incidencia de 6 %, alcanzando al final de éste 22 % de incidencia. La ecuación  $Y = 4.12X$  ( $R^2=0.96$ ) describe la curva de progreso de la enfermedad en el tiempo (Figura 2).

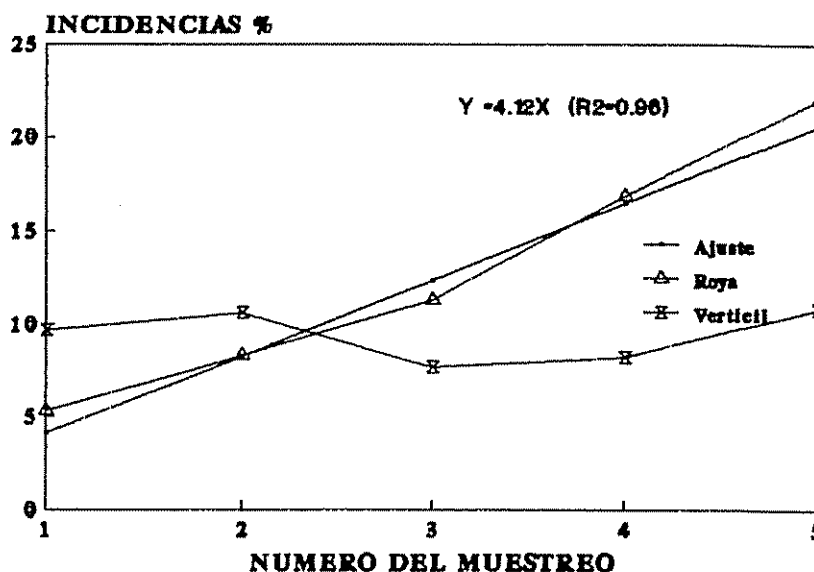


Figura 2. Comportamiento de la roya del cafeto y de *Verticillium* sp, en la finca El Jardín 2, de acuerdo a muestreos quincenales, iniciados en Diciembre 17/1992.

La incidencia de *Verticillium*, fue baja, y lo mismo que en los casos anteriores presentó un patrón horizontal, es decir que su incidencia no varió mucho en el tiempo. Al inicio del muestreo la incidencia de *Verticillium* sp era de 10 %, llegando a alcanzar al final del mismo un nivel de incidencia de 11 %.

Dado que para esta finca las condiciones climáticas fueron las mismas que para la anterior, podemos afirmar que la ausencia de lluvias tuvo el mismo efecto sobre el hiperparásito que en el caso anterior, ya que aunque se presentó alguna incidencia de roya, probablemente la disponibilidad de ésta no era lo suficiente para el hiperparásito.

La temperatura en esta zona osciló entre 21 y 23 °C durante el periodo en estudio.

#### 5.1.2.Zona Carazo, Región IV.

##### Finca El Asilo.

En la Figura 3 se presenta la incidencia de roya y de *Verticillium* en esta finca, encontrando que al inicio del muestreo la incidencia de la enfermedad fue aproximadamente del 17 %, alcanzando un máximo de 36 % al final del estudio. La ecuación que describe el progreso de la enfermedad es  $Y = 12.5 + 4.75X$ , ( $R^2 = 0.96$ ).

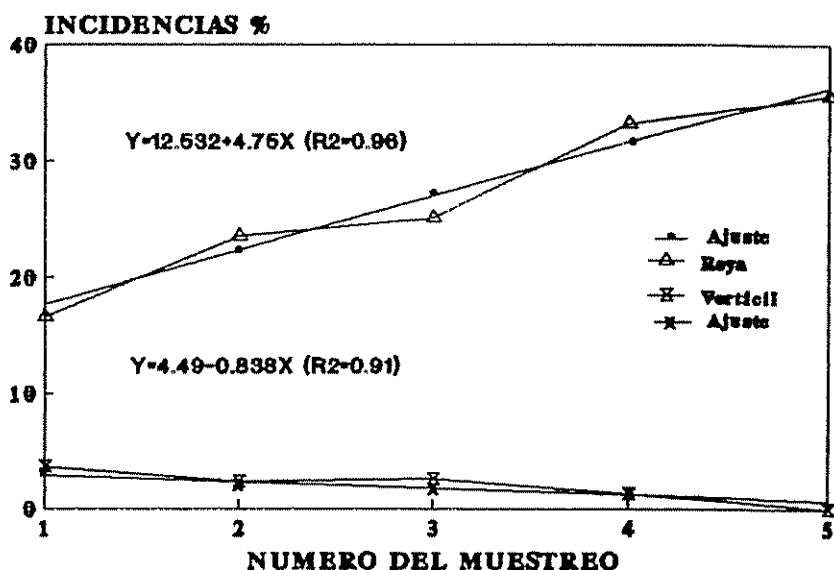


Figura 3. Comportamiento de la roya del cafeto y de *Verticillium* sp, en la finca El Asilo, de acuerdo a muestreos quincenales, iniciados en Diciembre 17/1992.

En esta finca la incidencia de *Verticillium* sobre la roya del cafeto fue relativamente baja. El mayor valor de incidencia se observó al inicio del muestreo, y fue de 4 %, descendiendo hasta 0 % de incidencia al final del mismo, la ecuación que describe éste comportamiento es  $Y= 4.49-0.838X$  ( $R^2=0.91$ ). Se observa como, tanto la incidencia de roya como la de *Verticillium* fue baja, ésta baja incidencia de ambos hongos, se debe probablemente a que los cafetales se manejan sin sombra, además las condiciones de humedad no fueron las más adecuadas para el desarrollo de ambos hongos, aun cuando la densidad del cultivo es alta. por otro lado los cafetos



son jóvenes, y es de esperarse que sean menos atacados por *H. vastatrix*.

Hay que recordar que *Verticillium* sp se establece sobre las pústulas de roya, de manera que entre más roya se presente, probablemente hay más oportunidad para el establecimiento del hiperparásito. En éste caso es probable que la baja incidencia de la roya, además de las condiciones climáticas presentes tuvieron mucho efecto sobre la incidencia del hiperparásito, por lo cual éste tuvo pocas posibilidades de establecerse, presentando un nivel de incidencia menor con relación a las demás fincas.

#### **Finca el Paraíso.**

La incidencia de roya y *Verticillium* en ésta finca, durante el periodo en estudio, se presenta en la Figura 4. Aunque la incidencia de la roya fue relativamente alta, ésta tuvo un comportamiento horizontal en el tiempo, es decir que la incidencia de la enfermedad no cambiaba en el transcurso del mismo. Al inicio del muestreo se observó 60 % de incidencia de la enfermedad, incrementándose un poco, hasta alcanzar 79 %, y regresar a 62 % de incidencia al final del muestreo.

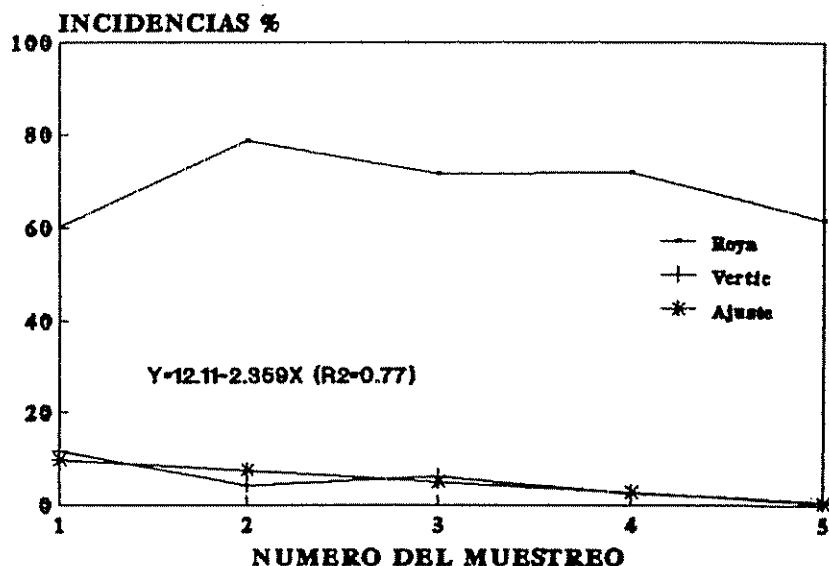


Figura 4. Comportamiento de la roya del cafeto y de *Verticillium* sp, en la finca El Paraíso, de acuerdo a muestreos quincenales, iniciados en Diciembre 17/1992.

La incidencia de *Verticillium* fue relativamente baja, y presentó un comportamiento descendente, presentando al inicio del muestreo 12 % de incidencia, descendiendo hasta el 1 % de incidencia del hiperparásito al final del estudio. La ecuación que describe tal comportamiento es :

$$Y = 12.11 - 2.36X \quad (R^2 = 0.77).$$

Se puede observar que la incidencia de *Verticillium* sp no alcanza valores muy altos, aún cuando la incidencia de roya fue mayor del 50 %, es decir existía suficiente sustrato para el establecimiento del hiperparásito, sin embargo la incidencia de éste fue baja, lo que nos induce a pensar que existen otros factores, probablemente ambientales que

determinan la incidencia del hiperparásito. Kushalappa (1989), observó que en condiciones de campo la tasa de supervivencia de *V. hemileiae* es muy baja, y que esto se debe probablemente al principal factor limitante del hiperparásito, como lo es la humedad. Hay que hacer notar que durante el periodo en estudio las precipitaciones fueron muy bajas, acumulándose únicamente 8 mm de lluvia. Además después del primer muestreo se presentó un periodo de tres semanas con ausencia total de lluvias (Anexo 2). Todo esto nos sugiere que la poca humedad predominante durante el estudio tuvo influencia sobre el hiperparásito.

Aunque ésta finca se ubica en similares condiciones que El Asilo, la incidencia de roya y de *Verticillium* sp fue mayor, lo cual se debe muy probablemente a que en El Paraiso los cafetales se manejan con mayor nivel de sombra, y la edad de los cafetos es mayor.

La temperatura fue bastante estable y osciló entre 22 y 24 °C durante el periodo en estudio.

#### 5.1.3. Zona Matagalpa, Región VI.

En ambas fincas, el comportamiento de la roya fue ascendente, y la incidencia fue relativamente alta. En cambio el nivel de incidencia de *Verticillium* fue baja ya que nunca fue mayor del 11 %. Además ésta fue muy poco variable en el transcurso del tiempo.

### Finca El Coyolar 1.

En la Figura 5 se presenta la incidencia de roya y de *Verticillium* sp para la finca 1 de El Coyolar. Como se puede observar al inicio del muestreo el nivel de incidencia de *H.vastatrix* era de 31 %, aumentando en el tiempo, hasta alcanzar 71 % al final del muestreo. La ecuación  $Y = 23.14 + 10.8X$  ( $R^2 = 0.96$ ) describe el comportamiento de la curva de progreso de la enfermedad durante el periodo en estudio.

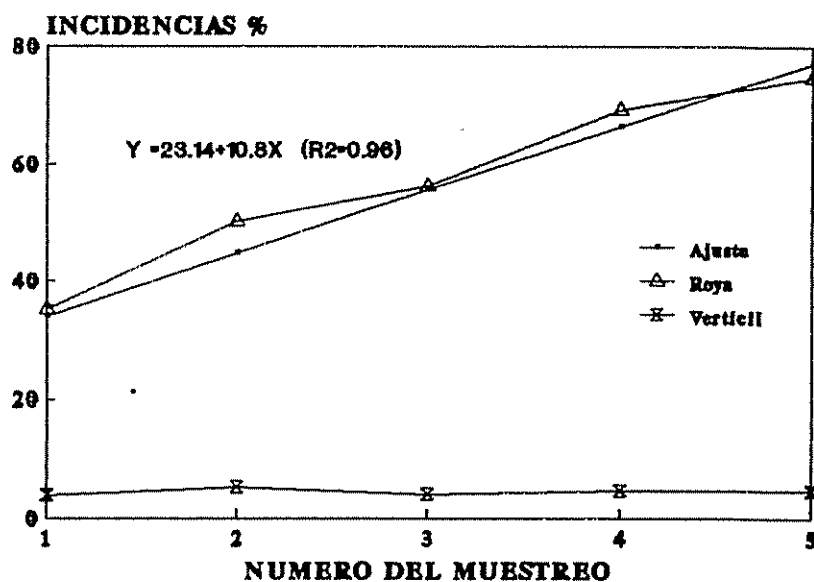


Figura 5. Comportamiento de la roya del cafeto y de *Verticillium* sp, en la finca El Coyolar 1, de acuerdo a muestreos quincenales, iniciados en Diciembre 10/1992.

Al inicio del muestreo la incidencia de *verticillium* sp era del 4 %, alcanzando al final del estudio un nivel de incidencia de 5 %. Es decir que durante 8 semanas que duró el

muestreo, la incidencia de *Verticillium* sp permaneció prácticamente invariable. El grado de incidencia de *Verticillium* sp es bien bajo, ya que solamente entre el 4 y 5 % de las hojas que presentan roya es hiperparasitado.

#### Finca El Coyolar 2.

La incidencia de roya y *Verticillium* para la finca 2 de El Coyolar se presenta en la Figura 6. Se observa que la incidencia de roya al inicio del muestreo era de 39 %, creciendo hasta alcanzar 68 % de incidencia al final del muestreo. El comportamiento de la curva de progreso de la enfermedad en dicha finca es descrita por la ecuación  $Y = 34.62 + 7.79X$  ( $R^2 = 0.89$ ).

El nivel de incidencia de roya encontrado en ambas fincas es similar, lo cual se debe a que las condiciones de los cafetales (variedad, edad, densidad y sombra), son muy similares en las dos fincas.

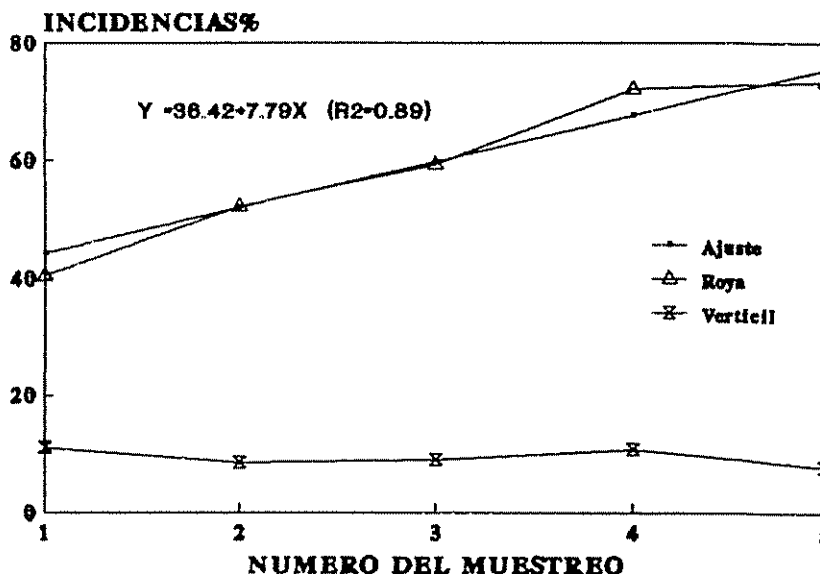


Figura 6. Comportamiento de la roya del cafeto y de *Verticillium* sp, en la finca El Coyolar 2, de acuerdo a muestreos quincenales, iniciados en Diciembre 10/1992.

La incidencia de *Verticillium* sp en esta finca fue baja, aunque un poco mayor que en la finca anterior. El comportamiento del hiperparásito fue casi invariable en el transcurso del tiempo. El mayor nivel de incidencia (11 %) se observó en la primera fecha de muestreo, y el menor valor (8 %) se observó al final del período del muestreo.

La menor incidencia de *Verticillium* sp observada en la finca 1, se debe probablemente a que en ésta finca se hizo una aplicación de cobre en el mes de agosto, lo cual pudo haber afectado al hiperparásito, y no a la enfermedad.

La precipitación acumulada para ésta zona durante el período de estudio fue de 70 mm, distribuidos a lo largo del

período de estudio. Solamente en el período correspondiente al último muestreo no se presentaron lluvias (Anexo 3).

La temperatura fue bastante estable, variando entre 21 y 22 °C durante el período que duró el muestreo.

En ésta zona se presentaron mejores condiciones para la actividad del hiperparásito, ya que además de un buen nivel de incidencia de roya, las condiciones de humedad fueron superiores a las demás zonas.

En general en las zonas cafetaleras estudiadas se presentaron diferentes niveles de incidencia de roya, variando desde 16 % al inicio del muestreo en la finca El Asilo, hasta alcanzar 79 % de incidencia en el segundo muestreo en la finca El Paraíso. En todas las fincas el comportamiento de la de roya fue ascendente, es decir que el menor nivel de incidencia se presentó en la primera fecha de muestreo, y el mayor nivel al final del muestreo; a excepción de la finca El Paraíso, donde el mayor nivel de incidencia se presentó en la segunda fecha de muestreo, descendiendo luego, hasta terminar con un nivel de incidencia ligeramente mayor que el observado al inicio del muestreo.

Aunque se presentaron diferentes niveles de incidencia de roya en las fincas durante el muestreo y las condiciones de clima y de manejo de los cafetales fueron también diferentes para cada zona (Cuadro 3), la incidencia de *Verticillium* tuvo el mismo comportamiento; a excepción de las fincas El Asilo y El Paraíso, donde la incidencia del hiperparásito fue

decaendo, hasta desaparecer por completo al final del muestreo. El comportamiento de *Verticillium* sp sobre la roya, observado durante éste muestreo nos indica que independientemente de la cantidad de roya presente, la capacidad de hiperparasitismo de *Verticillium* sp en condiciones naturales es relativamente baja, ya que los resultados nos muestran que no más del 14 % de las hojas con roya presentes en el campo, presentan hiperparasitismo por *Verticillium* sp.

Cuadro 3. Características principales de las fincas en las que se realizó el muestreo de *Verticillium* sp.

| Finca<br>y<br>Región | Alti-<br>tud<br>(msnm) | Variedad | Edad<br>(años) | Sombra<br>(%) | Incidencia % |       |        |       |
|----------------------|------------------------|----------|----------------|---------------|--------------|-------|--------|-------|
|                      |                        |          |                |               | Roya         |       | Vertic |       |
|                      |                        |          |                |               | inic         | final | inic   | final |
| <b>Reg III</b>       |                        |          |                |               |              |       |        |       |
| Jardín1              | 890                    | Caturra  | 17             | 45            | 26           | 50    | 13     | 13    |
| Jardín2              | 890                    | Caturra  | 17             | 45            | 6            | 22    | 10     | 11    |
| <b>Reg IV</b>        |                        |          |                |               |              |       |        |       |
| Asilo                | 670                    | Catuai   | 7              | 20            | 17           | 36    | 4      | 0     |
| Paraiso              | 685                    | Catuai   | 14             | 40            | 60           | 62    | 12     | 1     |
| <b>Reg VI</b>        |                        |          |                |               |              |       |        |       |
| Coyolar1             | 700                    | Caturra  | 11             | 50            | 31           | 71    | 4      | 5     |
| Coyolar2             | 700                    | Caturra  | 12             | 45            | 39           | 68    | 11     | 8     |

Con base en lo anterior podemos considerar que la incidencia de *Verticillium* sp sobre la roya del cafeto, está limitada en condiciones de campo. De acuerdo a los resultados de este estudio, dos factores limitantes a considerar serían: la cantidad inicial de roya presente y la humedad. Sin embargo, es necesario determinar otros factores abióticos que disminuyen la capacidad del hongo para hiperparasitar a *H. vastatrix* en condiciones de campo.



Por otro lado, es probable que el momento en que se desarrolló el muestreo no fue el más adecuado, dado que el ciclo de la roya ya estaba comenzado en todas las fincas, lo que no nos permitió evaluar la incidencia desde el inicio del mismo. Además el nivel de incidencia de la roya fue bajo, lo que no nos permitió saber que pasa con el hiperparasitismo con mayores niveles de incidencia de la enfermedad. Lo mismo pasó con la incidencia de *Verticillium* sp, ya que en ninguna de las fincas se observó el incremento de la incidencia del hiperparásito. Además en el período evaluado las condiciones climáticas fueron muy irregulares, lo que pudo haber tenido influencia importante sobre el hiperparásito.

## 5.2. Evaluación en invernadero, de la actividad de *Verticillium* sp como hongo colonizador del filoplano.

El análisis de Varianza para la incidencia de roya, nos indica que no hay diferencias entre los tratamientos, incluyendo el testigo.

Similares resultados se encontraron cuando se realizó análisis de varianza para el parámetro área debajo de la curva, lo que nos indica que la incidencia de la enfermedad fue igual tanto para los diferentes aislamientos y concentraciones como para el testigo. Sin embargo, el aislamiento procedente de el Coyolar en las concentraciones

$1.75 \times 10^5$  y  $2.5 \times 10^5$  esporas/ml, presentaron los valores más bajos de incidencia de la enfermedad en relación a los demás tratamientos. Los mayores valores de área debajo de la curva para la variable incidencia de roya se presentaron en los tratamientos  $CY2.5 \times 10^4$ , y  $CR2.5 \times 10^5$ . (Figura 7).

El comportamiento de la roya para los diferentes tratamientos, muestra que durante el primer mes del estudio, la incidencia de la enfermedad no incrementa, sin embargo después de ésta fase se observó un ligero incremento, el cual fue más sobresaliente para los tratamientos que al final presentaron mayor área debajo de la curva de progreso de la enfermedad.

Aunque la roya se presentó en todos los tratamientos en distinto grado, en general el nivel de incidencia fue bajo. Si consideramos el número de pústulas por planta, el promedio es aún más bajo, lo que nos indica que aunque un buen número de hojas fue hiperparasitado, el promedio de pústulas hiperparasitadas por hoja es bajo. Este comportamiento puede ser atribuido a la calidad del inóculo utilizado, o a que las condiciones ambientales donde se desarrolló el experimento no fueron las más adecuadas para el patógeno. Por otro lado al igual que en el muestreo en el campo, la incidencia de roya se calculó mediante la relación  $NHR/NHT$ , es decir que el número promedio de pústulas por planta no fué considerado para el análisis.

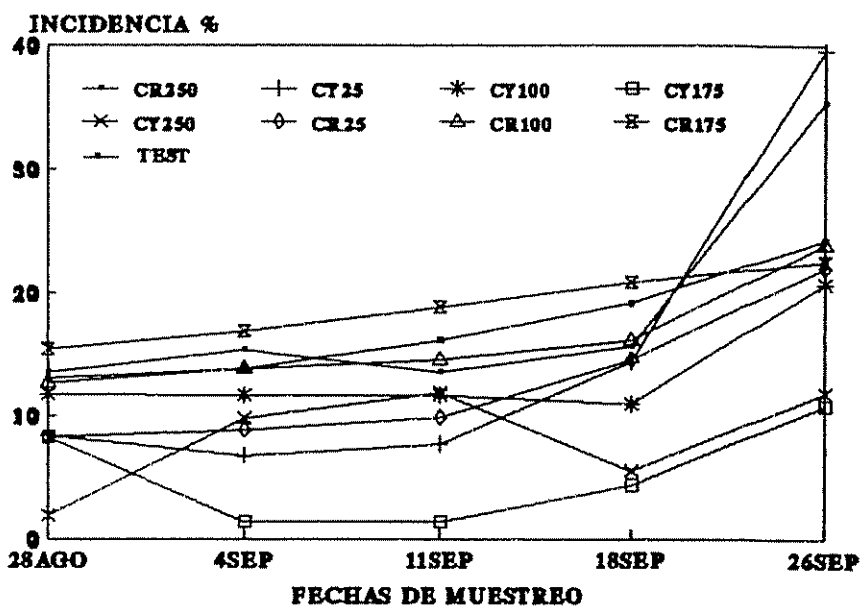


Figura 7. Incidencia de roya en respuesta a la aplicación de *Verticillium* 72 horas después de la inoculación en, condiciones de invernadero.

Aunque la incidencia de *Verticillium* sp se presentó en todos los tratamientos (excepto el testigo), la incidencia más sobresaliente se observó en las mayores concentraciones de ambos aislamientos, además en éstos la incidencia comenzó más temprano (Figura 8). Esto nos indica que la supervivencia del hongo en ausencia de las pústulas de roya es débil, y que solamente se logra observar cuando la cantidad de conidias es suficientemente alta, de manera que algunas conidias logran sobrevivir hasta el momento de aparición de las pústulas.

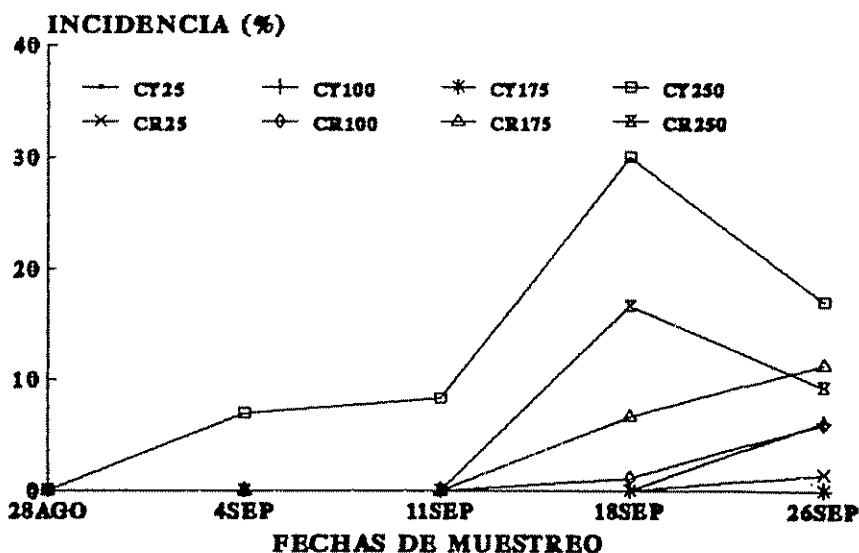


Figura 8. Incidencia de *Verticillium* aplicado 72 horas después de la inoculación de roya en condiciones de invernadero.

Este comportamiento nos induce a pensar que *Verticillium* sp actúa principalmente como hiperparásito y que su habilidad de colonizador del filoplano (epífita) se mejora en la medida que se dispone de altas concentraciones conidiales del hiperparásito. En la misma figura se observa para los tratamientos de mayor incidencia de *Verticillium* sp, que cuando ésta alcanza un nivel relativamente alto, en el siguiente muestreo se reduce; lo cual se explica por la caída de las hojas, cuando éstas están muy afectadas por roya e hiperparasitadas. Esta observación puede explicar por que en condiciones de campo la incidencia de *Verticillium* no supera el nivel observado, y que si ésta no disminuye es por que en

la medida que las hojas se caen, surgen nuevas pústulas hiperparasitadas por el hongo en otras hojas.

Sin embargo aunque algunos tratamientos presentaron una considerable incidencia de *Verticillium* sp, la incidencia de la roya fue estadísticamente igual para todos los tratamientos. El número promedio de pústulas y pústulas hiperparasitadas por bandola se presenta en el cuadro 4, notándose que la incidencia de la enfermedad aún en el testigo no es la más adecuada.

Cuadro 4. Número promedio de pústulas y pústulas hiperparasitadas por planta para los tratamientos aplicados 72 horas después de la inoculación.

| Trat  | Fechas de muestreo |     |      |     |       |     |       |     |       |     |
|-------|--------------------|-----|------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|
|       | 28Ago              |     | 4Sep |     | 11Sep |     | 18Sep |     | 26Sep |     |
|       | NP                 | NPV | NP   | NPV | NP    | NPV | NP    | NPV | NP    | NPV |
| CY25  | 1.0                | 0.0 | 1.0  | 0.0 | 2.0   | 0.0 | 4.0   | 0.0 | 19.0  | 0.2 |
| CY100 | 5.0                | 0.0 | 5.0  | 0.0 | 6.0   | 0.0 | 4.0   | 0.0 | 8.0   | 0.5 |
| CY175 | 3.0                | 0.0 | 0.0  | 0.0 | 0.0   | 0.0 | 1.0   | 0.0 | 5.0   | 0.0 |
| CY250 | 0.0                | 0.0 | 5.0  | 0.4 | 6.0   | 0.7 | 6.0   | 1.4 | 4.0   | 2.4 |
| CR25  | 3.0                | 0.0 | 4.0  | 0.0 | 4.0   | 0.0 | 5.0   | 0.0 | 10.0  | 0.0 |
| CR100 | 8.0                | 0.0 | 10.0 | 0.0 | 10.0  | 0.0 | 11.0  | 0.1 | 12.0  | 1.3 |
| CR175 | 9.0                | 0.0 | 11.0 | 0.0 | 12.0  | 0.0 | 12.0  | 0.5 | 12.0  | 2.2 |
| CR250 | 4.0                | 0.0 | 4.0  | 0.0 | 4.0   | 0.0 | 4.0   | 1.2 | 15.0  | 1.8 |
| TEST  | 4.0                | 0.0 | 5.0  | 0.0 | 5.0   | 0.0 | 6.0   | 0.0 | 6.0   | 0.0 |

NP= Número de pústulas.

NPV= Número de pústulas hiperparasitadas.

### 5.3. Evaluación de *Verticillium* sp como hiperparásito de *H. vastatrix*.

El análisis de varianza mediante la técnica de contrastes ortogonales, para la variable incidencia de roya, y para la variable incidencia de *Verticillium*, demostró que

para ambas variables no hubo diferencias significativas entre los tratamientos en estudio.

El análisis de varianza para el parámetro área debajo de la curva, demostró que no hay diferencias entre los tratamientos para la variable incidencia de roya, es decir que la enfermedad tuvo el mismo comportamiento para todos los tratamientos. Sin embargo para los dos aislamientos y las dos concentraciones, la tendencia de la roya fue descendente a partir del primer momento de muestreo. No así para el tratamiento testigo, el cual presentó una tendencia ascendente, aunque los valores de incidencia no fueron los mayores (Figura 9).

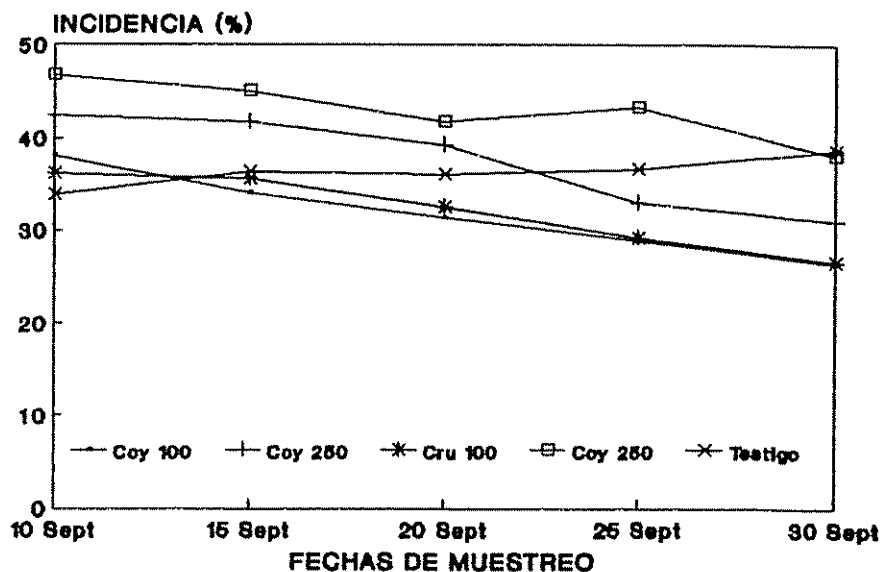


Figura 9. Incidencia de la roya del cafeto sometida a la actividad hiperparasítica de *Verticillium* sp, en condiciones de invernadero.

Durante el experimento los menores valores de incidencia se observaron en ambos aislamientos en la concentración  $10^8$  esporas/ml. En cambio el aislamiento procedente de El Coyolar en la concentración  $2.5 \times 10^8$ , presenta la mayor incidencia de la enfermedad. La incidencia de la enfermedad varió entre 34 y 47 % al inicio del muestreo, llegando a alcanzar valores entre 27 y 38 % al final del muestreo.

Al analizar area debajo de la curva para la incidencia de *Verticillium* sp, se encontró que los dos aislamientos difieren significativamente ( $P=0.03$ ), además todos los tratamientos difieren significativamente del testigo ( $P=0.0001$ ). Sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones dentro de cada aislamiento ( Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados de análisis de varianza para el parámetro area debajo de la curva de incidencia de *Verticillium* sp.

| F.V              | GL | S.S    | C. M   | Valor F | Valor P |
|------------------|----|--------|--------|---------|---------|
| CY vs CR         | 1  | 32.85  | 32.85  | 4.79    | 0.003   |
| CY,CR vs Testigo | 1  | 336.83 | 336.83 | 49.14   | 0.0001  |
| CY100 vs CY250   | 1  | 21.53  | 21.53  | 3.14    | 0.08    |
| CR100 vs Cr250   | 1  | 1.74   | 1.74   | 0.25    | 0.61    |
| Error            | 45 | 308.45 | 6.85   |         |         |
| Total            | 49 | 701.4  |        |         |         |

$R^2 = 0.56$

C.V. = 50

En el Cuadro 6 se presentan los valores promedios de area debajo de la curva de incidencia de *Verticillium* sp para cada tratamiento, observándose que ambas concentraciones del

aislamiento procedente de El Coyolar, acumulan los mayores valores.

Cuadro 6. Valores promedio para el parámetro área debajo de la curva de *Verticillium* para los diferentes tratamientos.

| Tratamientos | Promedios | Desviación estándar |
|--------------|-----------|---------------------|
| CY100        | 6.75      | 2.68                |
| CY250        | 5.06      | 2.85                |
| CR100        | 4.92      | 2.67                |
| CR250        | 3.66      | 1.5                 |
| TESTIGO      | 0.02      | 0.06                |

Cuando se analiza incidencia de roya como NHRV/NHR, encontramos que el nivel de hiperparasitismo observado para los aislamientos y concentraciones de *Verticillium* sp es alto. Durante los primeros 10 días se observa el incremento de la incidencia, hasta alcanzar valores desde 50 % hasta 80 % durante el tercer muestreo. Después de éste periodo la incidencia del hongo tiende a decaer.

El comportamiento del hiperparasitismo para los diferentes tratamientos, se muestra en la Figura 10, donde además se puede observar que la incidencia de *Verticillium* sp es despreciable en el tratamiento testigo.



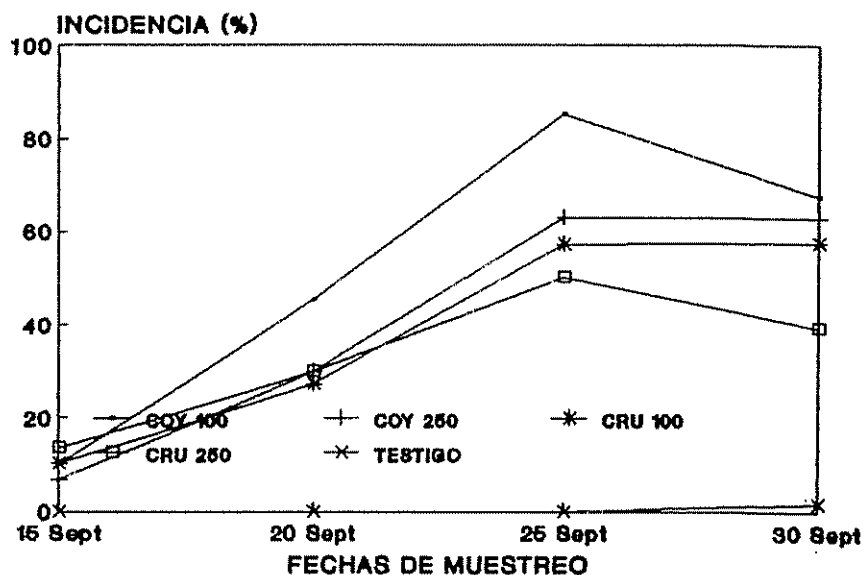


Figura 10. Incidencia de *Verticillium* sp sobre pústulas de roya del cafeto en condiciones de invernadero.

En el Cuadro 7 se presentan los números promedios de pústulas por planta, lo mismo que el número promedio de pústulas hiperparasitadas. Se observa que los mayores números de pústulas hiperparasitadas, aparecen a los 15 y 20 días después de la aplicación de *Verticillium*. En general el número promedio de pústulas es bajo, sobre todo al final del estudio, lo cual se debe a que las hojas más afectadas por la roya tienden a caer de la planta. Por otro lado, la incidencia de *Verticillium* que aparece al final del muestreo, se debe probablemente a contaminación de los demás tratamientos, y no a efecto del ambiente.

Cuadro 7. Número promedios/planta de pústulas de roya y pústulas hiperparasitadas para los diferentes tratamientos.

| Trat  | Fechas de muestreo. |     |        |     |        |     |        |     |        |     |
|-------|---------------------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|
|       | 10 Sep              |     | 15 Sep |     | 20 Sep |     | 25 Sep |     | 30 Sep |     |
|       | NP                  | NPV | NP     | NPV | NP     | NPV | NP     | NPV | NP     | NPV |
| CY100 | 19                  | 0   | 21     | 1   | 21     | 6   | 13     | 7   | 12     | 8   |
| CY250 | 34                  | 0   | 28     | 1   | 22     | 3   | 16     | 6   | 13     | 7   |
| CR100 | 25                  | 0   | 24     | 1   | 20     | 3   | 15     | 8   | 12     | 7   |
| CR250 | 23                  | 0   | 20     | 2   | 18     | 3   | 16     | 6   | 14     | 4   |
| TEST  | 11                  | 0   | 12     | 0   | 11     | 0   | 11     | 0   | 11     | 0.1 |

NP = Número promedio de pústulas.

NPV= Número promedio de pústulas hiperparasitadas.

Cuando se calcula incidencia de *Verticillium* como NPV/NP, los mayores valores siempre se observan para el aislamiento de El Coyolar, en la concentración  $10^5$  esporas/ml. Entre los tratamientos, el aislamiento procedente de El Crucero a concentración de  $2.5 \times 10^5$  presenta los menores valores de area debajo de la curva de progreso, además la incidencia para éste tratamiento, comienza a decaer a partir del tercer muestreo. Para todos los tratamientos, la tendencia siempre es ascendente (Figura 11), contrario cuando analizamos incidencia como NHRV/NHR, donde la incidencia tiende a decaer para todos los tratamientos a partir del tercer muestreo.

Este comportamiento puede deberse a que el número de pústulas con *Verticillium* en las hojas hiperparasitadas aumenta, en cambio el número total de pústulas disminuye en la medida que las hojas mas afectadas con roya caen de la planta.

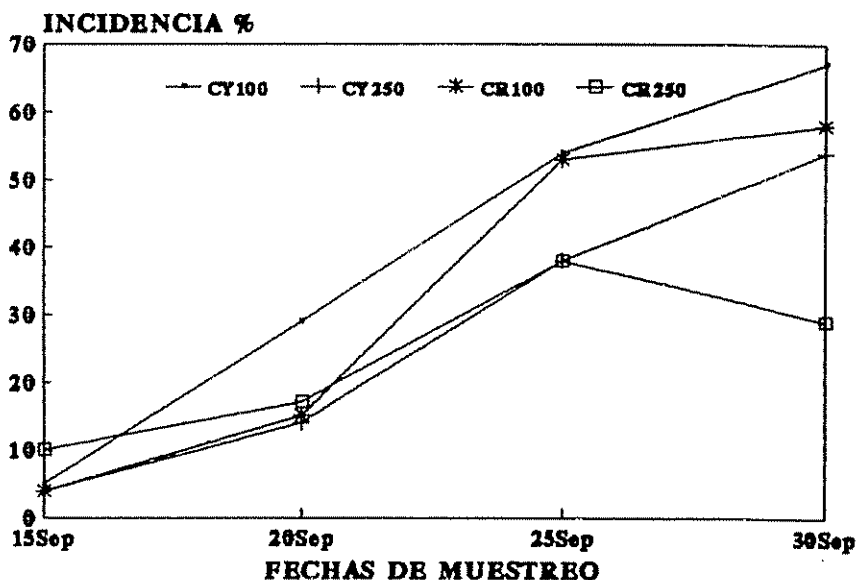


Figura 11. Incidencia de *Verticillium* sp sobre roya , a nivel de pústula en condiciones de invernafero.

Los altos valores de incidencia observados tanto a nivel de hoja como en pústula reflejan la eficiencia del hiperparásito para establecerse sobre las pústulas de roya. Esta capacidad de *Verticillium* para hiperparasitar las pústulas es una propiedad importante, dado que el efecto de *Verticillium* sp sobre la enfermedad se basa principalmente en la reducción del inóculo para los ciclos epidemiológicos subsiguientes.

El análisis de varianza, arrojó similares resultados, cuando se analiza incidencia a nivel de planta, como a nivel de pústulas. Esto indica que aunque los valores de incidencia

para pústula son un poco más bajos que los valores de incidencia para hojas, el comportamiento es similar.

El hecho de encontrar diferencias entre los tratamientos cuando se analiza el parámetro area debajo de la curva y no cuando se analiza incidencia para la misma variable indica que el parámetro area debajo de la curva es un mejor indicador del desarrollo de la epidemia de la enfermedad, lo mismo que del desarrollo del hiperparasitismo de *Verticillium* sobre la roya.

Shaner y Finney 1977, Hernández 1984, 1986, citados por Hernández y Montoya (1987), plantean que además de la tasa de infección, el area debajo de la curva de progreso de la enfermedad es un parámetro generalmente usado en epidemiología comparativa.

A éste respecto Hernández y Montoya (1987), evaluando el desarrollo de la epidemia de la roya del cafeto en diferentes altitudes, plantean que la tasa de infección es un parámetro comunmente usado por los investigadores en el análisis cuantitativo de epidemias, sin embargo encuentra limitaciones cuando la cantidad de inóculo inicial difiere significativamente entre tratamientos. En tal caso se procede a calcular el parámetro area debajo de la curva de progreso de la enfermedad.

Cuando no se pueden aplicar ninguno de los modelos de crecimiento, debido a fluctuaciones de la enfermedad en el tiempo, o a la irregularidad del gráfico de la enfermedad en el tiempo; para fines analíticos o comparativos, se usa el

area debajo de la curva como un descriptor de la epidemia (Shanner y Finney, 1977, citados por Campbell, 1990).

#### 5.4. Efecto de *Verticillium* sp sobre la germinación de uredosporas de *H. vastatrix*.

La comparación de medias para el porcentaje de germinación de uredosporas realizada a través de la prueba t de student, demuestra que el porcentaje de germinación es significativamente menor ( $\text{prob} > t = 0.0001$ ) cuando se aplica *Verticillium* sp sobre las uredosporas de la roya (Figura 12).

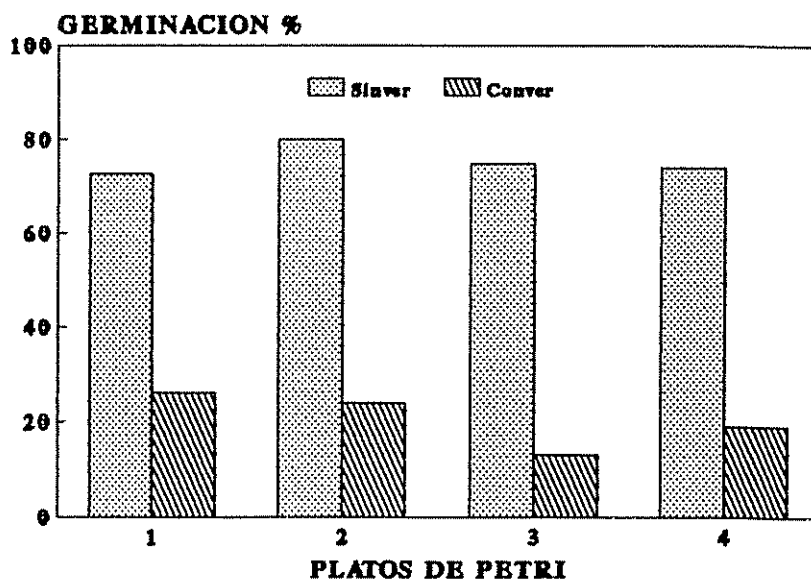


Figura 12. Efecto de *Verticillium* sp sobre la germinación de uredosporas de *H. vastatrix*.

El porcentaje promedio de germinación fue de 15 % cuando se aplicó *Verticillium* sp y 75 % cuando no se aplicó. De ésta

manera podemos afirmar que *Verticillium* sp ejerce efecto de inhibición sobre la germinación de uredosporas de roya.

A éste respecto otros autores han evaluado el efecto de *Verticillium* sp sobre la germinación de uredosporas de *H. vastatrix*. Leguizamón y Vélez (1988), observaron que crecimiento micelial de 15 días del hiperparásito de la roya del cafeto (*Verticillium lecanii*) en cultivo líquido de papa-dextrosa, centrifugado y filtrado a través de una membrana estéril, afecta la germinación de uredosporas de *H. vastatrix*, sus periodos de incubación y latencia y la tasa de infección.

Eskes et al.,(1987) observaron que filtrados de maceración del micelio y esporas de *V. lecanii* y *V. leptobactrum* inhibieron parcialmente la germinación de las uredosporas de *H. vastatrix*.

Una especie de *Verticillium* inhibió el crecimiento de esporas de *H. vastatrix*, por medio de secreciones extracelulares en medio de agua. Esporas de *H. vastatrix* fueron suspendidas en agua destilada e incubadas con un inóculo de *Verticillium* sp. El hiperparásito se desarrolló muy bien sobre las esporas de la roya durante los dos primeros días, después de dos semanas se encontraron muy pocas esporas de *H. vastatrix* capaces de observar al colorante azul de lactofenol. En algunos casos parece que las paredes de las uredosporas no fueron afectadas (Leal y Villanueva, 1962).

Lim y Nik (1983), reportan que el micoparásito *V. psalliotae* se desarrolló bien entre las rugosidades de la superficie de las uredosporas de roya, y que además éste creció dentro de las uredosporas vivas de roya, y que las esporas infectadas eventualmente perdieron su citoplasma, exceptuando cuerpos grasos, y se volvieron no viables. Además se observó que no hubo penetración de tubos germinales de *H. vastatrix* o de micelio.

Vélez((1989), observó que crecimiento micelial de *V. lecanii* cultivado en medio de Papa-Dextrosa-Agar afectan la lesión y la germinación de uredosporas de *H. vastatrix*.

Como se ha observado de acuerdo con éstos resultados la actividad de *Verticillium* sp sobre la roya del cafeto radica en su efecto como inhibidor de la germinación de las uredosporas de roya, y en el poder que tiene éste de hiperparasitar pústulas de roya.

Es importante señalar que la actividad hiperparasítica de *Verticillium* sp sobre la roya del cafeto, resulta en una reducción de inóculo para los ciclos posteriores. Es decir que una alta incidencia de *Verticillium* sp en un ciclo causa una menor disponibilidad de inóculo de roya para el ciclo subsiguiente. Esto sucede debido a la capacidad que tiene *Verticillium* sp de inhibir la germinación de las esporas de la roya, y afectar su viabilidad al causar la ruptura y pérdida del citoplasma de las esporas.

Para establecer un programa de manejo de la roya del café que considere el uso de *Verticillium* sp como agente de control, se debe tener conocimiento de la epidemiología de la roya para hacer coincidir el inicio del ciclo de la enfermedad con la potenciación o aplicación del hiperparásito. Además se debe conocer que el hiperparásito no actúa inmediatamente (como los fungicidas), sino que la efectividad de éste solo puede ser observada algún tiempo después de su utilización.



## 6. CONCLUSIONES.

De las tres zonas evaluadas, La mayor incidencia natural de *Verticillium* sp ocurrió en El Crucero, y la menor en la zona de Carazo.

La mayor y menor incidencia natural de *Verticillium* sp sobre la roya del cafeto se encontró en la zona del Pacífico Sur, en la finca El Jardín 1, y en la finca El Asilo, respectivamente.

El grado de incidencia de *Verticillium* sp sobre la roya del cafeto, en las diferentes zonas estudiadas, no dependió de la incidencia de la roya, ya que con diferentes niveles de incidencia de ésta, la incidencia de *Verticillium* sp fue similar y nunca mayor del 14 %.

El hiperparásito *Verticillium* sp no influye sobre los procesos infectivos de la roya, cuando es aplicado 72 horas después de la inoculación del patógeno, en condiciones de invernadero.

En ausencia de pústulas de roya, la supervivencia de *Verticillium* sp es baja, y se observa en especial en las concentraciones más altas, las cuales tienen más posibilidad de supervivencia.

Se observa un efectivo hiperparasitismo, cuando *Verticillium* sp es aplicado en condiciones de invernadero sobre pústulas de roya. En algunos casos la incidencia alcanzó hasta 80 %.

*Verticillium* sp inhibió en un 80 % la germinación de uredosporas de roya en condiciones de laboratorio.

*Verticillium* sp es un hongo con propiedades hiperparasíticas, que puede ser obtenido en el campo y manipulado para ser producido artificialmente.

## 7. RECOMENDACIONES.

- Realizar muestreos para evaluar la incidencia natural de *Verticillium* sp sobre *H. vastatrix* en períodos más prolongados, de manera que se pueda estudiar la incidencia de ambos hongos desde su inicio, así como en ciclos consecutivos.
- Evaluar la incidencia de *Verticillium* sp sobre *H. vastatrix* bajo condiciones microclimáticas controladas, de manera que se pueda identificar cuales de éstos factores son los que determinan la incidencia del hiperparásito.
- Obtener aislamientos de *Verticillium* sp procedentes de diferentes zonas para seleccionar aquellos de mejor comportamiento para ser evaluadas a nivel de campo.
- Evaluar diferentes concentraciones de *Verticillium* sp para seleccionar aquellos de mejor comportamiento como colonizadores del filoplano y como hiperparásitos.

La búsqueda de cepas de *Verticillium* sp con alto valor como agente de control de la roya del cafeto, debe basarse en las buenas propiedades del hiperparásito para colonizar el filoplano, así como su alta capacidad hiperparasítica.

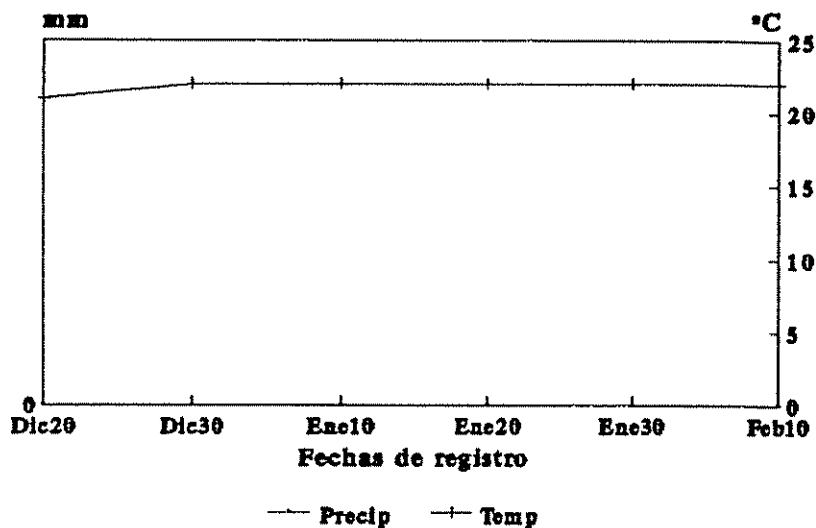
## 8. BIBLIOGRAFIA.

- ALVAREZ, I. C. y SIERRA, C. A. 1989. Metodología para la evaluación del efecto de fungicidas sobre la reproducción de *Hemileia vastatrix*. Cenicafé, Vol. 40 Nº 1, 1989.
- BAKER, K. F. and R. J. COOK. 1983. The Nature and practice of Biological Control of Plant Pathogens. The American Phytopathological Society. U.S.A. 539 p.
- BECKER-RATERINK, S. 1991. El Sistema *Coffea* spp y *Hemileia vastatrix*. IN La Roya del Cafeto Conocimiento y Control. 1991. GTZ Cooperación Técnica-República Federal de Alemania. Eschborn 1991. 281 p.
- CAMPBELL, L. C. and L. V. MADDEN. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley & Sons, Inc. USA. 532 p.
- CARRION, G. 1988. Estudios sobre Control Biológico de la roya del cafeto por *Verticillium lecanii* en México. Micología Neotropical Aplicada. (1988) 1:79-86.
- CENTRO DE INVESTIGACAO DAS FERRUGENS DO CAFFEIRO- CIFIC. OEIRAS. 1965. Progress report, 1960-1965. OEIRAS PORTUGAL. 144 p.
- ESKES, A.B., M.D.L. Mendes., C.F. Robbs GAMS, W. (EMBRAPA/CNPDA, CEP 13820-Jaguariuna, SP). 1987. Studies on the hiperparasitism of *Hemileia vastatrix* by *Verticillium* spp. In Congreso Paulista de Fitopatología, 10 Piracicaba S.P. febrero 1987. Resúmenes Piracicaba, Grupo Paulista de Fitopatología.
- FONDO NAC. DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS; Estación Experimental Tachira. 1988. Paquete Tecnológico para la producción de café. Maracay , Ven. 192 p.(Serie Paquetes Tecnológicos Nº 6).
- FORRER, H.R. 1979. Possibilities of the utilization of hiperparasites and application of natural compounds for the control of rusts. IN Lucha contra la roya del cafe. Informe sobre un seminario de estudios en Paipa, Colombia. 1979. German Agency for Technical Cooperation (GTZ) Eschborn, Federal Republic of Germany. p.63-70.
- GARCIA, A. , I. G., LEAL, J. A., VILLANUEVA, J. R. 1965. Lisis de tubos germinativos de uredosporas de roya por especies de *Verticillium*. Phytopathology, Estados Unidos, 55(1):40-42.

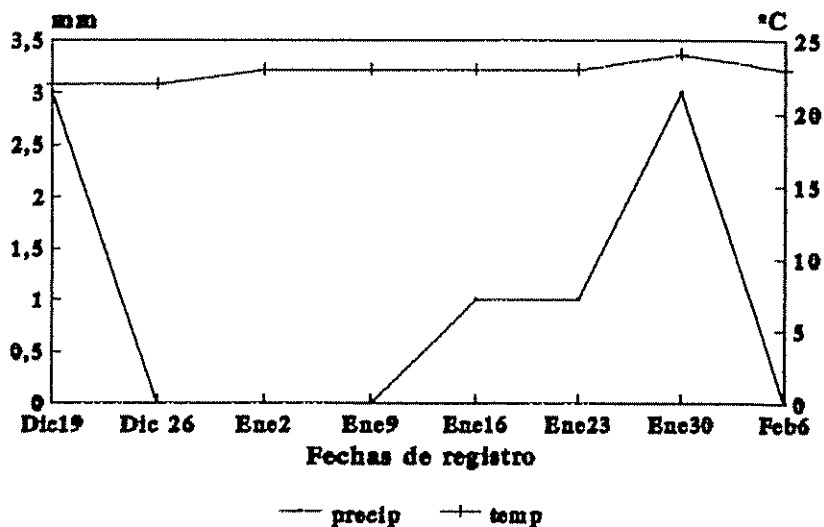
- HALL, R. A. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against Aphids and Scales. In Microbial Control of Pests and Plant Diseases. Edited by H. D. Burguer. Academic Press Inc. (London) LTD. p 483-498..
- INSTITUTO MEXICANO DEL CAFE (1970) El cultivo del cafeto en Mexico. 1ª Edición. Alfredo Saenz C. (editor). Editorial La Fuente, s.a Mexico, D.F 248 p.
- INSTITUTO NICARAGUENSE DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA (INTA). 1977. La Roya del cafeto y su combate en Nicaragua. INTA- Misión Técnica Alemana y Laboratorio de Fitopatología. 94 p.
- KUSHALAPPA, A. C. 1989. Advances in Coffee Rust Research. Annual Review of Phytopathology 1989. 27: 503-531.
- LEAL, J. A., GARCIA, A., I.G., VILLANUEVA, J.R. 1963 Actividad proteolítica de filtrados de medios de cultivos de especies no patogénicas de *Verticillium*. Nature, Inglaterra, 200(4903):290-291.
- LEAL, J. A., VILLANUEVA, J. R. 1962. Ausencia de producción de enzimas pécticas por especies no patogénicas de *Verticillium*. Nature, Inglaterra. 195(4848):1328-1329.
- LEAL, J. A., VILLANUEVA, J. R. 1962. Actividad fungilítica de especies de *Verticillium*. Science. Estados Unidos, 136(5317):715-716.
- LEGUIZAMON, C., J. E.; VELEZ A., P. E. (Cenicafe, Chinchiná, Caldas, Colombia). 1988. Efecto de extractos de *Verticillium lecanii* sobre la roya del cafeto *Hemileia vastatrix* Berk y Br. In Congreso ASCOLFI, 9 Pasto, Colombia, Junio 22-24. 1988. Resúmenes p. 68 esp.
- LIM, T. K. y NIK, W. Z. 1983. Mycoparasitism of the coffee rust pathogen (*Hemileia vastatrix*, by *Verticillium psalliotae* in Malaysia. Pertanika, Malasia. 6(2):23-25.
- LOCCI, R., MINERVI, F. C, RODRIGUEZ, G. J. 1971. Estudios de la asociación *Hemileia vastatrix-Verticillium hemileiae*, mediante microscopía electrónica y de transmisión. Revista de Patología Vegetale, Italia, 7(2):127-140.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERIA Y ALIMENTACION. 1983. Manual para el control químico de la roya del cafeto. 68 p.
- SHAW, D. E. 1988. *Verticillium lecanii*: un hiperparásito del patógeno de la roya del cafeto en Papúa Nueva Guinea. Australasian Plant Pathology (Australia) 17 (1) p. 23.

- SILVEIRA, H. L., RODRIGUEZ junior, C.J. 1971. Ruptura de uredosporas de roya causada por *Verticillium hemileiae*. Bour filtrados de cultivos. Agronomía Lusitana, Portugal. 33(1-4):391-396.
- THURSTON, H. D. 1989. Enfermedades de cultivos en el trópico. Trad. por J.J. Galindo. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, C. R. 232 p.
- TITO, H.T. y R. MONTOYA. 1987. Epidemiología Cuantitativa y Su Aplicación al Análisis de Algunas Enfermedades de Cultivos Tropicales. Escuela de sanidad vegetal, IICA. Lima, Perú.
- VELEZ, P. E. 1988. Estudio macro y microscópico del efecto de *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas sobre *Hemileia vastatrix* Berk y Br., agente causal de la roya del cafeto. IN X congreso ASCOLFI; V Reunión ALF; XXIX Reunión Anual APS-CD. Cali (Colombia) 10-14 Jul. 1989.
- VON CHONG, K. y A. BONILLA 1990. Parámetros para el muestreo y control químico de la roya del café. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. Ministerio de Desarrollo Agropecuario. 15 p.
- WORLD BANK, INTERNATIONAL TRADE DIVISION. 1992. Nicaragua: Coffee Subsector Study. Main Report. Julio, 1992. 74 p.

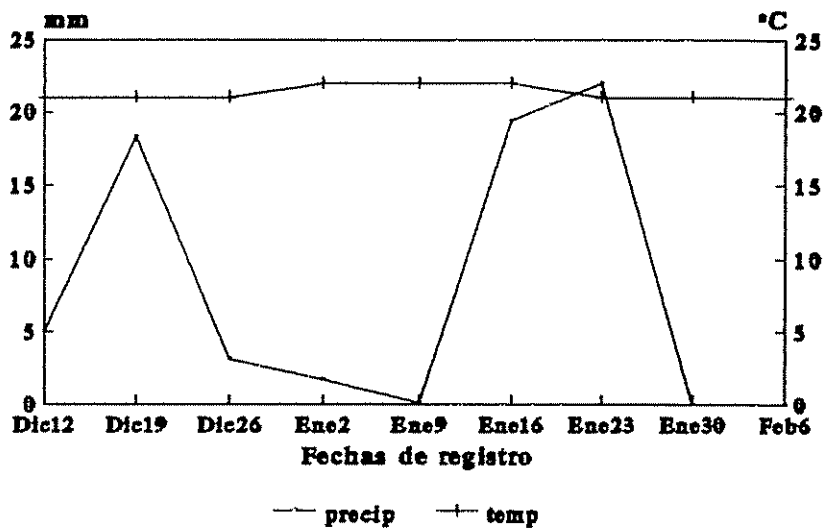
## 9. ANEXOS.



Anexo 1 Comportamiento de temperatura y precipitación acumulada semanal, para la zona de El Crucero, durante el estudio.



Anexo 2. Comportamiento de temperaturas y precipitación acumulada semanal, en la zona de Carazo, durante el periodo del estudio.



Anexo 3. Comportamiento de la temperatura y precipitación acumulada semanal, en la zona de Matagalpa, durante el periodo del estudio.