

Reproducción masiva de *Verticillium* sp., hiperparásito de la roya del café, *Hemileia vastatrix*¹

Evelyn M. Canjura-Saravia²

Vera Sánchez-Garita³

Ulrike Krauss³

Eduardo Somarriba⁴

RESUMEN. El objetivo de esta investigación fue desarrollar un método eficiente y práctico para la reproducción masiva de cepas de *Verticillium* sp. con alto potencial como hiperparásitos de *Hemileia vastatrix* y probar la acción hiperparasítica de las cepas en plantas que crecen en macetas en ambiente natural. Se empleó un sustrato a base de melaza y levadura para la reproducción, donde se varió la cantidad de melaza (120, 80, 40 y 8 g/l), con y sin adición de uredosporas de roya en el medio. Para tres cepas de *Verticillium* sp., se alcanzaron concentraciones entre 2.3×10^6 y 5.5×10^9 conidias/ml. La mejor cantidad de melaza fue de 8 g de melaza/l en ausencia de uredosporas de roya, porque concentraciones más altas no mejoraron la reproducción. No se pudo establecer qué combinación de ingredientes sería la ideal para la reproducción masiva de la cuarta cepa, debido a su lenta reproducción.

En las macetas se evaluó la capacidad hiperparasítica de las cuatro cepas, para lo cual se realizaron tres asperciones de cinco combinaciones de dichas cepas en plantas de café afectadas por roya. A pesar de que estadísticamente fue posible determinar la mejor combinación de cepas, en términos reales no se pudo establecer cuál fue la mejor, porque la incidencia de *Verticillium* sp. se generalizó en todo el ensayo, inclusive en el testigo.

Palabras clave: Control biológico, curvas de crecimiento, fermentación, fermentadores artesanales, *Hemileia vastatrix*, hiperparasitismo, melaza, reproducción masiva, roya del café, *Verticillium* sp.

ABSTRACT. The objective of this investigation was to develop an efficient and practical method for the massive production of strains of *Verticillium* sp. with high potential as hyperparasites of *Hemileia vastatrix* and to prove the hyperparasitic action of the strains in the field. The media for the production contained molasses, yeast and distilled water, with different quantities of molasses (120, 80, 40 and 8 g/l), with and without addition of rust uredospores in the media. For three *Verticillium* strains, final spore concentrations of 2.3×10^6 y 5.5×10^9 conidia/ml were reached. The best combination of ingredients was 8 g of melaza/l in the absence of rust uredospores because higher concentrations did not improve production. It could not be determined what combination of ingredients it would be the ideal for the massive production of the fourth strain due to its slow reproduction.

The hyperparasitic capacity of the four strains was evaluated. Three applications of five mixtures of strains in coffee plants affected by rust were administered. Although statistically it was possible to determine the best mixture of strains, in real terms, the best could not be determined because the incidence of *Verticillium* sp. equilibrated across treatments, including the control.

Key words: Biological control, coffee rust, cottage industry fermentors, fermentation, growth curves, *Hemileia vastatrix*, hyperparasitism, massive production, molasses, *Verticillium* sp.

¹ Parte de la tesis de Maestría del primer autor, CATIE, Programa de Posgrado, Turrialba, Costa Rica.

² Universidad Centroamericana José Simeón Cañas, San Salvador, El Salvador. ecanjura@telesal.net. Tel: (503) 229-3827.

³ CATIE, Área de Agricultura Ecológica, 7170, Turrialba, Costa Rica.

⁴ CATIE, Área de Agroforestería, 7170, Turrialba, Costa Rica.

Introducción

El cultivo del café es uno de los más importantes en el mercado internacional y representa para los países centroamericanos una fuente importante de divisas y trabajo (Jiménez 1997, Castellón 1999). La roya del café (*Hemileia vastatrix* Berkeley y Broom) es una de las enfermedades que causa mayores pérdidas en el rendimiento de este cultivo. Para su control, se han considerado una serie de estrategias, como el control químico, la resistencia genética, el control biológico, el control cultural y el manejo integrado. El control químico ha sido eficaz para el manejo de la roya; sin embargo, la contaminación del ambiente, así como el alto costo de las aplicaciones y el riesgo de desarrollo de resistencia, han provocado que esta estrategia no se considere como la solución ideal al problema (Javed 1987, López *et al.* 1990, Becker 1991).

El hongo *Verticillium* sp. es uno de los hiperparásitos más comunes de la roya del café, se presenta en los cafetales en forma natural y podría ser un buen candidato para el control biológico de la roya. Sin embargo, no se ha logrado una reproducción masiva que permita obtener estructuras de reproducción en corto tiempo y a bajo costo (Leguizamón *et al.* 1989, Monzón 1992, Rivas *et al.* 1996).

El presente estudio tuvo como objetivo principal desarrollar un método eficiente, práctico y barato para la reproducción masiva de cepas de *Verticillium* sp. Otros objetivos fueron cuantificar la producción de diferentes tipos de esporas, como conidias y clamidosporas de *Verticillium* sp., en un fermentador artesanal; evaluar diferentes concentraciones de melaza y el efecto de uredosporas de roya en un fermentador artesanal para obtener mayor concentración de estructuras de reproducción de *Verticillium* sp. en el menor tiempo posible; y evaluar la capacidad hiperparasítica de cuatro cepas de *Verticillium* sp. sobre el patógeno.

Materiales y métodos

El estudio se llevó a cabo en el invernadero, el campo y el Laboratorio de Fitopatología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), localizado en Turrialba, Provincia de Cartago, Costa Rica, situado a 640 msnm, 9°55'21" N y 83°39'40" W. La temperatura promedio anual es de 21.7°C; la precipitación de 2,479 mm y la humedad relativa 87%. Las condiciones micrometeorológicas dentro del ensayo en macetas, se midieron con un hidrotérmografo, para temperatura y humedad relativa; y con un densíome-

tro, para la sombra. Los datos fueron de 23.8 °C, 80.4 % y 81.8 %, respectivamente.

Evaluación de la producción de conidias y clamidosporas de *V. lecanii* en un fermentador artesanal

Se evaluó en un fermentador artesanal la reproducción masiva de cuatro cepas de *Verticillium* sp. (CATIE, Guayabo, Pejibaye y Tuis), en un sustrato a base de 80 g de melaza y 5 g de levadura en un litro de agua destilada, con crecimientos de una, dos y tres semanas. El mejor resultado obtenido en esta prueba (concentraciones entre 7.25×10^6 y 1.42×10^8 conidias/ml al cabo de 15 días) se usó para evaluar el crecimiento de cuatro cepas, utilizando como sustrato igual cantidad de levadura (5 g) (marca Fleischman, Costa Rica), cuatro concentraciones de melaza de caña proveniente del Ingenio Atirro, ubicado en Turrialba (120, 80, 40 y 8 g/l). Así mismo, se evaluó el efecto de uredosporas de roya (1×10^4 uredosporas/ml) sobre la producción de conidias, durante un período de 10 días.

El experimento tuvo un Diseño Completamente al Azar, con tratamientos en arreglo factorial (4 x 4 x 2), con el resultado de 32 combinaciones con una repetición. Las variables de respuesta fueron la concentración de conidias y clamidosporas de *Verticillium* sp. Mediante el programa Sigma Plot, con los datos obtenidos se construyeron 32 curvas de crecimiento con tendencia sigmoideal del tipo Gompertz de cuatro parámetros. La ecuación que describe la curva es: $Y = A + C \cdot \exp(-\exp(-B \cdot (X - M)))$ y los parámetros evaluados fueron: nivel final de conidias (C), tiempo (días) del punto de inflexión (M) y una medida de la pendiente en el punto de inflexión (B). El nivel inicial de conidias fue en promedio entre 10^3 y 10^4 conidias/ml, pero se consideró como cero ($A=0$) debido a que una concentración menor de 1×10^4 conidias/ml no se detecta con el hematocímetro. Los parámetros se compararon mediante el análisis de varianza y de esa manera se evaluó el efecto de cada uno de los tratamientos. Luego, se realizó la prueba de Tukey para separar las diferencias de medias de los parámetros de las curvas. El parámetro C se transformó por $y' = \log(y)$ para obtener una distribución normal.

Evaluación de la capacidad hiperparasítica de cuatro cepas de *Verticillium* sp. sobre pústulas de *H. vastatrix*

Se expusieron plantas de café sanas de la variedad Caturra sembradas en macetas, de 14 meses de edad, al

inóculo natural de roya presente en una plantación de café orgánico del CATIE; las plantas permanecieron desde el mes de diciembre de 1999, hasta el mes de Julio del 2000. Cuando se observaron las primeras lesiones de roya, se hicieron 3 aspersiones (una cada 15 días) de cinco mezclas de cepas de *Verticillium* sp. (Mezcla 1: cepas de Tuis, CATIE y Pejibaye; Mezcla 2: cepas de Tuis, CATIE y Guayabo; Mezcla 3: cepas de Tuis, Pejibaye y Guayabo; Mezcla 4: cepas de CATIE, Pejibaye y Guayabo; Mezcla 5: aplicación de las cuatro cepas). La mezcla de cepas se realizó con la finalidad de determinar cuál o cuáles combinaciones de cepas realizaron la mejor acción hiperparasítica y, además, identificar cuál cepa, de entre las que conformaron las mejores mezclas, fue la que influyó en dicha acción.

El hiperparásito se aplicó a una concentración total de 1×10^6 conidias/ml con iguales proporciones de cada cepa. Se usaron cinco plantas por tratamiento, incluyendo el testigo absoluto. En cada planta se seleccionaron cinco hojas al azar que presentaban por lo menos una lesión clorótica pequeña (estado inicial de la roya) para evaluar la incidencia del hiperparásito.

Se empleó un Diseño de Bloques al Azar con cinco repeticiones por cada tratamiento, con parcelas subdivididas en el tiempo. Las variables de respuesta fueron: número de hojas con roya (NHR), número de hojas con roya y *Verticillium* sp. (NOV), número de pústulas (NP), y número de pústulas hiperparasitadas (NPV) en el total de hojas seleccionadas. Se calculó la incidencia de *Verticillium* sp. en hojas con pústulas (NHRV/NR) y la incidencia en pústulas (NPV/NP) (Monzón 1992). A los datos obtenidos se les hizo análisis de varianza para determinar si hubo diferencias significativas entre tratamientos, y la prueba de Tukey para separar las medias de los tratamientos evaluados.

Resultados y discusión

Cantidad de inóculo inicial de *Verticillium* sp. para usar el fermentador

Las mayores concentraciones de conidias/ml obtenidas en el fermentador se lograron cuando se utilizaron crecimientos de dos y tres semanas. Las concentraciones fueron 1×10^6 conidias/ml (cepa de Pejibaye), 1×10^7 conidias/ml (cepas de CATIE y Guayabo) y 1×10^8 co-

nidias/ml (cepa de Tuis). Se eligió el crecimiento de dos semanas para las siguientes pruebas.

Reproducción masiva de cuatro cepas de *Verticillium* sp. en diferentes concentraciones de melaza y en presencia de uredosporas de roya en el fermentador

Con base en estudios realizados con *Trichoderma* spp., donde se reprodujo en forma masiva clamidosporas y conidias en un medio a base de melaza (Lewis y Papavizas 1983, Hebbar y Lumsden 1999), se planteó en la metodología la evaluación de clamidosporas; sin embargo, a lo largo del proceso, ninguna de las cepas las produjo, por lo que el análisis se basó únicamente en la evaluación de la concentración de conidias.

El comportamiento de los parámetros de la curva Gompertz para medir el efecto de la melaza y las uredosporas de roya en cada una de las cepas estudiadas dio los resultados siguientes.

Nivel final de conidias

Hubo diferencia significativa entre las distintas cepas evaluadas ($P=0.0029$) y entre las dosis de melaza ($P=0.0277$). Las interacciones entre las cepas y las diferentes dosis de melaza ($P=0.0077$), así como también la interacción de las cepas con uredosporas de roya ($P=0.0381$) fueron significativas; mientras que la interacción de los tres factores (cepa, melaza y uredosporas) resultó no significativa ($P=0.061$). Al final del periodo de evaluación, las cepas en estudio presentaron una concentración de conidias/ml distinta. Esta diferencia pudo deberse al efecto de la melaza o a la presencia o ausencia de uredosporas de roya en el sustrato o a características genéticas propias de cada una de las cepas. Por esta razón, se analizó de forma general de ese factor, y luego se analizaron los factores melaza y uredosporas de roya independientemente para cada una de las cepas.

Por medio de la separación de medias, mediante la prueba de Tukey, se observó que las cepas de Guayabo y Pejibaye fueron significativamente diferentes, siendo la primera la que reflejó el mayor nivel final de conidias (5.45×10^9 conidias/ml) y la última el valor más bajo (2.27×10^6 conidias/ml) (Cuadro 1). Las concentraciones finales de conidias de las cepas de Tuis y CATIE se mantuvieron en niveles intermedios, presentando concentraciones de 1.06×10^9 conidias/ml y de 3.73×10^6 conidias/ml, respectivamente (Figura 1).

Cuadro 1. Separación de medias del nivel final de conidias/ml (C) mediante la prueba Tukey, con datos transformados (para C)(Media \bar{t}) para cuatro cepas de *Verticillium* sp.

CEPAS	Nivel final de conidias/ml		N
	Media	Media \bar{t}	
Guayabo	5.45x10 ⁹	16.14 a	16
Tuis	1.06x10 ⁹	15.18 ab	16
CATIE	3.73x10 ⁹	14.71 b	16
Pejibaye	2.27x10 ⁹	13.77 b	16

$\bar{t} = \log(Y)$

N = Número de observaciones.

= 0.05, datos con la misma letra no difieren significativamente.

Para las cepas de CATIE,Pejibaye y Tuis, tanto el efecto de la melaza como el de la presencia y ausencia de uredosporas de roya en la concentración final de conidias/ml (datos transformados, Log Y) no resultaron significativos ($0,365 < P < 0,517$). Del mismo modo, la interacción entre estos dos factores tampoco resultó significativa. Es decir, que con cualquier dosis de melaza que se empleó en este estudio en presencia o ausencia de uredosporas de roya, la producción de conidias de estas cepas no aumentó ni disminuyó. Sin embargo, para la cepa de Guayabo tanto la melaza como la presencia o ausencia de uredosporas fueron significativos ($P=0,0097$ y $P=0,0281$, respectivamente).

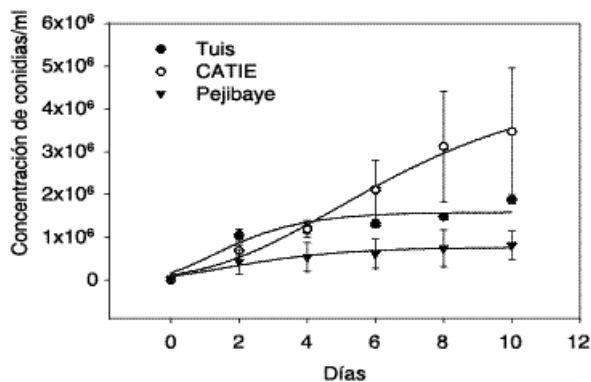


Figura 1. Promedio de la concentración de conidias/ml de las cepas CATIE, Pejibaye y Tuis obtenidas en fermentadores artesanales con 4 dosis (8, 40, 80 y 120 gm) de melaza/l en presencia y ausencia de uredosporas de roya, durante un período de 10 días.

La interacción de la concentración de melaza con la presencia o ausencia de uredosporas de roya fue significativa ($P=0.0042$). La separación de medias del nivel final de conidias reveló que la combinación dosis tres de melaza (40 g/l), en ausencia de uredosporas de roya, fue la única que difirió del resto de combinaciones y fue, a su vez, la que presentó el mayor nivel final estimado de conidias (4.32×10^{10} conidias/ml). Es-

ta diferencia se puede considerar muy importante, pues con ninguna otra combinación de factores se obtuvo una concentración tan alta. En este sentido, la adición de uredosporas para las otras combinaciones no incrementó la concentración de conidias, como se esperaba en este estudio (Da Silva y Feraz 1978).

Es importante anotar que la concentración de conidias/ml alcanzada por las cepas de Guayabo y Tuis no se había logrado obtener antes en medio líquido. Únicamente se había reportado un máximo de 10^5 conidias/ml en caldo Sabouraud dextrosa (Vélez y Rosillo 1995). Hebbbar y Lumsden (1999) lograron, en un fermentador artesanal, donde se empleó la misma cantidad de melaza de caña (80 g/l), aproximadamente de 10^6 a 10^7 clamidosporas/ml de *Trichoderma* spp., lo que coincide con lo obtenido con las cepas de *Verticillium* sp. en esta investigación para esa misma dosis.

Tiempo en días del punto de inflexión

El análisis de varianza del tiempo (días) del punto de inflexión, indicó que hubo diferencia significativa entre las cepas estudiadas ($P=0.0249$), en la interacción de las cepas con las dosis de melaza ($P=0.0178$), y la interacción de cepas con presencia o ausencia de uredosporas de roya ($P=0.0381$). También resultó significativa la interacción de los tres factores (cepa, dosis de melaza y presencia o ausencia de uredosporas de roya) ($P=0.0049$). La separación de medias del tiempo del punto de inflexión mediante la prueba de Tukey demostró que la cepa de Guayabo (19.4 días) difirió en forma muy acentuada de las cepas de Pejibaye (3.9 días) y CATIE (3.4 días), pues tardó más tiempo para llegar al punto de inflexión. La cepa de Tuis demoró 10.2 días para alcanzar el punto de inflexión, el cual representó un tiempo intermedio entre las demás cepas. No se observó diferencia entre las cepas de Pejibaye y CATIE, lo cual mostró que ambas requirieron un tiempo similar para llegar al punto de inflexión.

Las cepas de Guayabo y Tuis demoraron mucho más tiempo que el resto de las cepas en alcanzar el punto de inflexión en las curvas de crecimiento, pero esa demora se compensa con el alto nivel de conidias que se puede obtener con dichas cepas, de tal modo que se puede considerar su reproducción masiva para un posible control biológico de la roya (Cuadro 2).

Cuadro 2. Separación de medias del tiempo (días) del punto de inflexión (M) mediante la prueba Tukey para cuatro cepas de *Verticillium* sp.

CEPAS	Media del tiempo (días) del punto de inflexión	N
Guayabo	19.6 a	16
Tuis	10.2 ab	16
CATIE	3.4 b	16
Pejibaye	3.9 b	16

N = Número de observaciones.

= 0.05, datos con la misma letra no difieren significativamente.

Los análisis de varianza del tiempo del punto de inflexión para las cepas de CATIE, Pejibaye y Tuis indicaron que el factor melaza no fue significativo ($0,247 < P < 0,458$), como tampoco lo fue el factor uredosporas de roya ($0,250 < P < 0,973$). La interacción de la concentración de melaza con la presencia o ausencia de uredosporas tampoco fue significativa ($0,594 < P < 0,758$). Es decir, dichas cepas demoraron lo mismo para alcanzar el punto de inflexión tanto al emplear dosis de melaza altas como al utilizar dosis más bajas, con uredosporas de roya presentes o ausentes. El tiempo promedio para alcanzar dicho punto fue de 3,4 días.

En el caso de la cepa de Guayabo, el análisis de varianza del tiempo del punto de inflexión reveló que hubo diferencia significativa del factor melaza ($P=0.0328$), pero no fue así con el factor uredosporas de roya ($P=0.081$). Sin embargo, la interacción de los dos factores sí fue significativa ($P=0.0251$), lo cual indica que existió un comportamiento diferente de la cepa ante las distintas dosis de melaza, dependiendo de la presencia de uredosporas en el medio.

La separación de medias del tiempo del punto de inflexión (Tukey) para la interacción de las diferentes dosis de melaza, y la presencia y ausencia de uredosporas de roya, mostraron que al emplear 40 g/l de melaza sin adición de uredosporas de roya se estimó un tiempo de 118,3 días para alcanzar el punto de inflexión, el cual se encuentra muy lejos del intervalo de observación. Esto se puede explicar si se considera

que fueron pocas las replicaciones en el ensayo (únicamente dos) y demasiada la variación en los datos observados para esa combinación de factores, y los estimados de parámetros se encontraron fuera del periodo de observación de 18 días máximo.

Los demás puntos de inflexión no mostraron diferencias significativas a través del tiempo.

Medida de la pendiente en el punto de inflexión

El análisis de varianza del parámetro B, medida de la pendiente en el punto de inflexión, no mostró diferencias significativas entre las cepas estudiadas ($P=0,996$), ni interacción entre las mismas con las dosis de melaza ($P=0,685$), ni la presencia de uredosporas de roya ($P=0.645$). Por lo tanto, todas las cepas llegaron al punto de inflexión con una tasa de incremento similar, y este fenómeno se dio independientemente de las diferentes dosis de melaza empleadas, así como de la presencia o ausencia de uredosporas de roya.

En todos los parámetros, la mejor combinación para la reproducción de las cepas de CATIE, Pejibaye y Tuis resultó cuando la melaza fue mínima (8 g/l) sin presencia de uredosporas. La combinación de los factores descritos también resultó beneficiosa al utilizar menos material (menos melaza) para preparar el sustrato, lo cual evita tener que coleccionar la roya en el campo para adicionarla al medio; así, se reducen los costos.

Para el caso específico de la cepa de Guayabo, la mejor dosis de melaza para su reproducción fue la de 40 g/l, las dosis mayores o menores no permitieron un incremento en la producción de conidias/ml. La adición de uredosporas de roya tampoco permitió el incremento en la producción.

En forma general, se pudo notar que para todas las cepas la adición de uredosporas al medio no estimuló la mayor producción de conidias al final del período. Este resultado difiere de lo reportado por Da Silva y Ferraz (1978), quienes observaron mayor producción de conidias de *Verticillium hemileiae* al adicionar al medio de cultivo uredosporas de roya. Dicha adición tampoco aceleró el tiempo del punto de inflexión o la tasa de crecimiento en el presente estudio.

Evaluación del efecto hiperparasítico de cuatro cepas de *Verticillium* sp. sobre *H. vastatrix*

Desarrollo de la enfermedad

El desarrollo de la enfermedad presentó un comportamiento típico de las enfermedades de ciclo múltiple

(caso de la roya del café), en las que al inicio se observa un incremento lento, que luego se acelera con el consecuente aumento de lesiones nuevas. Finalmente, se presenta un descenso del incremento en la medida que el tejido de las hojas afectadas se va agotando (Castaño-Zapata 1994).

Entre los factores que favorecieron el incremento de la enfermedad se encuentran la temperatura y la densidad de sombra durante el período de evaluación. La temperatura óptima para la germinación de uredosporas oscila entre los 21 y 25°C, y la temperatura promedio durante el ensayo fue de 22-22.5°C, durante el mes de julio y agosto, respectivamente. La densidad de sombra reportada en el ensayo fue de 81,77% lo que también pudo favorecer el incremento de la enfermedad, pues la sombra es una condición propicia para su desarrollo (Cadena 1982).

Actividad hiperparasítica

Hojas con pústulas

Se observaron diferencias significativas en la presencia de hojas con pústulas entre los tratamientos ($P=0,0002$) y en los tratamientos frente a las evaluaciones ($P=0,0001$) (el número de pústulas fue en aumento a medida que transcurrió el tiempo). No obstante, a pesar de haber encontrado diferencias significativas en los tratamientos, no se pudo establecer si las combinaciones de cepas de *Verticillium* sp. empleadas en el experimento tuvieron efecto sobre la mayor presencia de hojas con pústulas, ya que hubo una serie de factores que afectaron la evaluación; por ejemplo, no se pudo garantizar que las plantas estuvieran completamente libres de *Verticillium* sp. después de exponerlas en la plantación de café orgánico de CATIE afectada por roya, en la fase inicial del experimento, antes del inicio de la evaluación. Esta plantación presentaba *Verticillium* sp. en forma natural, y a pesar de que se aseguró que las plantas utilizadas en el ensayo no tuvieran pústulas de roya con el micelio blanco característico del hiperparásito, antes de la aplicación de los tratamientos, algunas conidias pudieron quedar presentes sobre la superficie de las hojas, lo cual permitió su dispersión.

Por otro lado, las plantas evaluadas se colocaron a una distancia de 60 cm entre sí, lo que permitió que los tratamientos o combinaciones de cepas del hiperparásito se mezclaran e incluso infectaran el testigo; este efecto fue posible debido a que *Verticillium* sp. se dispersa fácilmente entre una planta y otra, lo cual se fa-

cilitó por la poca distancia entre ellas. Alarcón y Carrión (1994) observaron que plantas de café sembradas en hileras a dos metros entre sí y tres metros entre hileras, tratadas con dos inoculaciones al año con *Verticillium* sp., también presentaron mezclas dentro del ensayo.

Incidencia de *Verticillium* sp. en las pústulas

No hubo diferencias significativas en la incidencia del hiperparásito en pústulas entre los tratamientos ($P=0,19$); solamente hubo diferencias significativas entre los tratamientos frente a las evaluaciones ($P=0,0001$). Esto significa que estadísticamente todos los tratamientos produjeron una incidencia en las pústulas de roya similar en todas las hojas evaluadas; es decir, el nivel de hiperparasitismo no varió con ninguna mezcla de cepas aplicadas o con respecto al testigo, donde no se aplicó ningún hiperparásito, y esta incidencia fue incrementando a medida que transcurrió el tiempo.

Hay que tomar en cuenta que el ensayo se vio afectado por una posible presencia de *Verticillium* sp. cuando se expusieron las plantas en la plantación de café orgánico de CATIE. Asimismo, hubo proximidad de las plantas dentro del ensayo, lo que pudo ocasionar una mezcla de los tratamientos e infectar el testigo (como en el caso de la presencia de *Verticillium* sp. en hojas con pústulas).

La incidencia de *Verticillium* sp. en el total de las pústulas fue bajo ($\leq 10,5\%$). Es posible interpretar la baja incidencia como un efecto adverso de la humedad relativa, pues se necesita entre 99 y 95% de la misma para completar el hiperparasitismo (Eskes *et al.* 1987). Durante el período de estudio, se observó una humedad relativa promedio mensual fuera del ensayo de entre 88.1 y 88.5 % para los meses de julio y agosto, respectivamente (cuando se realizó el estudio), y dentro del ensayo fue de 80.4%. La temperatura fue óptima para el hiperparásito durante el período de evaluación, tanto fuera del ensayo como dentro de él, ya que *Verticillium* sp. se desarrolla bien entre los 20 y 25 °C (Hall 1981).

Tanto *H. Vastatrix* como *Verticillium* sp. encontraron condiciones favorables de temperatura; sin embargo, el incremento en el número de pústulas de roya en las hojas evaluadas fue mucho más acelerado que el incremento de la incidencia de *Verticillium* sp. sobre dichas pústulas (Fig. 2).

Un caso similar se presentó en un estudio realizado por Monzón (1992), en Nicaragua, en el que también se evaluó la incidencia de *Verticillium* sp. Tanto en las hojas como en el total de pústulas se observó un

hiperparasitismo menor del 14% y uno de los factores que influyeron en la baja incidencia fue la baja humedad. Como este artículo señala, los niveles de hiperparasitismo alcanzados no superaron el 10,5%, y las condiciones de humedad fueron, como se discutió anteriormente, adversas.

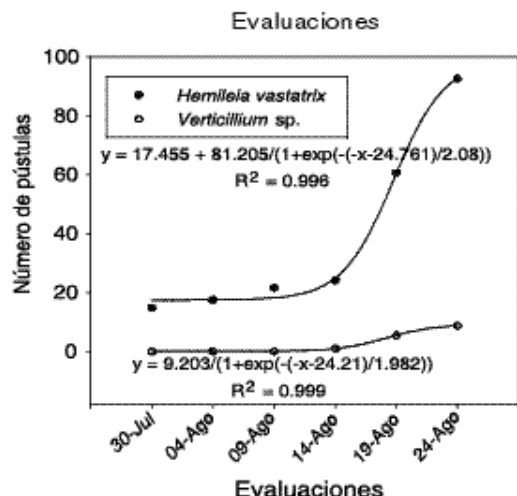


Figura 2. Curvas de mejor ajuste para el desarrollo de *H. vastatrix* y de *Verticillium sp.* durante el periodo del 30 de julio al 24 de agosto de 2000.

Conclusiones

Las cepas de *Verticillium sp.* produjeron satisfactoriamente conidias en los fermentadores artesanales. No se observó la presencia de clamidosporas en el fermentador, lo cual podría sugerir que las cepas corresponden a la especie *Verticillium lecanii*. La reducción de la concentración de melaza no afectó la producción final de conidias de las cepas de CATIE, Pejibaye y Tuis; por lo tanto, se puede usar la dosis más baja (8 g/l). La presencia de uredosporas de roya no mejoró la concentración final de conidias de dichas cepas, por lo que no se justificó su uso en los fermentadores. Para la cepa de Guayabo, no se pudo definir el efecto de la concentración de melaza ni de la presencia de uredosporas de roya en el sustrato. Para la fase de campo, las condiciones del ensayo en macetas y con inóculo natural de roya no permitieron determinar la capacidad hiperparasítica de las cepas de *Verticillium sp.*

Agradecimientos

A DANIDA por financiar este estudio; al Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), por el invaluable apoyo brindado para la realización de esta investigación. A la Licda. Lorena Orozco por su invaluable aporte en la revisión del documento.

Literatura citada

- Alarcón, R.; Carrión, G. 1994. Uso de *Verticillium lecanii* en cafetales como control biológico de la roya del café. *Fitopatología* 29 (1):82-85.
- Becker R, S. 1991. El sistema *Coffea spp* y *Hemileia vastatrix*. In *La Roya de Café: Conocimiento y Control*. 1991., Eschborn, DE, GTZ 281 p.
- Cadena G, G. 1982. Biología de *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. *Roya del café Hemileia vastatrix* Berk. y Br. Manizales, CO. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. p. 1-26.
- Castaño-Zapata, J. 1994. Principios básicos de fitopatología. 2 ed. Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. Publicación DPV-EAP No. 596. p. 69-91.
- Castellón B, JU. 1999. Uso de abonos orgánicos y sombra para almácigos de café orgánico. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 69 p.
- Da Silva R., R.; Ferraz, S. 1978. Efeito da temperatura o crescimento e esporulação "in vitro" de *Verticillium hemileiae*. 6 Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras. Ribeirão Preto, São Paulo. Resumos. p. 38-39.
- Eskes, AB; Mendes, MD; Robbs, CF. GAMS, W. 1987. Studies on the hiperparasitism of *Hemileia vastatrix* by *Verticillium spp.* In Congreso Paulista de Fitopatología, 10 Piracicaba S.P. Resúmenes. Grupo Paulista de Fitopatología.
- Hall, RA. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In *Microbial Control of Pests and Plant Diseases*. Ed. HD Burguer. London, Academic Press. p. 483-498.
- Hebbar, PK; Lumsden, RD. 1999. Formulation and fermentation of biocontrol agents of cacao fungal pathogens: example of *Trichoderma* species. In *Research Methodology in Biocontrol of Plant Diseases: with special reference to fungal diseases of cocoa*. Workshop Manual. Ed. U Krauss; P Hebbar. Turrialba, CR, CATIE. p. 63-68.
- Javed Z, J. 1987. Epidemiología y control de la roya del café en Centroamérica. Plagas y enfermedades de carácter epidémico en cultivos frutales de la región centroamericana. CATIE, CR. Serie Técnica. Informe técnico no. 110. p. 17-26.
- Jiménez C, A. 1997. Aporte de la caficultura al desarrollo de América Latina. In *Memorias XVIII Simposio Latinoamericano de Caficultura*. San José, CR. IICA, PROMECAFE p. 3-11.
- Leguizamón C, J; Vélez A, P; González C, A. 1989. Efecto de extractos metabólicos de *Verticillium lecanii* sobre *Hemileia vastatrix*. *Cenicafé* 40 (2):31-39.
- Lewis, JA; Papavizas, GC. 1983. Production of chlamydospores and conidia by *Trichoderma spp.* in liquid and solid growth media. *Soil Biology & Biochemistry* 15 (3): 351-357.
- López A., R.; Chamorro T, G; Gallo C., A. 1990. Aspectos económicos de la roya del café. In *50 años de CENICAFE 1938-1988. Conferencias conmemorativas*. Chinchiná, CO. p. 91-96.
- Monzón, JA. 1992. 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 (*Hemileia vastatrix*) del café (*Coffea arabica* L.). Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 66 p.
- Rivas Z, S; Leguizamón, C; Ponce D, C. 1996. Estudio histológico, anatómico y morfológico de *Verticillium lecanii* y *Talaromyces wortmannii* con *Hemileia vastatrix*. *Cenicafé* 47 (1):16-31.
- Vélez A, PE; Rosillo G, AG. 1995. Evaluación del antagonismo del hongo *Verticillium lecanii*, sobre *Hemileia vastatrix*, en condiciones de invernadero y de campo. *Cenicafé* 46 (1): 45-55.