

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION
ESCUELA DE POSGRADUADOS

REPRODUCCION MASIVA DE *Verticillium* sp. HIPERPARASITO DE
ROYA DEL CAFE, *Hemileia vastatrix*.

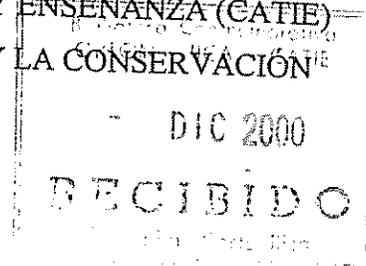
POR

EVELYN MARINA CANJURA SARAVIA

CATIE

Turrialba, Costa Rica
2000

CENTRO AGRNÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA (CATIE)
PROGRAMA DE EDUCACIÓN PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACIÓN
ESCUELA DE POSGRADO



**REPRODUCCIÓN MASIVA DE *Verticillium* sp. HIPERPARÁSITO DE ROYA DEL
CAFÉ, *Hemileia vastatrix*.**

Tesis sometida a la consideración de la Escuela de Posgrado, Programa de Educación para
el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y
Enseñanza, como requisito parcial para optar por el grado de

Magíster Scientiae

por

EVELYN MARINA CANJURA SARA VIA

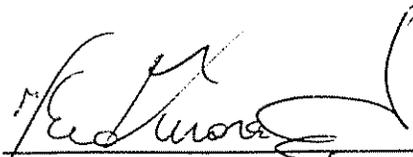
TURRIALBA, COSTA RICA

2000

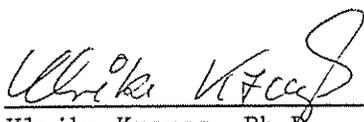
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Posgraduados del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

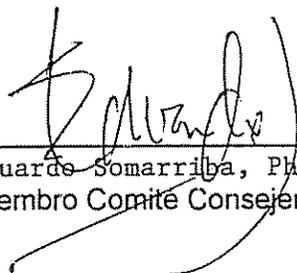
FIRMANTES:



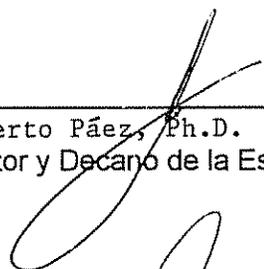
Vera Sánchez G., Ph.D.
Consejero Principal



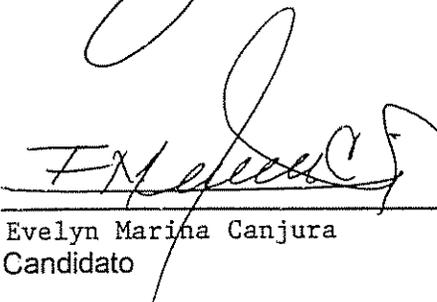
Ulrike Krauss, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



Eduardo Somarriba, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



Gilberto Páez, Ph.D.
Director y Decano de la Escuela de Posgraduados



Evelyn Marina Canjura
Candidato

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso:

Porque me permitiste culminar esta meta y sobre todo, porque me enseñaste a descubrir en las cosas más sencillas las más infinitas alegrías.

A la memoria de mi abuela:

Porque seguirás ocupando una gran parte del inmenso amor que reina dentro de mi ser.

A mis padres:

Porque han sido para mí una fuente inagotable de dicha, una llama incesante de amor y una escuela insaciable de respeto y humildad.

A mis hermanos:

Por todo lo que hemos compartido y alcanzado y porque simple y sencillamente los amo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco muy profundamente al CATIE por haberme brindado la oportunidad de estudiar esta Maestría.

Al DANIDA por haber financiado mis estudios.

A la Dra. Vera Sánchez, por los conocimientos brindados durante toda la fase de mi trabajo de tesis.

A la Dra. Ulrike Krauss, por toda la enseñanza que me ha brindado y por todo el respeto y confianza que depositó en mí.

Al Dr. Eduardo Somarriba por todas las sugerencias y comentarios aportados para la elaboración de este documento.

Al Dr. Elkin Bustamante por su desinteresada colaboración y oportuna ayuda en el trayecto de mi trabajo de tesis.

A mis queridos amigos: Francisco Soto, Maybelline Escalante, María de los Ángeles Pérez, Beatriz Centeno, Kathleen McGinley, Ixchel Palencia, Guadalupe de Gracia, Lorena Orozco y Paty Panting por haber estado conmigo en todo momento durante mi vivencia en este recinto y enseñarme tanto de la vida y la verdadera amistad.

Al personal de los Laboratorios de Diagnóstico, Control Microbial y Fitoprotección de la Unidad de Fitoprotección del CATIE, Eduardo Hidalgo, Arturo Gamboa, Adolfo Martínez, Ghuiselle Alvarado, Manrique González, José Castillo, Adrian Araya y Claudio Arroyo por brindarme todo lo necesario para mi fase de laboratorio y campo, por las sugerencias, consejos, paciencia y su generosidad.

A Johnny Pérez por su valiosa colaboración en el análisis estadístico de este estudio; a Miguel Sanabria por su ayuda oportuna en la obtención del equipo de laboratorio y su amistad; a Franklin López Torres por su inmensa colaboración en mi trabajo de laboratorio; a Lorena Orozco por su valiosa colaboración al brindarme el equipo fotográfico; a Nelson Gamboa, Arturo Ramírez, Dr. Francisco Jiménez, Ramón Mendoza, Shin Jong Hyon y José Robledo por su ayuda tan oportuna y desinteresada.

A todo el personal de la Biblioteca Orton porque estuvieron siempre atentos a brindarme todo el apoyo necesario.

A mis amigos: Frank, Vanesa y Marielos, porque no sólo me han brindado su amistad, sino porque también me ayudaron en muchas facetas de mi trabajo de tesis, su colaboración fue clave para llegar a la meta.

CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
CONTENIDO	v
RESUMEN	vii
SUMMARY	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE CUADROS	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	3
1.2 Hipótesis de investigación	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Cultivo de café	4
2.2 La roya del café (<i>Hemileia vastatrix</i> Berk. & Br.)	5
2.2.1 Control de la roya del café (<i>Hemileia vastatrix</i> Berk. & Br.)	6
2.2.2 Resistencia genética	7
2.2.3 Control biológico	8
2.3 <i>Verticillium lecanii</i> (Zimn.) Viegas	9
2.3.1 Modo de acción	10
2.3.2 Reproducción <i>in vitro</i>	12
2.3.3 Efectividad bajo condiciones de campo	13
2.4 Reproducción de hongos en fermentadores artesanales	14
2.5 Formulación de agentes de control biológico	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 Localización	17
3.2 Aislamiento de <i>Verticillium</i> sp.	17
3.3 Producción de conidias y clamidosporas de <i>Verticillium</i> sp. en el fermentador	18
3.4 Evaluación de la producción de conidias y clamidosporas en el fermentador con diferentes concentraciones de melaza y uredosporas de roya	19
3.4.1 Tratamientos	19
3.4.2 Diseño experimental	20
3.4.3 Modelo estadístico	20

3.4.4	Variables de respuesta	21
3.4.5	Análisis de resultados	21
3.5	Evaluación de la capacidad hiperparasítica de cuatro cepas de <i>Verticillium</i> sp. sobre pústulas de <i>Hemileia vastatrix</i> Berk. & Br.	22
3.5.1	Diseño de tratamientos	22
3.5.2	Diseño experimental	23
3.5.3	Modelo estadístico	23
3.5.4	Variables de respuesta	23
3.5.5	Análisis de resultados	24
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1	Efecto de diferentes concentraciones de melaza y uredosporas de roya en el fermentador sobre la concentración de conidias y clamidosporas de <i>Verticillium</i> sp.	25
4.1.1	Cantidad de inóculo inicial de <i>Verticillium</i> sp. para usar el fermentador	25
4.1.2	Reproducción masiva de cuatro cepas de <i>Verticillium</i> sp. en diferentes concentraciones de melaza y uredosporas de roya en el fermentador	26
4.1.3	Parámetros de la curva Gompertz	31
4.1.3.1	Nivel inicial de conidias	31
4.1.3.2	Nivel final de conidias	31
4.1.3.3	Tiempo en días del punto de inflexión	35
4.1.3.4	Pendiente en el punto de inflexión	38
4.2	Evaluación del efecto hiperparasítico de cuatro cepas de <i>Verticillium</i> sp. sobre pústulas de <i>Hemileia vastatrix</i> Berk. & Br.	40
4.2.1	Desarrollo de la enfermedad	40
4.2.2	Actividad hiperparasítica	41
5.	CONCLUSIONES	47
6.	RECOMENDACIONES	48
7.	BIBLIOGRAFÍA	49
8.	ANEXOS	53

CANJURA SARAVIA, EM. 2000. Reproducción masiva de *Verticillium* sp. hiperparásito de roya del café, *Hemileia vastatrix*. Tesis Mag. Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica.

RESUMEN

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

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. La roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.), es una de las enfermedades que causa mayores pérdidas en el rendimiento de café. Una serie de estrategias se han considerado para su control, entre ellas el control químico, resistencia genética, control biológico, control cultural y el control integrado. El control químico ha sido eficaz para el manejo de la roya, pero la contaminación del ambiente, así como también el alto costo de las aplicaciones y el riesgo de desarrollo de resistencia han tenido una gran repercusión en los ingresos del agricultor afectando su nivel de vida.

El hongo *Verticillium* sp. es uno de los hiperparásitos más comunes de roya del café (*H. vastatrix* Berk. & Br.), se presenta en los cafetales en forma natural y podría ser un buen candidato para el control biológico de roya. Sin embargo, no se ha logrado una reproducción masiva que permita obtener estructuras de reproducción en corto tiempo y a bajo costo. El presente estudio evalúa un método de fermentación artesanal anteriormente usado para producción masiva de otros hongos y bacterias.

El trabajo se realizó en las instalaciones del CATIE, Turrialba y tuvo dos fases, una de laboratorio donde se obtuvieron las cepas de *Verticillium* sp. y se evaluó el método de fermentación y otro con plantas sembradas en macetas donde se evaluó la actividad hiperparasítica de cepas de *Verticillium* sp.

Se evaluó un fermentador artesanal para 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 crecimiento fue el de dos semanas, con el que se obtuvieron concentraciones entre 7.25×10^6 y 1.42×10^8 conidias/ml al cabo de 15 días. Posteriormente y con base a los resultados anteriores, en fermentadores artesanales se hizo una reproducción masiva de las cuatro cepas, con el crecimiento de dos semanas, utilizando como sustrato 5 g de levadura, cuatro concentraciones de melaza (120, 80, 40 y 8 g/l) y con uredosporas de roya presentes y ausentes, durante un período de 10 días. Se construyeron 32 curvas del tipo Gompertz de cuatro parámetros las cuales describieron el comportamiento de la concentración de conidias a través del tiempo y se analizaron el nivel final de conidias, tiempo (días) del punto de inflexión y una medida de la pendiente en el punto de inflexión.

Para las cepas de CATIE, Pejibaye y Tuis no hubo ninguna diferencia significativa al utilizar las diferentes dosis de melaza en presencia y ausencia de uredosporas de roya. El nivel final de conidias fue similar para las tres cepas (entre 2.27×10^6 y 5.45×10^9 conidias/ml). El tiempo para alcanzar el punto de inflexión fue también similar (entre 3.4 y 10.2 días) y las tres

incrementaron la concentración de conidias/ml a una tasa de crecimiento similar, por lo que se concluyó que la mejor combinación de ingredientes para la reproducción masiva de estas cepas fue de 8 g de melaza/l en ausencia de uredosporas de roya. Únicamente la cepa de Guayabo presentó valores estimados extremos que estuvieron fuera del periodo de observación y dichos valores se presentaron cuando el medio se constituyó por 40 g de melaza/l en ausencia de uredosporas de roya. No se pudo establecer qué combinación de ingredientes sería la ideal para la reproducción masiva de la cepa de Guayabo.

Plantas de café sanas de la variedad caturra de 14 meses de edad, se expusieron al inóculo natural de roya presente en la plantación de café orgánico del CATIE; cuando se observaron los primeros síntomas de roya se realizaron tres aplicaciones de 5 mezclas de cepas de *Verticillium* sp., una aplicación cada 15 días, y se dejó un testigo. Se evaluaron 5 hojas afectadas con pústulas de roya cada 5 días y se midió la incidencia del hiperparásito en las hojas y en el total de pústulas con el fin de evaluar cuál mezcla fue la mejor. La metodología usada no permitió establecer diferencias entre las mezclas de cepas de *Verticillium* sp. dado que la incidencia del hiperparásitose generalizó inclusive al testigo.

Las cepas de *Verticillium* sp. produjeron conidias en los fermentadores artesanales en forma satisfactoria. No se observó la presencia de clamidosporas en el fermentador lo que 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 afectó 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.

CANJURA SARAVIA, EM. 2000. Massive production of *Verticillium* sp. hyperparasites of coffee rust, *Hemileia vastatrix*. Thesis Mag. Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica.

SUMMARY

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

Coffee is one of the most important commodities on the international market, and for the Central American countries it represents an important source of foreign revenue and labour. Nevertheless, it has been faced with a series of pests and diseases, with coffee rust (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) being one which causes the most losses in yield. A series of strategies have been considered for rust control, among them chemical control, genetic resistance, biological control, cultural control and integrated control. Chemical control has been effective for the management of rust, but the contamination to the environment as well as the high cost of the applications, the application equipment and technology, and the risk of development of resistance had great repercussions on the farmer's incomes, affecting their standard of living.

The fungus *Verticillium* sp. is one of the most common hyperparasites that naturally appear in coffee plantations, which could be a good candidate for biological control of rust (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.). However, massive production that would allow obtaining reproductive structures in a short period of time and at a low cost has not yet been achieved. For this reason, the present study was carried out with the purpose of evaluating a method of artesian fermentation previously used for massive production of other fungi and bacteria.

The work was carried out in the facilities of the CATIE, Turrialba, and had two phases. One in the laboratory where the strains of *Verticillium* sp. were obtained and the method of fermentation was evaluated and the other with plants grown in pots where the hyperparasitic activity of strains of *Verticillium* sp. was evaluated.

During the laboratory phase, first, an artisan fermentator for the massive production of four strains of *Verticillium* sp. (CATIE, Guayabo, Pejibaye y Tuis) was evaluated using a substrate based on 80 g of molasses and 5 g of yeast in one liter of distilled water. The process of the fermentator was tested with colonies of one, two and three weeks of age. The best growth was obtained with that of two weeks, with which concentrations between 7.25×10^6 and 1.415×10^8 conidias/ml were obtained after 15 days. Later on, based on the previous results, a massive production of the four strains was achieved in artisan fermentators with colonies of two weeks of age, using as substrate 5 g of yeast, four concentrations of molasses (120, 80, 40 and 8 g/L), with or without the addition of rust uredospores, during a period of 10 days. Thirty-two Gompertz curves of four parameters were constructed, which described the behaviour of conidial concentrations in time. The following parameters were analyzed: final level of conidia, time (days) of the inflexion point and a measure of the slope at the inflexion point.

For the strains from CATIE, Pejibaye and Tuis there was no significant difference when utilizing the different molasses concentrations in the presence or absence of rust uredospores. The final level of conidia was similar for the three strains (between 2.27×10^6 and 5.45×10^9 conidia/ml). The time to reach the inflexion point was also similar (between

6.4 and 10.2 days) and the concentrations of conidia of the three strains increased at a similar rate. Therefore, it was concluded that the best combination of ingredients for the massive production of these strains was of 8 mg of molasses/L, in the absence of rust uredospores. Only the Guayabo strain presented extreme estimated values that were out of the observation period, and such values occurred when the media was constituted of 40 g molasses/L in the absence of rust uredospores. In view of the above, it was not possible to establish what combination of ingredients would be the ideal for the massive production for the strain of Guayabo.

The hyperparasitic activity of the four previously described strains of *Verticillium* sp. was tested. Healthy coffee plants of the Caturra variety, of 14 months of age were, exposed to the natural inoculum of the rust present in the organic coffee plantation of CATIE. When the first rust symptoms were observed, three applications of five mixtures of *Verticillium* sp. were made, one application every 15 days. A control was left untreated. Five leaves affected by rust pustules were evaluated every 5 days and the incidence of hyperparasitism was measured in the leaves and in the total number of pustules with the purpose of evaluating what mixture was the best. The used methodology did not allow to establish differences among the mixtures of strains of *Verticillium* sp. since the incidence equalized across treatments, including the control.

At laboratory level it could be concluded that all the strains of *Verticillium* sp. studied were able to produce conidia in the artesian fermentators in satisfactory form. Thus, this system is efficient for the massive production of this type of hyperparasites. Chlamydospores were not observed in the fermentation which could suggest that the strains corresponds to the species *Verticillium lecanii*. It was determined that the reduction of the concentration of molasses did not affect the final production of conidia of strains of CATIE, Pejibaye and Tuis. Therefore, the lowest dose (8 g/L) can be used. Also, the presence of uredospores did not affect the final concentration of conidia of these strains. Their use in the fermentators is thus not justified. For the strains of Guayabo, the effect of the concentration of molasses could not be defined, nor the effect of the presence of rust uredospores in the media. For the field phase, the conditions of the pot plant assay with natural rust inoculum it did not allow to determine the hyperparasitic capacity of the strains of *Verticillium* sp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hojas con pústulas de roya (Foto tomada por Evelyn Marina Canjura, 2000)	5
Figura 2. Conidióforos de <i>Verticillium lecanii</i> vistos al microscopio compuesto (Foto tomada del Commonwealth Mycological Institute (1979))	9
Figura 3. Hojas de café con pústulas de roya hiperparasitadas por <i>Verticillium</i> sp. Se observa las pústulas cubiertas por micelio blanco típico de <i>Verticillium</i> sp. (Foto tomada por Evelyn Marina Canjura, 2000).....	11
Figura 4. Fermentador artesanal para reproducción masiva de hongos	14
Figura 5. Concentración de conidias de cuatro cepas de <i>Verticillium</i> sp. obtenidas en fermentadores artesanales durante un periodo de 15 días, inoculadas con una suspensión de conidias de cultivos puros de una, dos y tres semanas	25
Figura 6. Concentración de conidias/ml de la cepa de CATIE obtenidas en fermentadores artesanales con cuatro dosis de melaza y en presencia y ausencia de uredosporas de roya, durante un periodo de 10 días	27
Figura 7. Concentración de conidias de la cepa de Guayabo obtenidas en fermentadores artesanales con cuatro dosis de melaza y en presencia y ausencia de uredosporas de roya durante un periodo de 10 días	28
Figura 8. Concentración de conidias/ml de la cepa de Pejibaye obtenidas en fermentadores artesanales con cuatro dosis de melaza y en presencia y ausencia de uredosporas de roya durante un periodo de 10 días	29
Figura 9. Concentración de conidias/ml de la cepa de Tuis obtenidas en fermentadores artesanales con cuatro dosis de melaza y en presencia y ausencia de uredosporas de roya durante un periodo de 10 días	30
Figura 10. Desarrollo de la enfermedad en las hojas evaluadas durante el periodo 30 de julio a 24 de agosto de 2000	40
Figura 11. Incidencia de <i>Verticillium</i> sp. en hojas con roya durante el periodo comprendido entre el 30 de julio al 3 de setiembre de 2000	43
Figura 12. Curva de mejor ajuste de la Incidencia de <i>Verticillium</i> sp. en pústulas de roya durante el período 30 de julio a 24 de agosto de 2000	45
Figura 13. Curvas de mejor ajuste para el desarrollo de la enfermedad y de <i>Verticillium</i> sp. durante el periodo del 30 de julio al 24 de agosto de 2000	46

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Ubicación geográfica y características climáticas de cuatro zonas cafetaleras de Costa Rica/1999	17
Cuadro 2. Separación de medias del nivel final de conidias/ml mediante la prueba de Tukey con datos no transformados (Media) y datos transformados (Media t) para cuatro cepas de <i>Verticillium</i> sp.	32
Cuadro 3. Separación de medias del nivel final de conidias/ml mediante la prueba de Tukey con datos no transformados y datos transformados ($t = \text{Log}Y$) para la cepa de Guayabo.....	33
Cuadro 4. Separación de medias del tiempo (días) del punto de inflexión mediante la prueba de Tukey para cuatro cepas de <i>Verticillium</i> sp.	36
Cuadro 5. Separación de medias del tiempo (días) del punto de inflexión mediante la prueba de Tukey para la cepa de Guayabo.....	37
Cuadro 6. Separación de medias de la incidencia de <i>Verticillium</i> sp. en hojas con al menos una pústula durante un periodo comprendido entre el 30 de julio y el 29 de agosto de 2000	42

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo del café es uno de los más importantes en el mercado internacional. En América Latina es uno de los principales productos agrícolas (Jiménez, 1997). Para las economías centroamericanas significa fuente de divisas por medio de la exportación, lo que lo convierte en un gran soporte para dichos países. Unido a esto, es una fuente importante de trabajo principalmente durante las labores de cultivo, recolección y exportación (Castellón, 1999).

No obstante, una serie de plagas y enfermedades afectan este cultivo siendo la roya (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) una de las enfermedades que causa mayores pérdidas en el rendimiento. A pesar de que la enfermedad no mata los árboles directamente, las continuas defoliaciones provocan una pérdida progresiva de la producción (Javed, 1987).

Se han considerado una serie de estrategias para combatir dicha enfermedad, entre ellas el control químico, resistencia genética, control biológico, control cultural y el control integrado o sea la combinación de varias estrategias (López *et al.*, 1990).

El control químico ha sido una herramienta eficaz para el manejo de la roya, pero presenta como limitantes, el alto costo de las aplicaciones, el equipo de aplicación y su tecnología, la eficacia de los compuestos químicos y el riesgo de desarrollo de resistencia (Becker, 1991). Todo esto tiene una gran repercusión en los ingresos del agricultor y afecta su nivel de vida (López *et al.*, 1990).

Por lo anteriormente descrito, el uso de agentes de control biológico se presenta como una opción para aprovechar al máximo los organismos antagonistas del patógeno que puedan reducir la severidad de la enfermedad. Entre éstos se encuentran especies del género *Verticillium* como *Verticillium lecanii* que es el hiperparásito más común presente de forma natural en los cafetales y por lo tanto, podría ser de mucho valor si se complementa con otras prácticas que realiza el agricultor para el control de esta enfermedad (Sánchez, comunicación personal, 2000).

Diferentes trabajos de investigación (Leguizamón *et al.*, 1989; Monzón, 1992; Rivas *et al.*, 1996) han demostrado la capacidad hiperparasítica de *Verticillium* sp. sobre roya del café. Sin embargo no se ha logrado una reproducción masiva del hongo que permita obtener estructuras de reproducción en un corto plazo y bajo costo. Por lo tanto, esta investigación se realizó con el propósito de

desarrollar un método de producción eficiente y de bajo costo del hiperparásito que permita obtener altas concentraciones de estructuras reproductivas y eficientes del hongo.

1.1. OBJETIVOS

Objetivo general.

- Desarrollar un método eficiente y práctico para la reproducción masiva de cepas de *Verticillium* sp. con alto potencial como hiperparásitos de *Hemileia vastatrix*.

Objetivos específicos.

- Evaluar la producción de conidias y clamidosporas de *Verticillium* sp. en un fermentador artesanal.
- Evaluar diferentes concentraciones de melaza y la presencia de uredosporas de roya en un fermentador artesanal para obtener mayor concentración de conidias y clamidosporas de *Verticillium* sp. en el menor tiempo posible.
- Evaluar la capacidad hiperparasítica de cepas de *Verticillium* sp. sobre roya de café, causada por *H. vastatrix*.

1.2. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

- El uso del fermentador artesanal para la reproducción masiva de *Verticillium* sp. es un método efectivo para obtener buenas concentraciones de conidias en el menor tiempo.
- Al reducir las proporciones de la melaza que compone el sustrato utilizado en el fermentador artesanal y al adicionar uredosporas de roya, se incrementa la producción de conidias y clamidosporas en el sustrato.
- La severidad de *Verticillium* sp. sobre la roya del café varía entre cepas.
- La mezcla de cepas tiene mejor efecto sobre dicha enfermedad.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Cultivo de café.

El café pertenece al orden Rubiales y a la familia Rubiaceae; entre las especies económicamente más importantes de esta familia se encuentran *Coffea canephora*, *C. liberica* y *C. arabica*, siendo ésta última la más importante (FONAIAP, 1988; Schot, 1999). El 80 por ciento de la producción mundial corresponde a la especie *C. arabica*, la cual se cultiva en Centroamérica, Colombia, Brasil, la India, y en África (Puerta-Quintero, 1999).

A nivel mundial, el cultivo ha elevado su importancia, lo cual se ha reflejado en un continuo incremento en la producción. En los años 60/70 fue de 65 millones de sacos, en 1980 la producción aumentó a 85 millones y para 1997/98 alcanzó una cifra récord de 107 millones de sacos (Gautier, 1999).

En América Latina, el cultivo del café se inició en la primera mitad del siglo dieciocho y poco tiempo después adquirió importancia en los países situados entre el Trópico de Cáncer y el de Capricornio (Jiménez, 1997). En la actualidad el café es uno de los principales productos de exportación en América Central, siendo ésta la tercera región cafetalera en el mundo (Bertrand y Rapidel, 1999).

A pesar que Centroamérica posee grandes extensiones de tierras aptas para dicho cultivo, existen otras zonas tropicales que poseen condiciones favorables y compiten con un café más barato, como es el caso de Asia, o de calidad alta, caso de Colombia o Kenia. Dicha competencia se ve reflejada en las variaciones cíclicas y bruscas de los precios internacionales (Bertrand y Rapidel, 1999).

Por lo tanto, es necesario realizar más investigaciones para solucionar los problemas que presenta la caficultura en América Central, aumentar su eficiencia y así asegurar la sostenibilidad del sistema de cultivo dentro de la finca y el contexto internacional (Bertrand y Rapidel, 1999).

2.2. La roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.).

La roya del café, causada por el hongo *H. vastatrix*, es considerada como la enfermedad más importante de este cultivo en el mundo (González y Martínez, 1996). La roya ha provocado grandes daños en plantaciones comerciales de África, Brasil y Centroamérica a través de las defoliaciones prematuras que produce (FONAIAP, 1988). *H. vastatrix* es un hongo Basidiomicete que pertenece al orden Uredinales, que contiene más de 5,000 especies, la gran mayoría de importancia económica y con patógenos reconocidos en más de 200 familias de plantas vasculares (Rivas *et al.*, 1996).

El síntoma inicial en las hojas consiste en pequeñas manchas cloróticas que evolucionan a un color amarillo con un tamaño de uno a dos milímetros de diámetro en el envés, hasta alcanzar un diámetro entre uno y dos centímetros. Estas manchas son lisas y de color amarillo en el haz de las hojas y en el envés presentan una masa de uredosporas en forma de polvo amarillo o anaranjado, siendo este último el principal signo externo (FONAIAP, 1988) (Ver Figura 1).

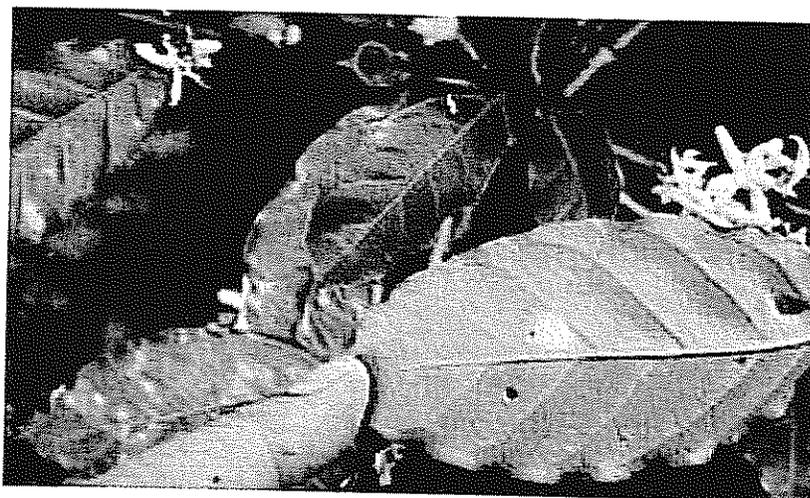


Figura 1. Hojas con pústulas de roya (Foto tomada por Evelyn Marina Canjura, 2000).

H. vastatrix se informó por primera vez a principios de 1869 en una plantación de la isla asiática de Ceilán, hoy Sri Lanka. A partir de Ceilán, se fue dispersando rápidamente a toda Asia y al mismo tiempo fue reportada en países de África oriental y más tarde llegó a África occidental (Avelino *et al.*, 1999). Apareció por primera vez en América en 1970 donde se sugiere que las uredosporas fueron transportadas por los vientos Alisios desde África del Este hasta Brasil (Ruiz, 1994).

El ciclo de vida de *H. vastatrix* se inicia con la disseminación de las uredosporas, la cual a su vez se lleva a cabo mediante las fases de liberación, dispersión y depositación. El siguiente paso lo constituye la germinación, la cual determina el grado de infección de la enfermedad. La tercera etapa comienza con la penetración del hongo por los estomas de la hoja, seguido de la colonización de la hoja por las hifas (primer signo visual). La siguiente etapa es la esporulación, período en el cual emerge el esporóforo y se producen nuevas uredosporas infecciosas. El tiempo transcurrido entre la germinación y la esporulación se denomina "período de latencia" y es el que mayor importancia tiene en todo el ciclo de vida de la roya, pues mientras más corto sea, mayor posibilidad habrá de que se repita el ciclo y por ende la epidemia será más severa (Avelino *et al.*, 1999).

El progreso de la enfermedad se ve favorecido por la cantidad y distribución de las lluvias (Rivillas *et al.* 1999). La temperatura óptima para la germinación de uredosporas es entre los 21 y 25°C (FONAIAP, 1988); con temperaturas superiores a 28°C e inferiores a 15°C la germinación disminuye. En humedades relativas entre 95 y 98% se presenta menor germinación de uredosporas. Así mismo, la germinación disminuye cuando hay mayor exposición a la luz solar. Las uredosporas viejas presentan niveles más bajos de germinación que las jóvenes (Cadena, 1982).

El inóculo residual, como las pústulas en hojas en la época de mayor formación de follaje y de frutos, es el que determina la tasa de crecimiento de la epidemia y su severidad (Rivillas *et al.* 1999).

2.2.1. Control de la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br).

El control de la roya del café ha sido principalmente dirigido al uso de fungicidas, el cual ha sido exitoso cuando se ha hecho en forma adecuada, aunque aumenta los costos de producción (Bertrand y Rapidel, 1999). Se han empleado satisfactoriamente fungicidas a base de cobre y sistémicos como los pertenecientes a la familia de los triazoles, pero su alto costo los ha hecho difíciles de acceder por la mayoría de los productores (Avelino *et al.*, 1999).

Además, se ha observado que algunos agricultores no realizan el control químico en forma apropiada, pues no lo hacen en presencia de altos niveles de infección, lo cual ha impedido que se

aproveche su acción protectora o curativa; así el control ha resultado ineficiente y ha comprometido seriamente la cantidad y calidad de la cosecha (Rivillas *et al.*, 1999).

Asimismo, la contaminación del ambiente es inevitable, particularmente el daño a la fauna benéfica. Se han creado problemas no solo con la selección de poblaciones resistentes del patógeno sino al favorecer la aparición de plagas secundarias (González *et al.*, 1995). Vélez y Rosillo (1995) mencionan que aplicaciones repetitivas de fungicidas a base de cobre han provocado un aumento en severidad del ataque del minador de la hoja del café *Perileuoptera coffeella* y de la araña roja *Oligonychus ilicis*.

2.2.2. Resistencia genética.

Otra alternativa para el control de la roya es el mejoramiento genético. Al menos nueve genes están implicados en la resistencia específica del cafeto a la roya, dichos genes corresponden a la resistencia "gen a gen" según la teoría de Flor. De los nueve genes conocidos, cuatro han sido identificados en el *Coffea arabica* (Avelino *et al.*, 1999). En América los cultivares tradicionales poseen una estrecha base genética, por lo cual el problema de la roya adquiere mayor trascendencia y se hace más difícil encontrar alguna variación importante en resistencia (Ruiz, 1994).

Eskes *et al.* (1987) observaron que en Brasil, el uso de variedades con resistencia genética a la roya del café junto con aplicaciones de fungicidas a base de cobre y sistémicos, o la mezcla de ambos contribuyó a su control. Sin embargo, la reducción de las aplicaciones no fue suficiente para evitar los problemas de contaminación ambiental que presentan los plaguicidas.

En Colombia, en las colecciones de germoplasma, se habían identificado introducciones resistentes, pero por mucho tiempo no fueron utilizadas directamente como variedades comerciales por presentar defectos agronómicos y de calidad (Ruiz, 1994). Después de muchos años de investigaciones, se logró la variedad Colombia, con resistencia a la roya que ha logrado reducir los costos de control. Sin embargo, existe la posibilidad de que surjan nuevas razas del patógeno y por eso es necesario utilizar nuevas herramientas en el control de esta enfermedad (Ruiz, 1994).

En América Central también se han seleccionado cultivares con resistencia a la roya, entre éstos se encuentran genotipos híbridos como el Catimor (Caturra x Híbrido de Timor) (Bertrand y Rapidel,

1999). Sin embargo, algunas progenies de Catimor, bajo ciertas condiciones ambientales como son climas cálidos y de poca humedad, presentan pérdida de vigor que conduce a un agotamiento de la planta casi irreversible. Ante esta situación se han realizado esfuerzos por mejorar el comportamiento del Catimor, especialmente su adaptación y vigor en las zonas no favorables (Rodrigues, 1990).

2.2.3. Control biológico.

El control biológico es otra opción para el control de la roya. De Bach (1992) ha definido el control biológico como: "La acción de parásitos, predadores, o patógenos para mantener la densidad de poblaciones de otro organismo a un promedio más bajo que el que existiría en su ausencia". Baker (1987) considera que el control biológico de las enfermedades de las plantas permite reducir la cantidad de inóculo o la actividad del patógeno, a través de mecanismos producidos por una serie de organismos incluyendo a la planta misma.

Es ampliamente conocido que los patógenos presentes en la superficie de las partes aéreas de las plantas, son susceptibles al ataque de otros microorganismos, lo cual puede contribuir a la reducción de la incidencia de enfermedades foliares (Blakeman, 1982). Sin embargo, para desarrollar un programa satisfactorio de control biológico es necesario el conocimiento de la biología y las necesidades ecológicas de los patógenos y sus enemigos naturales (Forrer, 1979). En términos generales se considera que un organismo con capacidad de colonizar y establecerse en el filoplano (superficie de la hoja) es el mejor candidato para ser usado como agente de control biológico (Andrews, 1992).

Entre los enemigos naturales más importantes de la roya del café se encuentran hongos hiperparásitos como *Verticillium lecanii*, *V. leptobactrum*, *V. psalliotae*, *Cladosporium hemileiae* y *Paranectria hemileiae*. Estos hongos ocurren en forma natural, atacan las hifas y las estructuras de reproducción de *H. vastatrix* reduciendo la infección e inóculo de roya (Blakeman, 1982; Monzón, 1992). Otros hongos como *Darlucal filum* (Biv.) Cast. y *Tuberculina maxima* Rost se han informado como hiperparásitos muy importantes de la roya del café, el primero se asocia además con muchas especies de royas (Forrer, 1979).

2.3. *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas.

Verticillium lecanii es un hongo que a través del tiempo, se le ha conocido con los nombres de *Cephalosporium lecanii* Zimmermann (1898), *Oospora necans* Saccardo & Trotter (1906), *Cephalosporium coccorum* Petch (1925), *Cephalosporium longisporum* Petch (1925), *Cephalosporium aphidicola* Petch (1931), *Cephalosporium dipterigenum* Petch (1931), *Cephalosporium muscarium* Petch (1931), *Cephalosporium thripidum* Petch (1931), *Cephalosporium nodulosum* Petch (1939), *Verticillium hemileiae* Bouriquet (1939), *Cephalosporium lanoso-niveum* van Beyma (1942), *Cephalosporium subclavatum* Petch (1942) (Commonwealth Mycological Institute, 1979); actualmente se conoce como *V. lecanii* (Zimm.) Viegas. Es un hongo imperfecto que pertenece al orden de los Moniliales que poseen conidias libres, ovoides, hialinas y unicelulares (Bigre *et al.*, 1990). Las conidias se forman independientemente, en pares o en grupos de tres o cuatro en conidióforos pobremente desarrollados (ver Figura 2). Las conidias varían mucho en tamaño, dependiendo de la raza y la edad del cultivo. En cultivos sumergidos se forman blastosporas. (Commonwealth Mycological Institute, 1979).



Figura 2. Conidióforos de *Verticillium lecanii* vistos al microscopio compuesto (foto tomada del Commonwealth Mycological Institute (1979)).

V. lecanii crece bien en medio de cultivo a base de agar malta, harina de avena o papa dextrosa agar en los cuales se desarrolla un micelio delgado blanco o crema, con menos color o de color amarillo en el inverso del cultivo. Las hifas son de una a dos micras de ancho (Commonwealth Mycological Institute, 1979). La germinación de esporas así como el crecimiento de los aislamientos requiere de temperaturas de 20 a 25°C, declina poco a poco a temperaturas mayores de 25°C, y se detiene a temperaturas mayores de 30°C; la esporulación cesa a los 30°C (Hall, 1981).

El hongo *V. lecanii* se ha encontrado en áreas tropicales y subtropicales, parasitando insectos, royas y otros hongos superiores; es un habitante común del suelo, donde sobrevive saprofiticamente en restos de plantas y otros tipos de materia en descomposición (Rivas *et al.*, 1996). No obstante, ha sido informado principalmente como un hongo entomopatógeno muy importante para controlar plagas fundamentales de cultivos, tales como áfidos y escamas y se han observado epizootias en las regiones tropicales y subtropicales (Monzón, 1992), así como en las moscas blancas *Trialeurodes vaporariorum* Westwood y *Bemisia tabaci* Gennadius (Romero y Carrión, 1995). En Nueva Guinea se ha encontrado en escamas (coccidos) del café y en una palomilla (Lepidóptera) (Shaw, 1988)

Verticillium lecanii se ha informado en varios países como hiperparásito de royas en diferentes cultivos. En café se ha encontrado hiperparasitando en forma natural pústulas esporuladas de roya, donde se observa un crecimiento blanco del hiperparásito sobre las uredosporas que avanza hacia los bordes y deja en el centro solo tejido necrótico (Vélez-Arango, 1991) (Ver Figura 3). Sin embargo, el porcentaje de parasitismo natural ha sido bajo para ejercer un buen control (González y Martínez, 1996; Shaw, 1988). En el mercado se encuentran productos comerciales con cepas de este hongo, entre estas preparaciones se menciona Vertelec (contra áfidos) y Mycototal (contra mosca blanca) (Shaw, 1988).

2.3.1. Modo de acción.

Estudios realizados por Leguizamón *et al.* (1989) mostraron que micelio y conidias de *V. lecanii* afectaron el desarrollo de *H. vastatrix*, la germinación de uredosporas, sus periodos de incubación y latencia, y la tasa de infección.

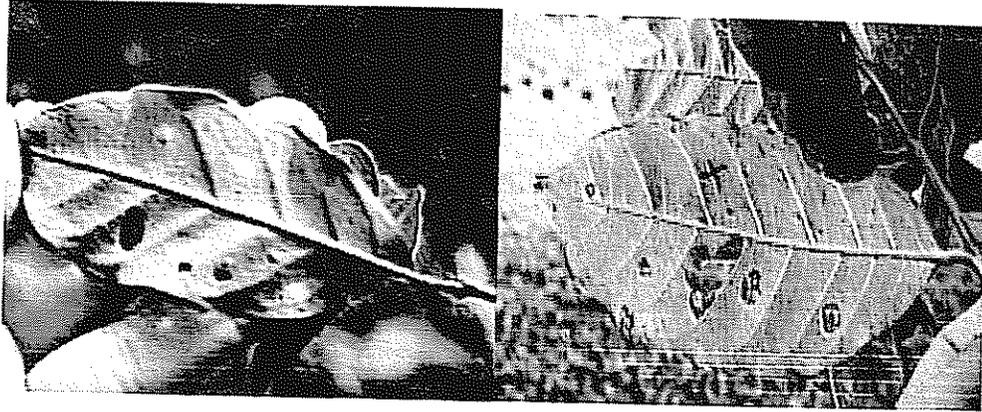


Figura 3. Hojas de café con pústulas de roya hiperparasitadas por *Verticillium* sp.; se observa las pústulas cubiertas por micelio blanco típico de *Verticillium* sp. (Foto tomada por Evelyn Marina Canjura, 2000).

Así mismo, Rivas *et al.* (1996) observaron bajo el microscopio electrónico de barrido, que la mayoría de las uredosporas fueron invadidas por hifas de *V. lecanii* y en algunos casos, una sola uredospora fue invadida por más de una hifa del hiperparásito, destruyendo su contenido, especialmente de uredosporas maduras. El grado de infección de la hoja se vio reducido, por lo que los autores concluyeron que *V. lecanii* tiene potencial como controlador biológico de *H. vastatrix*.

En estudios realizados por Monzón (1997) también se observó la capacidad de *V. lecanii* de hiperparasitar pústulas de roya, y al igual que Rivas *et al.* (1996), observó la actividad inhibidora en la germinación de las uredosporas.

Vélez-Arango (1991) observó que al asperjar extracto metabólico de *V. lecanii* sobre uredosporas de *H. vastatrix* éstas presentaron cambios morfológicos tales como la desintegración, pérdida del contenido, anomalías en las paredes como pérdida de las estructuras equinuladas, pérdida de la turgencia y cambios relacionados con tinción al ser coloreadas con azul de lactofenol. Además, también observó que al asperjar las hojas de café con cultivo licuado del hiperparásito, se formó micelio alrededor de las uredosporas en el punto de entrada del estoma. Rivas *et al.* (1996) al igual que Vélez-Arango (1991) observaron que el cultivo licuado y el extracto metabólico del antagonista afectaron la evolución de las lesiones y la germinación de uredosporas. Dicho efecto fue provocado por la inhibición total de la germinación y algunos cambios morfológicos en las uredosporas.

González y Martínez (1996) por su parte observaron que el efecto del cultivo licuado de *V. lecanii* sobre uredosporas de roya, además de provocar deformación, hace perder su color original amarillo-naranja, cambian a una tonalidad más clara, grisácea, hasta que finalmente toman un color pardo oscuro en el interior de la misma.

2.3.2. Reproducción *in vitro*.

Varios trabajos se han realizado con el propósito de obtener en el laboratorio concentraciones altas de estructuras infectivas de *Verticillium* sp. en forma rápida y a bajo costo. En 1978, Da Silva y Ferraz determinaron que la temperatura óptima de crecimiento y esporulación es alrededor de 20 y 30°C tanto en medio líquido como en medio sólido. Estos autores cultivaron *V. lecanii* en medio sólido papa dextrosa agar donde se observó abundante crecimiento vegetativo, con una esporulación mínima, sin embargo cuando adicionaron al medio un 2% del peso de uredosporas de *H. vastatrix*, se observó una abundante producción de conidias.

En otros trabajos como los elaborados por Carrión (1988), se inoculó el hongo en medio de papa dextrosa agar a temperatura de 25°C. Luego se inoculó en 300 g de semillas de trigo, las cuáles se colocaron al medio ambiente en frascos; en estas condiciones la cepa demoró aproximadamente 15 días en colonizar completamente el trigo. Eskes *et al.* (1991) obtuvieron concentraciones de 1×10^6 y 1×10^7 conidias/ml en medio papa dextrosa agar.

Leguizamón *et al.* (1989) obtuvieron un buen crecimiento de *V. lecanii* en caldo papa dextrosa. El inóculo inicial fue obtenido de medio de cultivo papa dextrosa agar, el caldo se mantuvo en alternancia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a 22°C.

González *et al.* (1995) utilizaron 20g de cebadilla de arroz, 20g de harina de maíz, 20g de azúcar oscura y 2g de CaCO_3 en un litro de agua destilada a pH 6 en botellas de 350 mililitros de capacidad colocadas a temperatura de 20 y 25°C durante 12 días. Con esta metodología los autores obtuvieron una concentración de 10^7 conidias/ml.

Posteriormente, en otros estudios realizados por Vélez-Arango (1991), se observó que el hongo aislado directamente de lesiones de roya del café y cultivado en el mismo caldo a 24°C por un período de 10 a 12 días produjo micelio y conidias del hongo.

Por su parte, Vélez y Rosillo (1995) cultivaron *V. lecanii* en caldo Sabouraud dextrosa, con alternancia de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, a una temperatura promedio de 24°C y se alcanzó una concentración de 3.5×10^5 conidias/ml al cabo de 15 días.

En trabajos más recientes, Romero y Carrión (1995) lograron reproducir el hiperparásito en papa dextrosa agar, inocularon 2 ml de una suspensión conidial en agua destilada y al medio de cultivo que se incubó a temperatura ambiente (entre 16 y 22°C). Al cabo de cuatro a siete días lograron una concentración de 1×10^5 conidias/ml.

2.3.3. Efectividad bajo condiciones de campo.

Muy pocos estudios se han realizado para determinar exactamente las condiciones que favorecen el hiperparasitismo del hongo. Varios estudios coinciden que condiciones ambientales desfavorables, como es el caso de baja humedad, puede ser el factor limitante (Monzón, 1992). Eskes *et al.* (1987) afirmaron que *V. lecanii* puede hiperparasitar las pústulas de roya del cafeto de cinco a siete días con humedades relativas de 99%. Sin embargo su acción hiperparasítica disminuye con humedad relativa de 95% y es nula a 66%. En 1992, Monzón realizó un estudio en tres zonas de Nicaragua que le permitió concluir que existen dos factores limitantes a nivel de campo que afectan la incidencia de *Verticillium* sp.: la cantidad inicial de roya presente y la humedad. Posteriormente en México (Alarcón y Carrión, 1994), se observó la mayor esporulación de *V. lecanii* en los meses con menor precipitación pluvial tanto en condiciones naturales como manejando las aspersiones del cafetal.

Velez y Rosillo (1995), al estudiar una cepa de *V. lecanii* en Colombia, concluyeron que al ser aplicado en el campo el hongo a una concentración de 3×10^6 conidias/ml, no se evitó la aparición de la enfermedad, pero se redujo el número de lesiones en el árbol y la caída de las hojas fue menos acelerada. Lo cual coincide con Monzón (1997) quién observó la mayor incidencia de *V. lecanii* a los primeros 10 días después de la aplicación de dicho hongo (1×10^5 conidias/ml) en invernadero, donde se alcanzaron niveles hasta del 80%, y posteriormente decreció. Además, observó que el mayor número de pústulas hiperparasitadas fue a los 15 y 20 días después de la aplicación. Esto se debió a que el número de pústulas en las hojas parasitadas aumentó, en cambio el número total de pústulas disminuyó al caer las hojas afectadas de la planta.

En estudios realizados por Meza y Leguizamón (1994) en los que se utilizaron dos concentraciones de *Verticillium* sp. (1×10^3 y 1×10^6 conidias/ml) se encontró que la mejor concentración del hiperparásito para controlar la roya del café en condiciones de campo es de 1×10^6 conidias/ml, donde se observó inhibición de la germinación de 99% de uredosporas de roya. Carrión (1988) recomienda mantener una tasa constante de infección de *V. lecanii* asperjando de cuatro a cinco veces durante el periodo de noviembre a abril para poder establecer un posible control biológico.

2.4. Reproducción de hongos en fermentadores artesanales.

El uso de fermentadores es un método simple y de bajo costo que ha sido utilizado para el cultivo de bacterias y hongos entre ellos especies de *Trichoderma*, para aplicación en cultivo de cacao como alternativa de control biológico para producir agentes de biocontrol. El fermentador se compone en un recipiente plástico que se llena con agua destilada, melaza y levadura (Hebbar y Lumsden, 1999); debe tener un tubo largo que llega hasta el fondo del recipiente y posee en el extremo externo del tubo un filtro de $0.2 \mu\text{m}$ para hacer pasar aire estéril por medio de un burbujeador conectado al mismo. Un segundo tubo debe ser insertado para liberar aire que se produce dentro del recipiente con los sustratos y posee también un filtro de $0.2 \mu\text{m}$ en el extremo externo, para evitar la contaminación con bacterias (Hebbar y Lumsden, 1999) (Ver Figura 4).

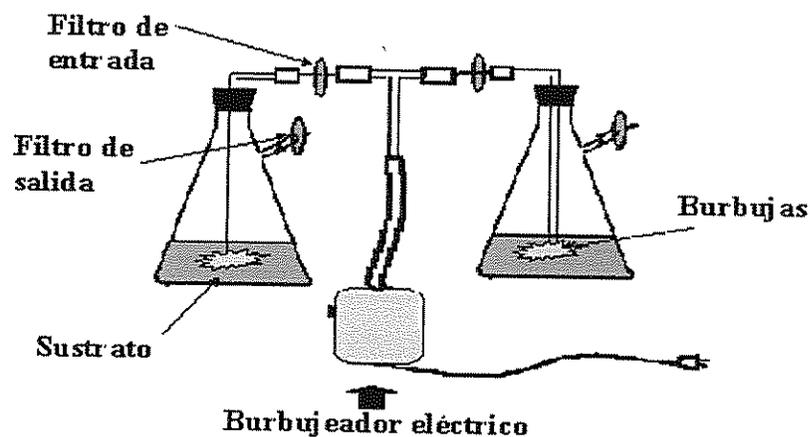


Figura 4. Fermentador artesanal para reproducción masiva de hongos.

Los propágulos producidos en el fermentador se pueden aplicar a las plantas en líquido directamente mezclado con adyuvantes o agua o formulados con sólidos como talco (Hebbar y Lumsden, 1999).

De acuerdo a la información disponible, los fermentadores podrían ser utilizados también para la reproducción de *V. lecanii* (Krauss, comunicación personal, 2000) y obtener producciones más eficientes de dicho hongo con concentraciones más bajas de melaza a nivel de laboratorio y obtener producciones altas de conidias y clamidosporas para realizar aplicaciones en el campo y realizar un buen control de la roya del café (Sánchez, comunicación personal, 2000).

2.5. Formulación de agentes de control biológico.

La formulación de microorganismos es un proceso que mezcla uno o varios ingredientes con el microorganismo para dar como resultado un preparado cuyo objetivo es el de brindar una forma económica y de fácil utilidad de un principio activo, con viabilidad prolongada, que contribuya a incrementar su efectividad. También permite realizar la aplicación del producto de una manera más fácil, aumentando la persistencia, humectabilidad y adhesividad a la planta o al insecto (Carballo, 1998). Sin embargo este proceso solo se justifica si se cuenta con un mercado potencial y el producto final presenta facilidad de preparación y aplicación, estabilidad durante el transporte y almacenaje, viabilidad abundante de propágulos, buena tabla de vida, y un costo aceptable. Por lo tanto, la tecnología de formulación no es fácil, por lo que ha enfrentado una serie de problemas importantes y complejos relacionados con el crecimiento de los de agentes de control biológico de plagas (Lewis y Papavizas, 1991).

Stirling *et al.* (1998) realizaron una investigación para desarrollar una formulación granulada de *Verticillium chlamydosporium* Goddard, un parásito de huevos del nemátodo nodulador de la raíz *Meloidogyne javanica*. La formulación contenía una cantidad mínima de sustratos orgánicos (kaolina y goma arábiga) requeridos para establecer el hongo en el suelo y pudo ser almacenada por 12 meses a una temperatura de 25°C. La formulación granular de *V. chlamydosporium* fue incorporada al suelo en un cultivo de tomate, donde se observó un incremento de la densidad poblacional del hongo después de 7-14 semanas de la aplicación, y un parasitismo entre 37 y 82% de la primera generación de huevos producida por el nemátodo.

En una investigación realizada por Verhaar *et al.* (1999), se estudió la eficacia de *V. lecanii* en adición de formulaciones en aceite para el biocontrol del mildiú polvoriento del melón, *Sphaerotheca fuliginea*. Los autores probaron tres formulaciones de esporas de *V. lecanii* en aceite, una en aceite de maní y dos emulsiones invertidas con aceite de parafina. El mejor desarrollo de esporas de *V. lecanii* fue observado en la formulación en aceite de maní, mostrando un mejor control del mildiú. Además, dicha formulación redujo significativamente la dependencia a la humedad relativa de *V. lecanii*, uno de los principales problemas con los que se ha enfrentado a nivel de campo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización.

El estudio se llevó a cabo en el invernadero, campo y Laboratorio de Fitopatología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE, localizado en Turrialba, Provincia de Cartago, Costa Rica, situado a 640 m, 9°55'21" y 83°39'40". El lugar posee una temperatura promedio anual de 21.7°C, precipitación de 2,479 mm y humedad relativa 87% (Estación Meteorológica del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE). Las condiciones micrometeorológicas dentro del ensayo se midieron con un hidrotermógrafo, para temperatura y humedad relativa; y con un densiómetro, para la sombra. Los valores obtenidos se detallan en el Anexo 1.

3.2. Aislamiento de *Verticillium* sp.

Se visitaron cuatro fincas de zonas cafetaleras de Costa Rica con el fin de obtener el inóculo de *Verticillium* sp. en el campo. Las cuatro zonas son Pejibaye, Tuis, Guayabo y una parcela de café orgánico situado en el CATIE. Las características de las zonas se pueden observar en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Ubicación geográfica y características climáticas de cuatro zonas cafetaleras de Costa Rica/1999.

<i>PROVENIENCIA DE CEPAS</i>	<i>DISTANCIA DEL CATIE (Km)</i>	<i>ALTITUD (m)</i>	<i>TIPO DE CULTIVO</i>
Tuis	16.5 al sur de Turrialba	650	Café orgánico
CATIE	-	640	Café orgánico
Pejibaye	21.0 al sureste de Turrialba	625	Café orgánico
Guayabo	19 al norte de Turrialba	700	Café orgánico

De las cuatro fincas descritas anteriormente, se tomaron muestras de hojas con pústulas de roya donde se observó el crecimiento blanco típico de *Verticillium* sp. (Alarcón y Carrión, 1994; Monzón, 1992; Carrión, 1988) y luego, se llevaron al laboratorio del CATIE donde se tomó una porción del micelio blanco observado sobre las pústulas de roya y se cultivó en cajas de petri con medio papa dextrosa agar acidificado (PDAA). En dichas cajas de petri creció un micelio blanco, característico de *Verticillium* sp. (Commonwealth Mycological Institute, 1979; Bigre, 1990). De esta manera se seleccionaron cuatro cepas, una por sitio (Cuadro 1) los cuales fueron utilizados para evaluar su capacidad como hiperparásito y su crecimiento en un fermentador artesanal.

3.3. Producción de conidias y clamidosporas de *Verticillium* sp. en el fermentador.

Como prueba preliminar, se inocularon las cepas de *Verticillium* sp. en el fermentador artesanal para probar la capacidad del hiperparásito de crecer en este sistema. Se utilizó el sustrato básico previamente usado para reproducción de otros hiperparásitos (Hebbar y Lumsden, 1999), constituido por 500 ml de agua destilada, 40g. de melaza (proveniente de Atirro, Turrialba) y 2.5g de levadura comercial para panificación (marca Fleischmann, Costa Rica). Se esterilizó dos veces en un autoclave a 121°C durante 45 minutos. Después de cada esterilización se dejó reposar el sustrato durante un período de 24 horas, para proceder con la inoculación después de la segunda esterilización en la siguiente manera.

Se preparó una solución de 0.5 ml de Tween 80 (detergente) por litro de agua destilada, y se autoclavó a 121°C durante 25 minutos. De esta solución se adicionó 25 ml a cada caja petri con el hongo crecido para realizar un raspado del micelio. La suspensión obtenida del raspado fue observada en un microscopio compuesto para calcular la concentración de conidias/ml a inocular en el fermentador, de tal manera que la concentración inicial dentro del fermentador fue en promedio entre 10^3 y 10^4 conidias/ml.

Una vez inoculado el sustrato, se colocó dos filtros desechables de 0.2 μm a los tubos del fermentador, uno al tubo de entrada de aire a través de un burbujeador eléctrico para pecera (de 5 a 10 galones de agua), y el otro al tubo de salida. La temperatura dentro del laboratorio fue entre 18 (noche) y 25°C (día) y con alternancia de 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

Se realizó una sola evaluación 15 días después de la inoculación, para determinar la concentración de conidias y clamidosporas en el sustrato para lo cual se realizó el conteo de dichas estructuras mediante un contómetro manual. Sin embargo, no se observaron clamidosporas por lo que este paso se realizó únicamente para conidias.

3.4. Evaluación de la producción de conidias y clamidosporas en el fermentador con diferentes concentraciones de melaza y uredosporas de roya.

Una vez comprobada la capacidad de producción de conidias de *Verticillium* sp en el fermentador artesanal, se procedió a determinar la cantidad de inóculo mínima necesaria de *Verticillium* sp para iniciar el proceso de fermentación. Se cultivó el hongo en platos petri con PDAA (papa agar dextrosa acidificado) durante una, dos y tres semanas y se inoculó en 12 fermentadores (ver 3.3). Se evaluó la concentración de conidias al cabo de 15 días, posteriormente se preparó una suspensión de conidias con cada crecimiento que se inoculó para determinar la concentración alcanzada hasta esa fecha. El mejor resultado fue el crecimiento de dos semanas el cual se utilizó en el trabajo siguiente.

De acuerdo a los resultados anteriores se estableció un bioensayo en tres etapas, donde se mezclaron diferentes concentraciones (Ver 3.4.1.) de melaza y uredosporas de roya en el fermentador para determinar en cuales de ellas se obtenía la mayor cantidad de conidias y clamidosporas del hongo. La metodología y preparación del fermentado fue descrita en el acápite 3.3.

3.4.1. Tratamientos.

Se realizaron 32 combinaciones, resultado del producto de cuatro cepas, cuatro concentraciones de melaza y dos dosis de uredosporas de roya; las dosis utilizadas fueron las siguientes:

a. Cuatro cepas de *Verticillium* sp.

Cepa 1: Proveniente de Tuis.

Cepa 2: Proveniente de CATIE.

Cepa 3: Proveniente de Pejibaye.

Cepa 4: Proveniente de Guayabo.

b. Cuatro dosis de melaza provenientes de Turrialba:

Dosis 1: 120 g/l de agua destilada (150%)

Dosis 2: 80 g/l de agua destilada (100%)

Dosis 3: 40 g/l de agua destilada (50%)

Dosis 4: 8 g/l de agua destilada (10%)

c. Adición de 25 ml de una suspensión de uredosporas de roya a una concentración de 1×10^4 uredosporas/ml, provenientes del café orgánico del CATIE y sin adición de éstas.

3.4.2. Diseño experimental.

El experimento tuvo un Diseño Completamente al Azar con tratamientos de arreglo factorial ($4 \times 4 \times 2$), dando como resultado 32 combinaciones con dos repeticiones. Sin embargo, debido a que la capacidad del laboratorio permitió utilizar un máximo de 16 fermentadores artesanales simultáneamente, fue necesario separar el experimento en dos grupos, cada grupo tuvo 16 fermentadores. Para reducir el riesgo de introducción de error entre los grupos, cada tratamiento se aleatorizó.

3.4.3. Modelo estadístico.

El modelo estadístico fue:

$$Y_{(ijk)} = \mu + A_{(i)} + B_{(j)} + C_{(k)} + AB_{(ij)} + AC_{(ik)} + BC_{(jk)} + ABC_{(ijk)} + E_{(ijk)}$$

donde:

$Y_{(ijk)}$ = variable aleatoria de respuesta

μ = media general

$A_{(i)}$ = efecto de la i -ésima cepa de *Verticillium* sp.

$B_{(j)}$ = efecto del j -ésimo nivel de melaza

$C_{(k)}$ = efecto del k -ésimo nivel de uredosporas de roya

$AB_{(ij)}$ = efecto de la interacción entre $A_{(i)}$ y $B_{(j)}$

$AC_{(ik)}$ = efecto de la interacción entre $A_{(i)}$ y $C_{(k)}$

$BC_{(j)k}$ = efecto de la interacción entre $B_{(j)}$ y $C_{(k)}$

$ABC_{(ijk)}$ = efecto de la interacción entre $A_{(i)}$, $B_{(j)}$ y $C_{(k)}$

$E_{(ijk)}$ = Error

3.4.4. Variables de respuesta.

Concentración de conidias y clamidosporas de *Verticillium* sp

3.4.5. Análisis de los resultados.

Con los datos obtenidos se construyeron 64 curvas de crecimiento (una por cada tratamiento y su repetición) con tendencia sigmoideal del tipo Gompertz de cuatro parámetros, mediante el programa Sigma Plot. La ecuación de la curva de crecimiento fue la siguiente:

$$Y = A + C * \exp(-\exp(-B * (X - M)))$$

Donde:

Y = Concentración de conidias/ml.

A = Nivel inicial de conidias/ml.

C = Nivel final de conidias/ml.

X = Tiempo (días).

M = Es el tiempo (días) del punto de inflexión.

B = Es una medida de la pendiente en el punto de inflexión.

Los parámetros evaluados fueron: Nivel final de conidias (C), tiempo (días) del punto de inflexión (M) y la pendiente en el punto de inflexión (B)¹. El nivel inicial de conidias fue en promedio entre 10^3 y 10^4 conidias/ml, pero se determinó como cero ($A=0$) debido a que una concentración menor de 1×10^4 conidias/ml no se detecta con el contómetro. Los parámetros se analizaron mediante Análisis de Varianza para estimar si ellos difirieron en las curvas construidas 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.

¹ Es importante tomar en cuenta que el parámetro B es una medida de la pendiente en el punto de inflexión y no la pendiente

3.5. Evaluación de la capacidad hiperparasítica de cuatro cepas de *Verticillium* sp. sobre pústulas de *Hemileia vastarix* Berk. & Br.

Se evaluó la acción hiperparasítica de cepas del hongo *Verticillium* sp. de las cuatro zonas cafetaleras de Costa Rica. Se utilizaron 30 plantas uniformes de café de la variedad Caturra de 14 meses de edad obtenidas y cultivadas en el invernadero de CATIE en macetas de 10 Kg. Las plantas se expusieron a inóculo natural de roya en una parcela de café orgánico de CATIE.

Cuando se observaron las primeras lesiones de roya en las plantas de café en el cafetal afectado con roya, se trasladaron a un área sombreada (81.77% de sombra de *Inga* sp.) separadas a 60 cm de distancia entre sí. Con la ayuda de un aspersor manual se hicieron 3 aspersiones (una cada 15 días) de cinco mezclas de cepas de *Verticillium* sp., de acuerdo al diseño del experimento (3.5.2) a una concentración de 1×10^6 conidias/ml. La primera aspersión se realizó el 25 de julio y las otras dos fueron el 9 y el 24 de agosto. Se usaron cinco plantas por tratamiento, incluyendo el testigo absoluto (Tratamiento 6). En cada planta se seleccionaron cinco hojas al azar que presentaban por lo menos una lesión clorótica pequeña (estado inicial de la enfermedad) para evaluar la incidencia del hiperparásito.

En las 5 hojas seleccionadas en cada planta, se evaluó cuántas de ellas presentaron al menos una pústula de roya hiperparasitada por *Verticillium* sp. y el número total de pústulas con y sin el hiperparásito por hoja. La evaluación se realizó cada cinco días a partir del quinto día después de la aplicación de *Verticillium* sp. (Monzón, 1992) por un periodo de 40 días.

3.5.1. Diseño de tratamientos.

El diseño de tratamientos que se realizó fue el de elementos faltantes (la ley del mínimo) con 6 tratamientos para 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.

Los tratamientos fueron los siguientes:

- Tratamiento 1 (T1): mezcla de cepas proveniente de Tuis, CATIE y Pejibaye.
- Tratamiento 2 (T2): mezcla de cepas proveniente de Tuis, CATIE y Guayabo.

- Tratamiento 3 (T3): mezcla de cepas proveniente de Tuis, Pejibaye y Guayabo.
- Tratamiento 4 (T4): mezcla de cepas proveniente de CATIE, Pejibaye y Guayabo.
- Tratamiento 5 (T5): aplicación de mezcla de las cuatro cepas.
- Tratamiento 6 (T6): plantas con infección natural de roya sin hiperparásito.

3.5.2. Diseño experimental.

Se empleó un Diseño de Bloques al Azar con cinco repeticiones por cada tratamiento, con parcelas subdivididas en el tiempo.

3.5.3. Modelo estadístico.

El modelo estadístico fué:

$$Y_{(ijk)} = \mu + T_{(i)} + B_{(j)} + TB_{(ij)} + P_{(k)} + TP_{(ik)} + E_{(ijk)}$$

donde:

$Y_{(ijk)}$ = variable de respuesta que representa la k-ésima observación bajo el tratamiento i-ésimo.

μ = media general.

$T_{(i)}$ = efecto del i-ésimo tratamiento.

$B_{(j)}$ = efecto del j-ésimo bloque.

$TB_{(ij)}$ = efecto de la interacción entre $T_{(i)}$ y $B_{(j)}$

$P_{(k)}$ = efecto del tiempo de evaluación $t = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$

$TP_{(ik)}$ = efecto del i-ésimo tratamiento en el tiempo t.

$E_{(ijk)}$ = Error.

3.5.4. Variables de respuesta.

Se evaluó:

- Número de hojas con roya (NHR)
- Número de hojas con roya y *Verticillium* sp. (NHRV)

- Número de pústulas (NP)
- Número de pústulas hiperparasitadas (NPV)

Con esto se calculó el desarrollo de la enfermedad, la incidencia de *Verticillium* sp. en hojas con pústulas y la incidencia en pústulas, mediante las siguientes ecuaciones (Monzón, 1992):

- | | |
|------------------------------------|-----------------|
| • Desarrollo de la enfermedad: | $DE = NP$ |
| • Incidencia en hojas con pústulas | $PV = NHRV/NHR$ |
| • Incidencia en pústulas | $IV = NPV/NP$ |

3.5.5. Análisis de los resultados.

Los datos obtenidos se analizaron mediante Análisis de Varianza para estimar si hubo diferencias significativas entre tratamientos y la prueba de Tukey para separar las diferencias de medias de los tratamientos evaluados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Efecto de diferentes concentraciones de melaza y uredosporas de roya en el fermentador sobre la concentración de conidias y clamidosporas de *Verticillium* sp.

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

Los resultados de la evaluación de la concentración de conidias al cabo de 15 días, utilizando cepas con crecimientos de una, dos y tres semanas se presentan en la Figura 5. donde se observa que el crecimiento de una semana resultó en este sentido el menos indicado, puesto que se alcanzaron concentraciones menores de 1×10^6 conidias/ml, correspondiente a las cepas de CATIE, Guayabo y Tuis; la cepa de Pejibaye resultó aun menos favorecida con este crecimiento, pues únicamente alcanzó un nivel máximo de 2.5×10^3 conidias/ml.

Las mayores concentraciones finales de conidias/ml obtenidas en el fermentador se lograron cuando se utilizaron crecimientos de dos y tres semanas las cuales fueron de 1.415×10^8 conidias/ml (en dos semanas) y 2.5925×10^8 conidias/ml (en tres semanas) correspondientes a la cepa de Tuis.

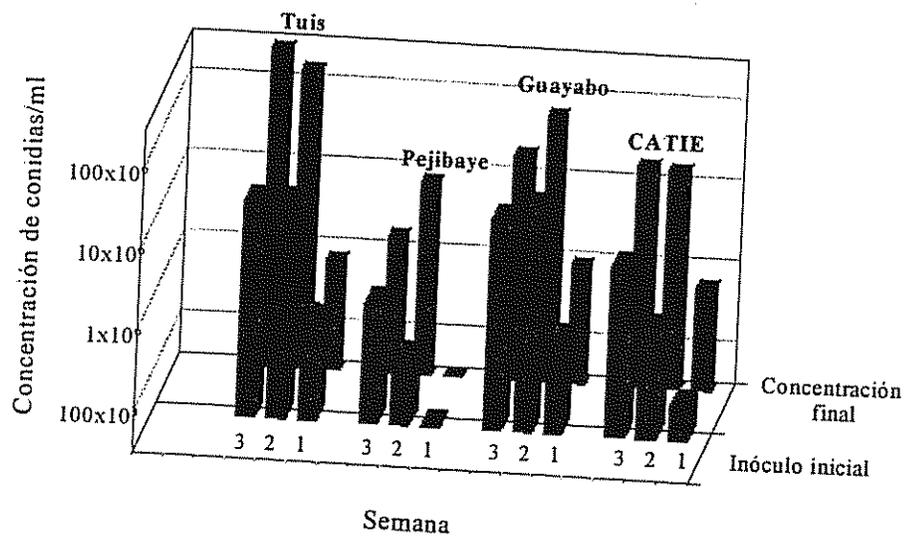


Figura 5. Concentración de conidias de cuatro cepas de *Verticillium* sp. obtenidas en fermentadores artesanales durante un periodo de 15 días, inoculadas con una suspensión de conidias de cultivos puros de una, dos y tres semanas.

Dado que los crecimientos de dos semanas y tres semanas permitieron alcanzar concentraciones para la cepa de Pejibaye arriba de 1×10^6 conidias/ml, para las cepas de CATIE y Guayabo arriba de 1×10^7 conidias/ml y para la cepa de Tuis más de 1×10^8 conidias/ml, la elección entre los dos crecimientos para iniciar el proceso de fermentación recayó en el de dos semanas, pues permite reducir el tiempo de producción del inóculo.

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

Con base a estudios realizados con *Trichoderma* spp. donde se reprodujo en forma masiva clamidosporas y conidias en un medio a base de melaza (Hebbar y Lumsden, 1999; Lewis y Papavizas, 1983) en la metodología se planteó la evaluación de clamidosporas, sin embargo, a lo largo del proceso, ninguna de las cepas produjo clamidosporas por lo que se podría suponer que las cepas corresponden a *Verticillium lecanii* que de acuerdo a Commonwealth Mycological Institute (1979) no presenta clamidosporas. El análisis se basó únicamente en la evaluación de la concentración de conidias.

Las curvas de concentración de conidias obtenidas en los 32 tratamientos (interacción de cuatro cepas de *Verticillium* sp. con cuatro dosis de melaza, en presencia y ausencia de uredosporas de roya) se presentan en las Figuras 6, 7, 8 y 9 (cepas CATIE, Guayabo, Pejibaye y Tuis respectivamente). Se pudo observar en ellas una tendencia sigmoideal del tipo Gompertz de cuatro parámetros característico de curvas de crecimiento biológico (Krauss, comunicación personal, 2000). Es decir, que la concentración de conidias ascendió rápidamente a medida existían nutrientes en el sustrato dentro del fermentador, pero en la manera en que éstos se fueron agotando, la concentración se estabilizó y no manifestó mayor incremento. Los niveles de significancia que presentaron las curvas oscilaron entre 58.76 y 98.32%.

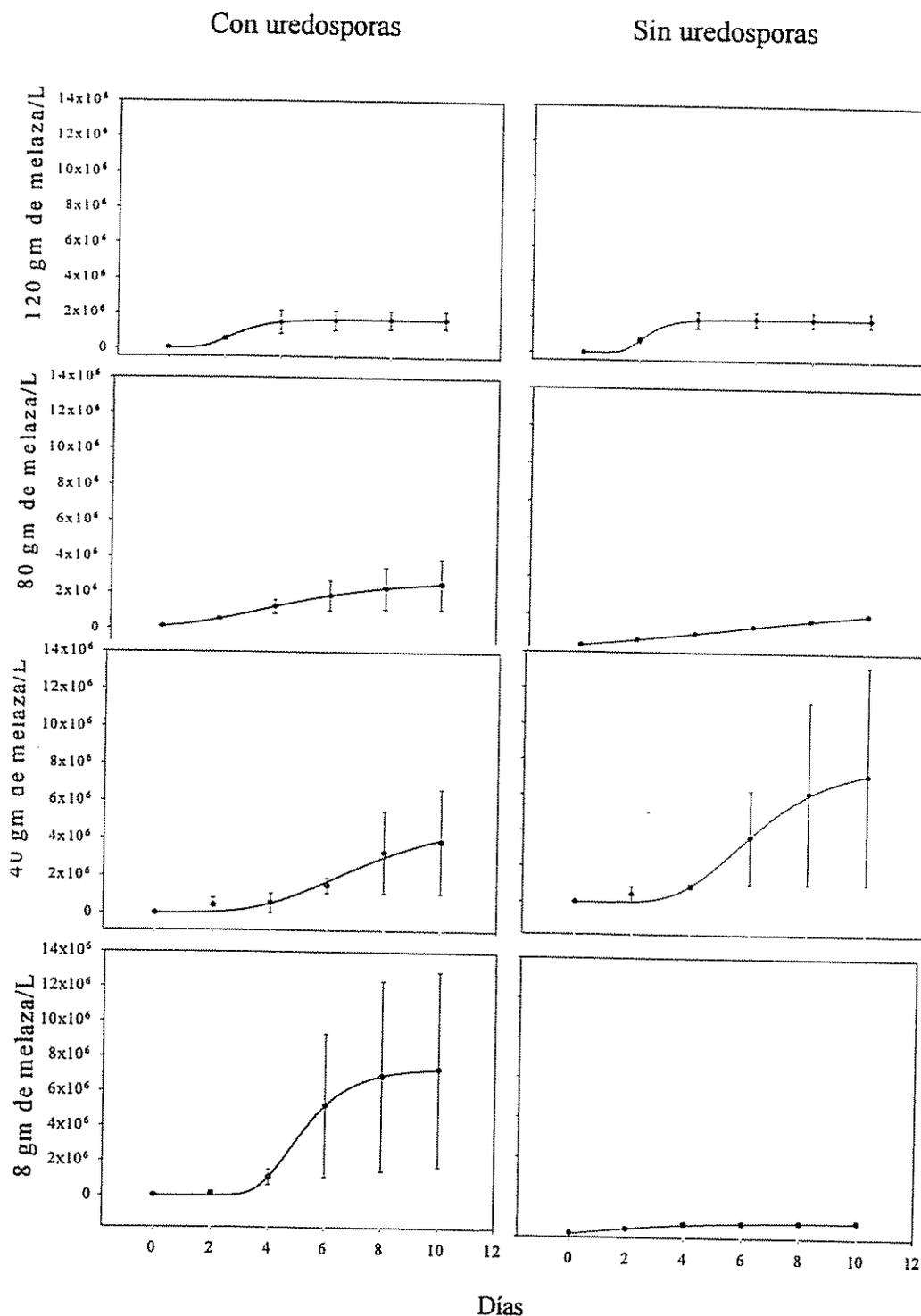


Figura 6. Concentración de conidias/ml de la cepa de CATIE obtenidas en fermentadores artesanales con cuatro dosis de melaza y en presencia y ausencia de uredosporas de roya, durante un periodo de 10 días.

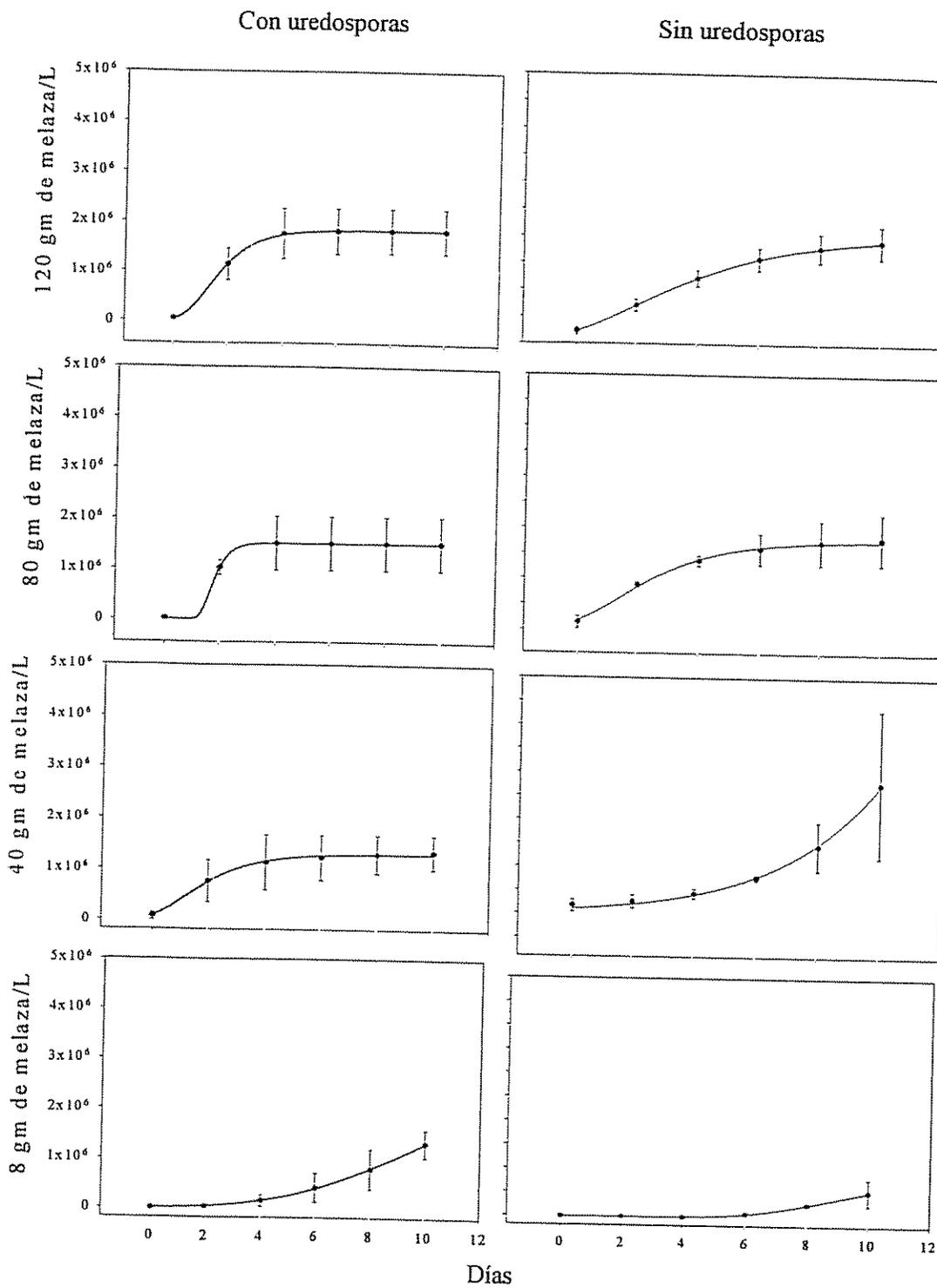


Figura 7. Concentración de conidias de la cepa de Guayabo obtenidas en fermentadores artesanales con cuatro dosis de melaza y en presencia de ausencia de uredosporas de roya durante un periodo de 10 días.

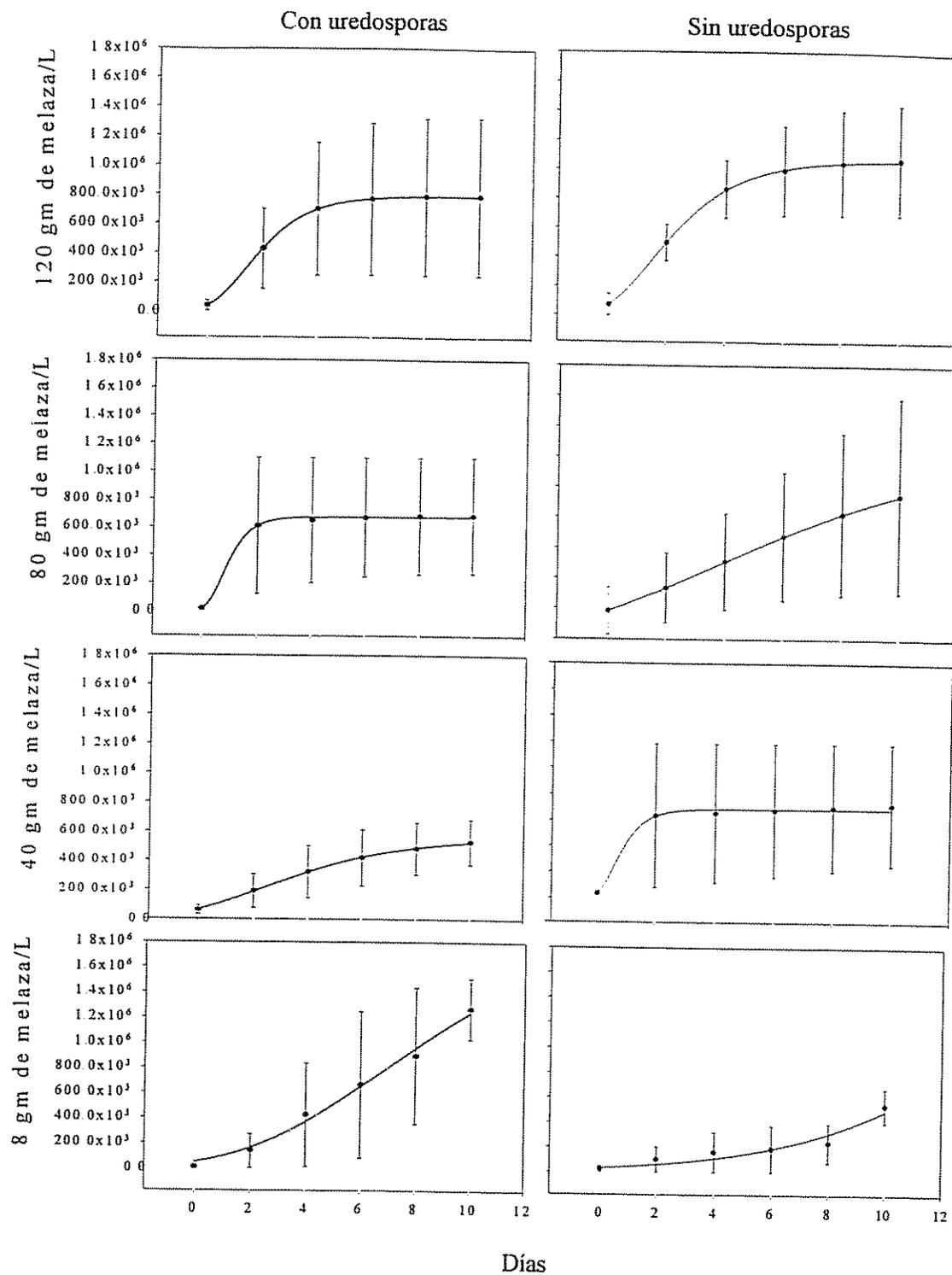


Figura 8. Concentración de conidias/ml de la cepa de Pejibaye obtenidas en fermentadores artesanales con cuatro dosis de melaza y en presencia y ausencia de uredosporas de roya durante un periodo de 10 días

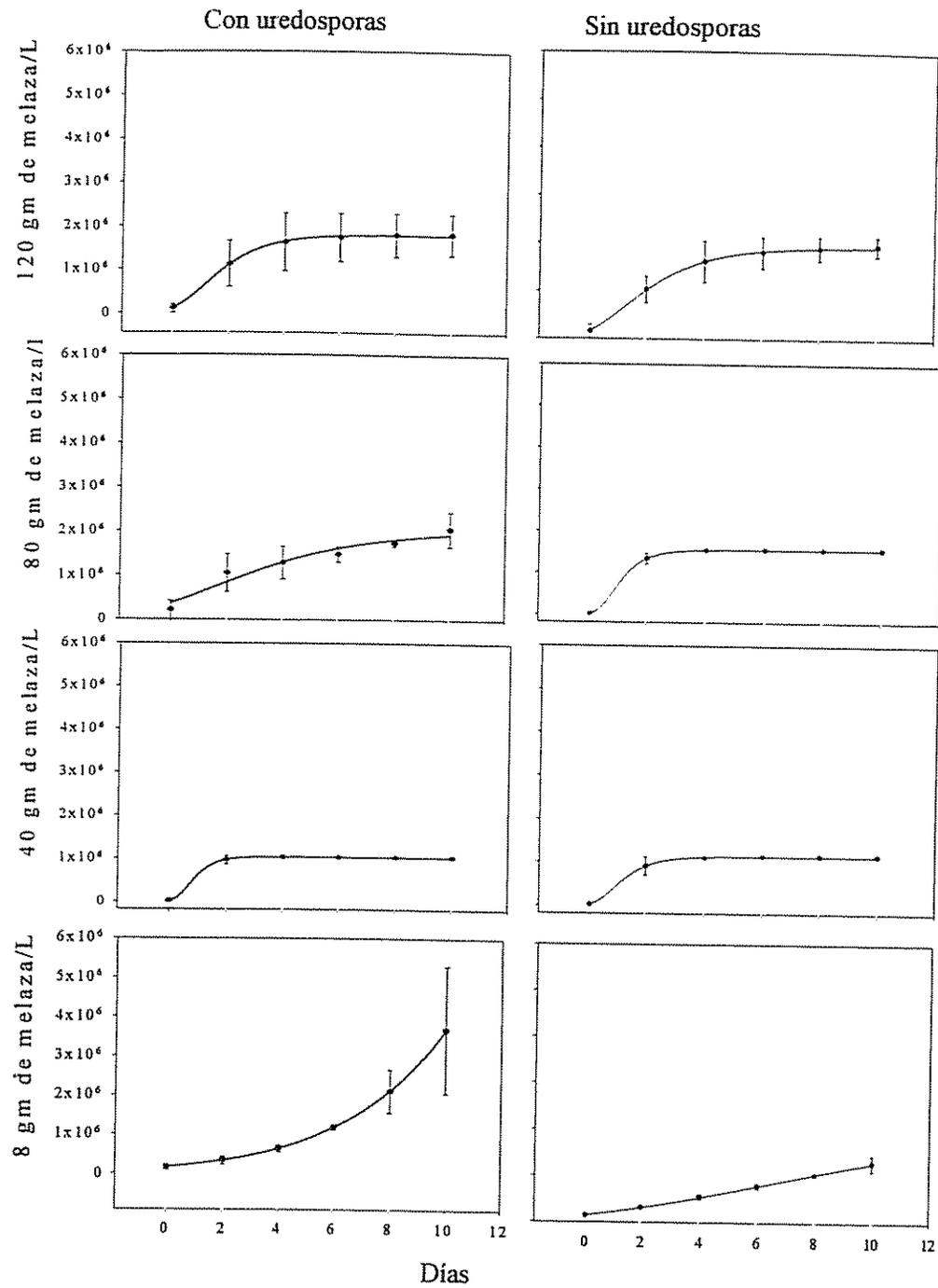


Figura 9. Concentración de conidias/ml de la cepa de Tuis obtenidas en fermentadores artesanales con cuatro dosis de melaza y en presencia y ausencia de uredosporas de roya durante un periodo de 10 días.

Dado que las curvas de la concentración de conidias en todos los tratamientos presentaron la misma tendencia, se evaluó el efecto que tuvieron los factores melaza y uredosporas de roya en dicha concentración mediante los análisis de varianza de los parámetros que componen la ecuación de las mismas para cada una de las cepas.

4.1.3. Parámetros de la curva Gompertz.

4.1.3.1. Nivel inicial de conidias.

Como se explicó en la parte metodológica, el nivel inicial de conidias se estimó como cero para todas las cepas y por tal razón no se realizó ningún tipo de análisis estadístico.

4.1.3.2. Nivel final de conidias.

La prueba de normalidad en el análisis de varianza del nivel final de conidias, el cual indicó problema de homogeneidad (W: Normal 0.329), por lo que se decidió realizar el análisis de varianza con los datos transformados (Log Y) (W: Normal 0.953) (Anexo 2), el cual indicó diferencias significativas entre las diferentes cepas evaluadas ($P=0.0029$), entre las dosis de melaza ($P=0.0277$), la interacción entre las cepas con las diferentes dosis de melaza ($P=0.0077$), así como también en la interacción de las cepas con uredosporas de roya ($P=0.0381$). 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 y esta diferencia pudo deberse al efecto de la melaza o por 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 hizo un análisis en forma general de ese factor y luego se analizaron los factores melaza y uredosporas de roya para cada una de las cepas en forma independiente.

Por medio de la separación de medias, mediante la prueba de Tukey (Cuadro 2), 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). 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.

Cuadro 2. Separación de medias del nivel final de conidias/ml mediante la prueba de Tukey con datos no transformados (Media) y datos transformados (Media t) para cuatro cepas de *Verticillium* sp.

<i>CEPA</i>	<i>Media</i>	<i>Media t</i>	<i>N</i>
Guayabo	5.45×10^9	16.14 a	16
Tuis	1.06×10^9	15.18 ab	16
CATIE	3.73×10^6	14.71 ab	16
Pejibaye	2.27×10^6	13.77 b	16

$t = \log(Y)$

N = número de observaciones.

$\alpha = 0.05$, datos con la misma letra no difieren significativamente

Cepa de CATIE.

La cepa de CATIE no presentó diferencias significativas por efecto de la melaza ($P=0.852$) ni la presencia o ausencia de uredosporas de roya ($P=0.738$) (Anexo 3). En el nivel final de conidias (datos transformados, Log Y) no mostró ninguna interacción ($P=0.517$) entre las diferentes dosis de melaza y la presencia o ausencia de uredosporas de roya. Es decir, que con cualquier dosis de melaza que se empleó en este estudio para la producción de conidias de esta cepa, no se aumentó ni se disminuyó dicha producción, y del mismo modo, no afectó la adición de uredosporas de roya; siempre se obtuvo un nivel final de conidias similar.

Cepa de Guayabo.

El análisis de varianza del nivel final de conidias (datos transformados, Log Y) (Anexo 4) para esta cepa indicó que tanto la melaza como la presencia o ausencia de uredosporas fueron significativos ($P= 0.0097$ y $P=0.0281$, respectivamente). Además, la interacción de la concentración de melaza con la presencia o ausencia de uredosporas de roya fue significativa ($P=0.0042$). La significancia de los factores sugiere que hubo sensibilidad por parte de dicha cepa ante las diferentes dosis de melaza empleadas y ante la presencia o ausencia de uredosporas de roya. La significancia de la interacción indica que la cepa de Guayabo reaccionó en forma diversa ante las distintas concentraciones de melaza dependiendo si hay uredosporas de roya o no en el medio.

Así, 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 al resto de combinaciones y fue a su vez, en la que se observó el mayor nivel final de conidias estimada (4.32×10^{10} conidias/ml) (Cuadro 3). Esta diferencia se puede considerar muy pronunciada, pues con ninguna otra combinación de factores se obtuvo una concentración tan alta.

Cuadro 3. Separación de medias del nivel final de conidias/ml mediante la prueba de Tukey con datos no transformados y datos transformados ($t = \text{Log} Y$) para la cepa de Guayabo.

Uredosporas	DOSIS DE MELAZA			
	M1(120g/l)	M2(80g/l)	M3(40g/l)	M4(8g/l)
Con	1.8084×10^6	1.5093×10^6	1.3945×10^6	3.4599×10^8
	14.3768 t b	14.1619 t b	14.1278 t b	17.4905 t b
Sin	2.0284×10^6	1.863×10^6	4.3248×10^{10}	1.5406×10^7
	14.5072 t b	14.3896 t b	24.1138 t a	15.9569 t b

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

Cepa de Pejibaye

El análisis de varianza del nivel final de conidias (datos transformados, $\text{Log} Y$) (Anexo 5) para la cepa de Pejibaye indicó que no existen diferencias significativas entre las diferentes dosis de melaza ($P=0.438$) ni con la presencia y ausencia de uredosporas de roya ($P=0.761$). La interacción de los dos factores tampoco fue significativa ($P=0.365$). Dicho resultado manifestó que niveles altos o bajos de melaza y la presencia o ausencia de uredosporas ni estimularon ni inhibieron la concentración final de conidias.

Cepa de Tuis.

El análisis de varianza del nivel final de conidias (datos transformados, Log Y) (Anexo 6) mostró que el factor melaza así como también el factor uredosporas de roya no resultaron significativos ($P=0.161$ y $P=0.33$, respectivamente). Del mismo modo, la interacción de ambos factores no fue significativa ($P=0.444$), esto significa que la cepa de Pejibaye no reaccionó diferente ante las distintas dosis de melaza empleadas independientemente si hay o no uredosporas de roya en el medio.

Es importante anotar que la concentración de conidas/ml alcanzada por las cepas de Guayabo y Tuis, hasta la fecha no se había logrado obtener una concentración similar en medio líquido. Únicamente se había reportado hasta un máximo de 10^5 conidias/ml en caldo Sabouraud dextrosa (Vélez y Rosillo, 1995). Se podría considerar entonces el medio constituido a base de melaza como muy prometedor para la reproducción de este tipo de hiperparásito. En un estudio realizado por Lewis y Papavizas (1983) se logró reproducir *Trichoderma* spp. en tres medios líquidos: uno a base de melaza de maíz, otro de nitrato de sucrosa y el último a base de tartrato de glucosa y se obtuvo tanto clamidosporas (10^8 g⁻¹ peso seco de micelio) como conidias. En ese mismo estudio se determinó que el medio a base de melaza de maíz fue superior a los de nitrato de sucrosa y tartrato de glucosa. En el presente estudio, aunque se utilizó melaza de caña y no de maíz, evidentemente dicho medio favoreció la producción de conidias de estos tipos de hiperparásitos. En otro estudio realizado por Hebbar y Lamsden en 1999, en el que se utilizó un fermentador artesanal y se empleó la misma cantidad de melaza de caña que la dosis dos del presente estudio (80 g/l), se logró producir 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.

No obstante, estos hiperparásitos (*Trichoderma* spp. y *Verticillium* sp.) del orden Moniliales (Subramanian, 1983) han mostrado ser favorecidos por la melaza en la producción de conidias, puede ser prematuro afirmar que los medios a base de melaza sean ideales para la reproducción masiva de Moniliales en forma generalizada.

Con respecto a la combinación de las diferentes dosis de melaza con uredosporas presentes o ausentes, la ideal para la reproducción masiva de conidias de las cepas de CATIE, Pejibaye y Tuis resultó aquella donde la melaza fue mínima (8 g/l) y uredosporas ausentes por la razón de que

siempre se obtuvo un nivel final de conidias similar que cuando se utilizaron dosis mayores y uredosporas presentes. La combinación de factores descrita también resulta beneficiosa por el hecho de que se utiliza menos material (menos melaza) para preparar el sustrato y se evita el tener que coleccionar la roya en el campo para adicionarla al medio.

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

Es importante tomar en cuenta que la relación dosis-efecto en sistemas biológicos normalmente es logarítmica. Es decir, 10 veces la dosis, es doble el efecto; 100 veces la dosis, es tres veces el efecto. En este sentido, el rango de dosis de melaza (el cual fue lineal) seguramente no fue significativamente grande como para ser medible. Ese fenómeno posiblemente contribuyó a que la cepa de Guayabo presentara valores extremos.

4.1.3.3. Tiempo en días del punto de inflexión.

El análisis de varianza del tiempo (días) del punto de inflexión (Anexo 7), indicó que existen diferencias significativas 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) ($P=0.0049$). Es decir, que algunas cepas demoraron más tiempo para llegar al punto de inflexión en el experimento, mientras que otras lo alcanzaron en un tiempo más corto y esta rapidez o lentitud se debió al efecto combinado de las cepas con la melaza y con las uredosporas de roya o en ausencia de las mismas. Por lo tanto, como en el caso anterior (concentración final de conidias) se tomó la decisión de realizar un análisis primero con el factor cepa en forma generalizada y después analizar la interacción de la concentración de melaza con la presencia o ausencia de uredosporas para cada cepa en forma individual.

En este sentido, la separación de medias del tiempo (días) del punto de inflexión mediante la prueba de Tukey (Cuadro 4), 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 demoró mucho más tiempo estimado para llegar al punto de inflexión. La cepa de Tuis demoró 10.2 días al 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 demoraron un tiempo similar para llegar al punto de inflexión.

Cuadro 4. Separación de medias del tiempo (días) del punto de inflexión mediante la prueba de Tukey para cuatro cepas de *Verticillium* sp

<i>CEPA</i>	<i>Media</i>	<i>N</i>
Guayabo	19.6 a	16
Tuis	10.2 ab	16
Pejibaye	3.9 b	16
CATIE	3.4 b	16

N = número de observaciones

$\alpha = 0.05$, datos con la misma letra no difieren significativamente

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.

Cepa de CATIE.

El análisis de varianza del tiempo (días) del punto de inflexión (Anexo 8) indicó que el factor melaza no fue significativo ($P=0.458$) como tampoco lo fue el factor uredosporas de roya ($P=0.973$). Tampoco la interacción de la concentración de melaza con la presencia o ausencia de uredosporas fue significativa ($P=0.594$). Es decir que dicha cepa demoró igual tiempo 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 y el tiempo promedio para alcanzar dicho punto fue de 3.4 días.

Cepa de Guayabo.

El análisis de varianza del tiempo (días) del punto de inflexión (Anexo 9) 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 si fue significativa ($P=0.0251$), lo cual indica que existió un comportamiento diferente de la cepa ante las distintas dosis de melaza dependiendo de si hubo o no uredosporas presentes en el medio.

Fue así que con la separación de medias del tiempo (días) del punto de inflexión por Tukey (Cuadro 5) para la interacción de las diferentes dosis de melaza y la presencia y ausencia de uredosporas de roya, se determinó 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. Los demás puntos de inflexión no mostraron diferencias significativas en términos del tiempo.

Cuadro 5. Separación de medias del tiempo (días) del punto de inflexión mediante la prueba de Tukey para la cepa de Guayabo.

Uredosporas	DOSIS DE MELAZA			
	M1(120g/l)	M2(80g/l)	M3(40g/l)	M4(8g/l)
Con	1.5123 b	1.3174 b	2.1361 b	21.6527 b
Sin	2.1417 b	1.6374 b	118.2914 a	8.368 b

$\alpha = 0.05$, datos con la misma letra no difieren significativamente

Cepa de Pejibaye.

En el análisis de varianza del tiempo (días) del punto de inflexión (Anexo 10) se pudo observar que tanto el factor melaza como el factor uredosporas de roya no fueron significativos ($P= 0.3098$ y $P=0.836$, respectivamente), lo mismo ocurrió en la interacción de los dos factores pues no se observó diferencia significativa ($P=0.758$). Esto sugiere que el punto de inflexión (3.9 días) se pudo obtener en tiempos similares independientemente de la dosis de melaza empleada y de la presencia o ausencia de uredosporas de roya.

Cepa de Tuis.

En el caso de la cepa de Tuis ni el factor melaza ($P=0.247$) ni uredosporas ($P=0.25$) fueron significativos (Anexo 11) para el tiempo (días) del punto de inflexión. De la misma manera, la interacción de ambos factores no resultó significativa ($P=0.682$). Es así como se observó, al igual que las cepas de CATIE y Pejibaye, la insensibilidad al aumento o disminución de la melaza y a la presencia o ausencia de uredosporas de roya en el sustrato. Esta cepa puede producirse con el nivel más bajo de melaza y sin adicionar uredosporas de roya al medio y llegar al punto de inflexión en un tiempo promedio de 10.2 días.

De los resultados anteriores se puede resumir que, la mejor dosis de melaza para reproducir las cepas de CATIE, Pejibaye y Tuis fue la más baja (8 g/l) y que a su vez no se adicionó uredosporas, pues no se aceleró el tiempo para alcanzar el punto de inflexión al tener mayores dosis de melaza, ni al adicionar uredosporas, tal como ocurrió cuando se analizó el nivel final de conidias para cada cepa. Del mismo modo, únicamente la cepa de Guayabo reveló un tiempo del punto de inflexión extremadamente alto (118.3 días) cuando interactuaron la dosis de melaza de 40 g/l sin uredosporas. Podría ser que ese valor resulte del hecho de tener pocas repeticiones en el ensayo (solo dos) y demasiada variación en los datos observados para esa combinación de factores, pues en las otras combinaciones, los resultados no estuvieron tan lejos de la realidad.

Dado que para la cepa de Guayabo fue el mismo tratamiento (dosis de melaza de 40 g/l sin uredosporas) el que resultó con valores extremos tanto para el nivel final de conidias/ml como para el tiempo (días) del punto de inflexión (ver Anexo 12), habría que considerar un periodo de observación más prolongado para obtener estimados más adecuados para ambos parámetros de esa cepa.

4.1.3.4. Medida de la pendiente en el punto de inflexión.

El análisis de varianza del parámetro B, que es una medida de la pendiente en el punto de inflexión (Anexo 13), demostró que no existen diferencias significativas entre las cepas estudiadas ($P=0.996$), ni entre la interacción de las mismas con las dosis de melaza ($P=0.685$) ni con la presencia y ausencia de uredosporas de roya ($P=0.645$). 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 también de la presencia o ausencia de uredosporas de roya.

De acuerdo a este parámetro también se puede concluir que es más conveniente utilizar la menor dosis de melaza sin uredosporas para las cepas de CATIE, Pejibaye y Tuis porque el crecimiento en ellas se da a una tasa acelerada independientemente de la combinación de factores que se emplee. En el caso de la cepa de Guayabo, si bien la tasa de crecimiento no reaccionó diferente ante las diversas dosis de melaza y la presencia o ausencia de uredosporas de roya, no puede establecerse que la menor dosis de melaza y en ausencia de uredosporas de roya resulte la mejor elección para su reproducción masiva en el futuro, debido a los valores extremos que ha presentado en los otros parámetros estudiados (nivel final de conidias y tiempo (días) del punto de inflexión). Por lo tanto es necesario hacer más estudios con tiempos de observación más prolongados para poder hacer en forma acertada la elección de la mejor combinación de los dos factores (melaza y uredosporas) para esa cepa.

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 periodo, este resultado difiere con lo reportado por los autores Da Silva y Ferraz (1978), quienes observaron mayor producción de conidias de *Verticillium hemileiae* al adicionar al medio en que lo cultivaron uredosporas de roya. Dicha adición tampoco aceleró ni el tiempo del punto de inflexión ni la tasa de crecimiento en el presente estudio.

4.2. Evaluación del efecto hiperparasítico de cuatro cepas de *Verticillium* sp. sobre *Hemileia vastatrix* Berk. & Br.

4.2.1. Desarrollo de la enfermedad.

De acuerdo a la metodología propuesta, plantas de café sanas se expusieron al inóculo natural de roya desde el mes de diciembre, con base a información (Samayoa, 1999) donde se observó picos de severidad en los meses de febrero. Sin embargo variaciones en el clima, principalmente la alta precipitación (Anexos 14-16), en las que se observó unos periodos de mucha lluvia, impidió el desarrollo de la enfermedad en el tiempo especulado. No fue sino a partir de julio que se observaron las primeras pústulas de roya por lo que la inoculación de *Verticillium* sp. y evaluaciones de su efecto se iniciaron en ese mismo mes.

El desarrollo de la enfermedad presentó un comportamiento típico de las enfermedades de ciclo múltiple (caso de la roya del café) (Figura 10), en las que al inicio se observa un incremento lento, pero 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 (González, 1976; Castaño-Zapata, 1994).

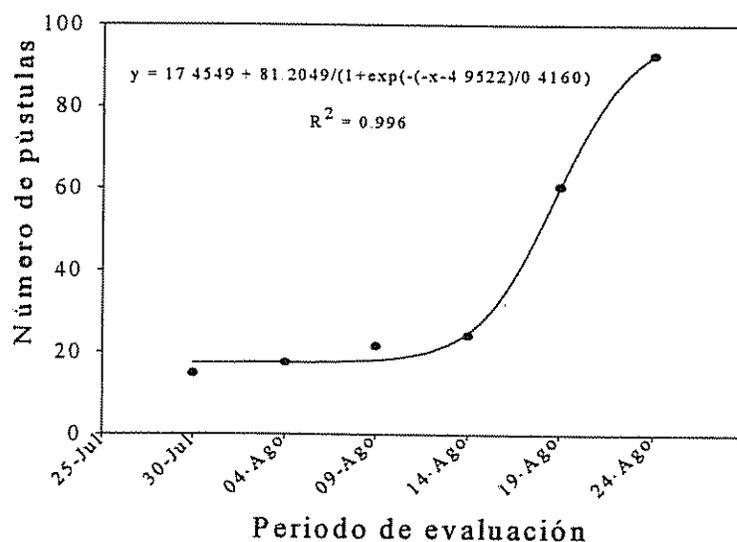


Figura 10. Desarrollo de la enfermedad en las hojas evaluadas durante el periodo 30 de julio a 24 de agosto de 2000.

No fue posible continuar con las evaluaciones después del 29 de agosto debido a que la enfermedad experimentó un incremento y las pústulas coalescieron, lo que provocó la caída de hojas entre ellas algunas de las que eran evaluadas.

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 (Cadena, 1982) y como puede observarse en el Anexo 5, la temperatura promedio durante el estudio fue entre 22 y 22.5 °C (mes de julio y agosto respectivamente). La densidad de sombra reportada fue de 81.77% lo que pudo también favorecer el incremento de la enfermedad, ya que es una condición propicia para su desarrollo (Cadena-Gómez, 1982). Además, el incremento de la enfermedad es más rápido en períodos que presentan una alternancia entre días lluviosos y días soleados (Cadena-Gómez, 1982) y dicha alternancia se presentó durante el tiempo de estudio como se puede apreciar en los Anexos 19 y 20, dicha condición propició la germinación de las uredosporas con el consecuente incremento en el número de pústulas por hoja en el experimento.

4.2.2. Actividad hiperparasítica.

El efecto hiperparasítico de *Verticillium* sp. se evaluó primeramente, como la incidencia de dicho hiperparásito en el total de hojas seleccionadas afectadas por roya (cinco hojas por planta) al inicio del ensayo. En segundo lugar, se evaluó la incidencia de *Verticillium* sp. en el total de pústulas presentes en las 5 hojas seleccionadas. El objeto de haber hecho estos dos tipos de evaluaciones fue para determinar en que grado *Verticillium* sp. se distribuye en las pústulas de la misma hoja y en las pústulas del resto de las hojas dentro de la misma planta.

Incidencia en hojas con pústulas.

De acuerdo al análisis de varianza de la incidencia de *Verticillium* sp. en hojas con pústulas (Anexo 18), se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P=0.0002$) y en los tratamientos *vs.* evaluaciones ($P=0.0001$).

Este resultado indica que, estadísticamente, hubo tratamientos con los que se logró un mayor nivel de hiperparasitismo en todas las hojas con pústulas de roya evaluadas o al menos en la mayoría de

ellas, mientras que otros seguramente solo hicieron efecto en pocas hojas y a medida transcurrió el tiempo, el número de hojas con pústulas hiperparasitadas fue incrementándose.

Con base a la separación de medias según Tukey (Cuadro 6) de la incidencia de *Verticillium* sp. en hojas con pústulas, los tratamientos 1, 5 y 6 fueron similares. Estos mismos tratamientos fueron estadísticamente diferentes con el tratamiento 4, mientras que los tratamientos 2 y 3 se mantuvieron en un nivel intermedio.

Cuadro 6. Separación de medias de la incidencia (%) de *Verticillium* sp. en hojas con al menos una pústula durante un periodo comprendido entre el 30 de julio y el 29 de agosto de 2000.

<i>Mezcla 1</i> (Tuis, CATIE, Pejibaye)	<i>Mezcla 2</i> (Tuis, CATIE, Guayabo)	<i>Mezcla 3</i> (Tuis, Pejibaye, Guayabo)	<i>Mezcla 4</i> (CATIE,Pejibaye, Guayabo)	<i>Mezcla 5</i> (Tuis, CATIE, Pejibaye, Guayabo)	<i>Testigo</i>
30.04 a	27 ab	23.5 ab	18.88 b	32.4 a	28.7 a

En la Figura 11 se observa la incidencia de *Verticillium* sp. en las hojas con pústulas para cada uno de los tratamientos aplicados. En las primeras tres evaluaciones no se encontró ninguna hoja con pústulas hiperparasitadas, por lo que la incidencia fue de 0% en los tres casos. La ausencia de pústulas hiperparasitadas en este periodo se pudo deber al hecho que después de la primera aplicación de los tratamientos (25 de julio) se presentó un periodo de lluvia que cesó hasta el día 31 del mismo mes (ver Anexo 19), lo que pudo haber afectado las aplicaciones al perderse las conidias por el efecto de la lluvia en las hojas tratadas. Sin embargo, para la segunda aplicación (9 de agosto) el nivel de lluvias fue menor (ver Anexo 20) lo que pudo permitir el desarrollo del hiperparásito hasta el momento de realizar la cuarta evaluación, 14 de agosto, en la cual se notó la presencia del mismo

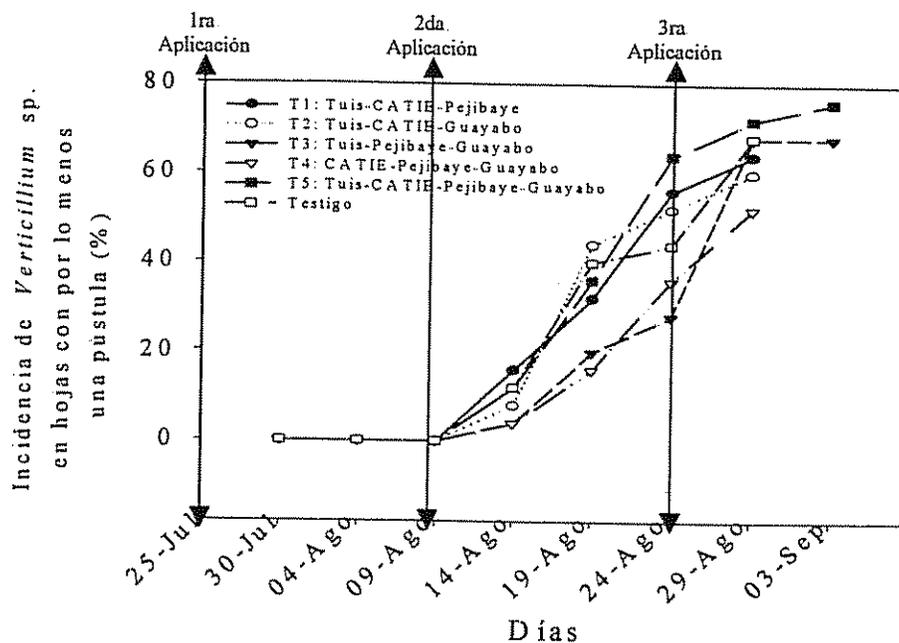


Figura 11. Incidencia de *Verticillium* sp. en hojas con roya durante el período comprendido entre el 30 de julio al 3 de setiembre de 2000.

Se pudo notar que la incidencia en las hojas con pústulas fue ascendiendo y ya para la tercera aplicación (24 de Agosto) más del 50% de las hojas evaluadas presentaron pústulas parasitadas, a excepción de las hojas a las que se les aplicó los tratamientos 3 y 4, los cuáles presentaron unas incidencias de 28 y 36% respectivamente.

Para la evaluación del 29 de agosto la mayor incidencia de *Verticillium* sp. en hojas con pústulas la presentó el tratamiento 5 con un valor del 72% y la menor, el tratamiento 4 con un 52%. Tanto el tratamiento 3 como el tratamiento 6 manifestaron el mismo nivel de incidencia en hojas con pústulas (68%). En los tratamientos 1 y 2 se reportaron incidencias de 64 y 60% respectivamente. Se consideró a esta evaluación como la final, dado que para la correspondiente al día 3 de Septiembre, que es cuando se finalizó el experimento, ya se habían perdido algunas hojas de las seleccionadas, por lo que no se pudo seguir con las evaluaciones en esa fecha. Únicamente las plantas a las que se les aplicó los tratamientos 3 y 5 conservaron todas las hojas evaluadas, por lo que se pudo calcular la incidencia en las hojas con pústulas.

A pesar de haber encontrado diferencias significativas en los tratamientos, no se puede establecer qué combinaciones de cepas de *Verticillium* sp. empleadas en el experimento manifestaron mayor incidencia en las hojas con pústulas ya que una serie de factores afectaron la evaluación.

Incidencia de Verticillium sp. en las pústulas.

En cuanto a la incidencia del hiperparásito en pústulas, el análisis de varianza (Anexo 21) indicó que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P=0.189$), solamente hubo diferencias significativas entre los tratamientos *vs.* evaluaciones ($P=0.0001$). Esto significa que todos los tratamientos produjeron una incidencia en las pústulas de roya de todas las hojas evaluadas, es decir, el nivel de hiperparasitismo no varió con ninguna mezcla de cepas aplicadas ni con respecto al testigo donde no se aplicó ningún hiperparásito, y se fue incrementando a medida transcurrió el tiempo.

Estos resultados pueden explicarse a la posible presencia de *Verticillium* sp. en las plantas al momento 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 que se usaron 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 pudo permitir 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 puede dispersar fácilmente entre una planta y otra lo cual se presenció por la poca distancia entre ellas. Alarcón y Carrión en (1994) también observaron que con plantas de café sembradas en hileras a dos metros de separación y las hileras separadas tres metros entre sí, después de dos inoculaciones en el año (una en octubre y la otra en diciembre) con *Verticillium* sp. éste se mezcló en todo el ensayo y el testigo.

El comportamiento de la incidencia de *Verticillium* sp. en las pústulas de roya para el promedio de todos los tratamientos se puede observar en la Figura 12, llegando a observarse como máximo hasta un 10.5% en la sexta evaluación.

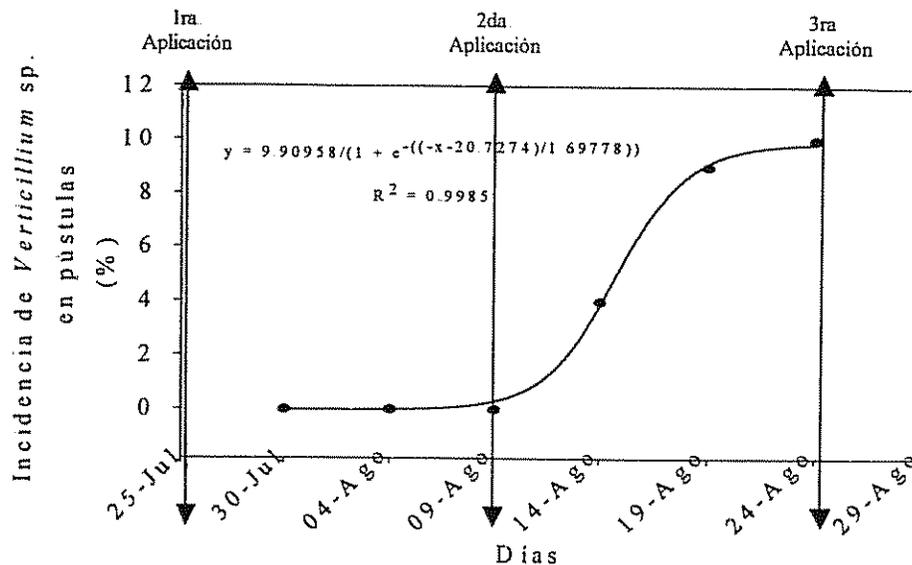


Figura 12. Curva de mejor ajuste de la Incidencia de *Verticillium* sp. en pústulas de roya durante el período 30 de julio a 24 de agosto de 2000.

La incidencia de *Verticillium* sp. en el total de las pústulas fue bajo. Es posible que la baja incidencia pueda ser interpretada como un efecto adverso de la humedad relativa (HR), pues se necesita entre 99 y 95% de la misma para que se complete el hiperparasitismo (Eskes *et al.*, 1987) y durante el período de estudio se reportó una humedad relativa promedio mensual fuera del ensayo entre 88.1 y 88.5 % para los meses de julio y agosto respectivamente, y dentro del ensayo fue de 80.42% (Anexo 1). La temperatura en el estudio se encontró en un nivel óptimo para el hiperparásito durante el tiempo de evaluación tanto fuera del ensayo (Anexos 19 y 20), como dentro del mismo (Anexo 1) ya que *Verticillium* sp. se desarrolla bien entre los 20 y 25 °C (Hall, 1981).

En la Figura 13 se presenta la curva de desarrollo de la enfermedad y el hiperparásito. Ambos hongos encontraron condiciones de temperatura favorables, pero 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. Se puede observar que la roya tuvo un incremento acelerado principalmente a partir del 14 de agosto, y *Verticillium* sp. para esa fecha

misma fecha, si bien comenzó a incrementarse su desarrollo lo hizo a una tasa mucho más baja que la de roya, por lo que al final de las evaluaciones, el hiperparasitismo alcanzado fue muy bajo.

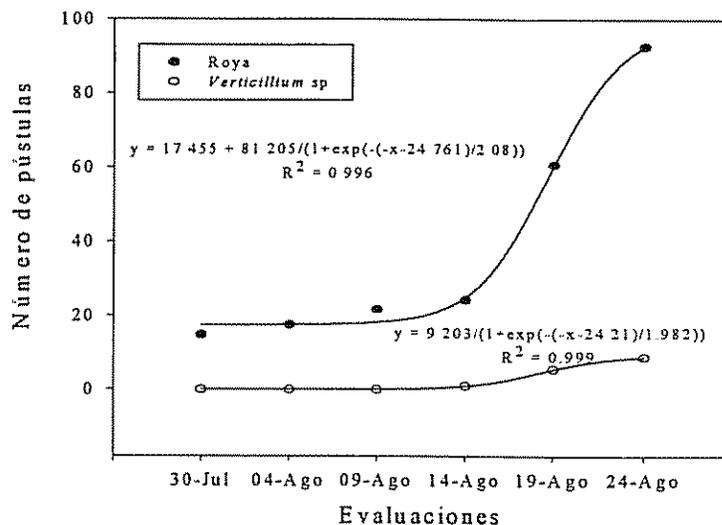


Figura 13. Curvas de mejor ajuste para el desarrollo de la enfermedad y de *Verticillium sp.* durante el periodo del 30 de julio al 24 de agosto de 2000.

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 a nivel de hojas como en el total de pústulas y se observó un hiperparasitismo menor del 14% y uno de los factores que influyeron en la baja incidencia fue la baja humedad. Como pudo notarse en el presente estudio, los niveles de hiperparasitismos alcanzados no llegaron arriba del 10.5% y las condiciones de humedad fueron, como se discutió anteriormente, adversas.

5. CONCLUSIONES

Las condiciones del ensayo en macetas y con inóculo natural de roya no permitieron determinar la capacidad hiperparasítica de las cepas de *Verticillium* sp.

Todas las cepas de *Verticillium* sp. estudiadas lograron producir conidias en los fermentadores artesanales en forma satisfactoria, por lo que dicho sistema es eficiente para la reproducción masiva de este tipo de hiperparásito.

No se observó la presencia de clamidosporas en el fermentador lo que podría sugerir que las cepas corresponden a la especie *Verticillium lecanii*.

La cantidad mínima de crecimiento en medio de cultivo del hiperparásito para iniciar el proceso de fermentación para las cuatro cepas de *Verticillium* sp. estudiadas fue la que se obtuvo en una caja de petri de 15 días de crecimiento, la cual fue entre 10^5 y 10^7 conidias/ml.

La reducción de la concentración de melaza no afectó la producción final de conidias de tres de las cepas evaluadas (CATIE, Pejibaye y Tuis) por lo tanto se puede usar la dosis más baja (8 g/l) para su producción.

La presencia de uredosporas no afectó la concentración final de conidias de las cepas (CATIE, Pejibaye y Tuis) 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.

6. RECOMENDACIONES

Continuar estudiando el hiperparasitismo de *Verticillium* sp. sobre roya durante un tiempo más prolongado para comenzar con aplicaciones del hiperparásito antes de que la enfermedad alcance niveles incontrolables y bajo condiciones climáticas que sean favorables para dicho hiperparásito.

Evaluar otros diseños experimentales para la capacidad hiperparasítica de *Verticillium* sp. donde se separe en el tiempo y (o) espacio los tratamientos lo suficiente como para medir su efecto.

Continuar con más estudios de reproducción masiva de *Verticillium* sp. durante un tiempo más prolongado y con un número mayor de repeticiones que el empleado en este estudio y que además se utilice dosis más bajas de melaza para ver si el efecto sobre la concentración de conidias es satisfactorio.

Reproducir en fermentadores artesanales una mezcla de cepas de *Verticillium* sp. para determinar si hay antagonismo dentro del medio y evaluar la acción de dichas mezclas en el campo.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, R; Carrión, G. 1994. Uso de *Verticillium lecanii* en cafetales como control biológico de la roya del café. *Fitopatología* 29 (1): 82-85.
- Andrews, JH. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology* 30: 603-635.
- Avelino, J; Muller, R; Eskes, A; Santacrea, R; Holguín, F. 1999. Desafíos de la caficultura en Centroamérica. Ed. B Bertrand; B Rapidel. San José, CR, IICA. PROMECAFE. CIRAD. IRD. CCR.FRANCIA. 496 p.
- Baker, KF. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 25: 67-85.
- Becker R, S. 1991. El sistema *Coffea* spp. y *Hemileia vastatrix*. IN La Roya de Café. Conocimiento y Control. 1991. GTZ, Eschborn, DE. 281 p.
- Bertrand, B; Rapidel, B. 1999. Desafíos de la caficultura en Centroamérica. Ed. B Bertrand; B Rapidel. San José, CR. IICA. PROMECAFE. CIRAD. IRD. CCR.FRANCIA. 496 p.
- Bigre, JP; Morand, JC; Tharaud, M. 1990. Patología de los cultivos florales y ornamentales. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, Es. 233 p.
- Blakeman, JP. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annual Review of Phytopathology* 20: 167-192.
- Cadena G, G. 1982. Biología de *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. Roya del café *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Manizales, CO. p. 1-26.
- Cadena-Gómez, G. 1982. Diseminación de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Manizales, CO. p. 1-27.
- Carballo, VM. 1998. Formulación de hongos entomopatógenos (Hoja Técnica). Manejo Integrado de Plagas. 47: 1-4.
- Carrión, G. 1988. Estudios sobre control biológico de la roya del café por *Verticillium lecanii* en México. *Micología Neotropical Aplicada*. 1: 79-86.
- Castaño-Zapata, J. 1994. Principios básicos de fitopatología. Publicación DPV-EAP No. 596. Segunda Edición. HO. 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.
- Commonwealth Mycological Institute. 1979. CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. CAB. Kew, Surrey, GB. Set 61.
- Da Silva R., R; Ferraz, S. 1978. Efeito da temperatura o crescimento e esporulação "in vitro" de *Verticillium hemileiae*. 6 Congresso brasileiro de pesquisas cafeiteiras. Riberão preto, São Paulo. Resumos. p. 38-39.
- De Bach, P. 1992. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. Compañía Editorial Continental. Decimocuarta reimpresión. MX. 929 p.
- Eskes, AB; Mendes, MD; Robbs, CF. 1991. Laboratory and field studies on parasitism of *Hemileia vastatrix* with *Verticillium lecanii* and *V. leptobactrum*. *Café Cacao Thé*. 35 (4): 275-282.
- Eskes, AB; Mendes, MD; Robbs, CF. 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. Resúmenes. Grupo Paulista de Fitopatología.
- FONAIAP (Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias). 1988. Paquete tecnológico para la producción de café. Maracay, VE. 192 p. (Serie Paquetes Tecnológicos no. 6).
- Forrer, HR. 1979. Possibilities of the utilization of hiperparasites and application of natural compounds for the control of rusts. IN Lucha contra la roya del café. Informe sobre un seminario de estudios en Paipa, Colombia. GTZ, Eschborn, DE. p. 63-70.
- Gautier, P. 1999. El comercio internacional del café y sus perspectivas. Seminario Regional sobre situación actual del beneficiado de café: revisión y avances tecnológicos del proceso. Memoria. CICAFAE, CR. p. 169-176.
- González, LC. 1976. Introducción a la fitopatología. Editorial IICA. San José, CR. 145 p. (Serie: Libros y materiales educativos No. 29)
- González, E; Martínez, MA; Martínez, B. 1995. Efectividad *in vitro* de *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas frente a *Planococcus* sp. *Revista de Protección Vegetal* 10: 265-268.
- González, E; Martínez, B. 1996. Efectividad *in vitro* de dos cepas de *Verticillium lecanii* (Zimm) Viegas frente a *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. *Revista de Protección Vegetal* 11(3): 173-177.
- Javed Z, J. 1987. Epidemiología y control de la roya del cafeto en Centroamérica. Plagas y enfermedades de carácter epidémico en cultivos frutales de la región centroamericana. CATIE, CR. p. 17-26 (Serie técnica. Informe técnico no. 110).

- Jiménez C, A. 1997. Aporte de la caficultura al desarrollo de América Latina. In. Memorias XVIII Simposio Latinoamericano de Caficultura. IICA, PROMECAFE. San José, CR. p. 3-11.
- 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. Academic Press Inc. London, GB. p. 483-498.
- Hebbar, PK; Lumsden, RD. 1999. Formulation and fermentation of biocontrol agents of cacao fungal pathogens: example of *Trichoderma* species. Research Methodology in Biocontrol of Plant Diseases: with special reference to fungal diseases of cocoa. Workshop Manual. Ed. U Krauss; P Hebbar. Workshop Manual. CATIE, Turrialba, CR. p. 63-68.
- 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.
- Lewis, JA; Papavizas, GC. 1991. Biocontrol of plant diseases: the approach for tomorrow. Crop Protection 10:95-105.
- López A., R; Chamorro T., G; Gallo C., A. 1990. Aspectos económicos de la roya del cafeto. 50 años de CENICAFE 1938-1988. Conferencias conmemorativas. Chinchiná, CO. p. 91-96.
- Meza, CP; Leguizamón, J. 1994. Evaluación de formulaciones de *Bacillus thuringiensis* Berliner y *Verticillium lecanii* (Zimm) Viegas en el control de la roya del cafeto *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. Fitopatología Colombiana. 19 (2): 50-56.
- Monzón C, A. 1997. Evaluación de dos aislamientos de *Verticillium* sp. como agente de control biológico de la roya (*H. vastatrix*) del cafeto (*Coffea arabica* L.) en condiciones de invernadero. XVIII Simposio latinoamericano de caficultura. Memorias. CR. p. 327-338.
- 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 cafeto (*Coffea arabica* L.). Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR. CATIE. 66 p.
- Puerta-Quintero, GI. 1999. Calidad en taza de las variedades de *Coffea arabica* L. Cultivadas en Colombia. Cenicafé 49 (2): 265-278.
- Rivas Z, S; Leguizamón C, J; Ponce D, C. 1996. Estudio histológico, anatómico y morfológico de *Verticillium lecanii* y *Talaromyces wortmannii* con *Hemileia vastatrix*. Cenicafé. 47 (1): 16-31.

- Rivillas O, CA; Leguizamón C, JE; Gil V, LF. 1999. Recomendaciones para el manejo de la roya del cafeto en Colombia. Cenicafé. Boletín Técnico no.19. 36 p.
- Rodrigues, CJ. 1990. La resistencia genética a la roya del cafeto. 50 Años de Cenicafé 1938-1988. Conferencias conmemorativas. Centro nacional de investigaciones de café "Pedro Uribe Mejía". Chinchiná, CO. p. 207-212.
- Romero, A; Carrión, G.1995. Patogenicidad de *Verticillium lecanii* sobre la roya del frijol en condiciones de invernadero. Fitopatología 30 (1): 30-34.
- Ruiz, GM. 1994. Contribución del mejoramiento genético al desarrollo de la caficultura colombiana. Innovación y Ciencia. 3 (2): 1-6.
- Samayoa J, JO. 1999. Desarrollo de enfermedades en café bajo manejo orgánico y convencional en Paraíso, Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 69 p.
- Schot, A van der. 1999. Marketing of coffee in Costa Rica: a study in Guanacaste district. REPOSA/CATIE/WAU/MAG. Report no. 141. Field report no. 180. p. 1-10.
- Shaw, DE. 1988. *Verticillium lecanii*: un hiperparásito del patógeno de la roya del café en Papúa Nueva Guinea. Australasian Plant Pathology (Australia) 17 (1): 23.
- Stirling, GR; Licastro, KA; West, LM; Smith, LJ. 1998. Development of commercially acceptable formulations of the nematophagus fungus *Verticillium chlamydosporium*. Biological Control. 11: 217-223.
- Subramanian, CV. 1983. Hyphomycetes, taxonomy and biology. Academic Press Inc. London, GB. 487 p.
- Vélez-Arango, PE.1991. Estudio macro y microscópico del efecto de *Verticillium lecanii* sobre el desarrollo de lesiones de la roya del cafeto. Cenicafé 42 (1): 13-20.
- 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.
- Verhaar, MA; Hijwegen, T; Zadocs, JC. 1999. Improvement of the efficacy of *Verticillium lecanii* used in biocontrol of *Sphaerotheca fuliginea* by addition of oil formulations. Biocontrol. 44: 73-87.

8. ANEXOS

Anexo 1. Condiciones micrometeorológicas dentro del ensayo de hiperparasitismo de *Verticillium* sp. sobre pústulas de roya del café.

CONDICIONES MICROMETEOROLÓGICAS		
Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)	Densidad de sombra (%)
23.79	80.42	81.77

Anexo 2. Análisis de varianza del nivel final de conidias con datos transformados (Log Y) de la interacción de cuatro cepas de *Verticillium* sp., cuatro dosis de melaza y en presencia y ausencia de uredosporas de roya.

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Pr>F</i>
Cepa	3	46.8062	15.6021	5.76	0.0029*
Melaza	3	28.1059	9.3686	3.46	0.0277*
Interacción Cepa*Melaza	9	77.0764	8.594	3.16	0.0077*
Uredosporas	1	0.3552	0.3552	0.13	0.7196
Interacción Cepa*Uredosporas	3	25.6323	8.5441	3.16	0.0381*
Interacción Melaza*Uredosporas	3	56.2383	18.7461	6.92	0.001*
Interacción Cepa*Melaza*Uredosporas	9	50.9733	5.6637	2.09	0.0605
		$R^2 = 0.767$		C.V.=	11.0075

*Significativo $P < 0.05$

Anexo 3. Análisis de varianza de la concentración final de conidias de la cepa de CATIE con datos transformados (Log Y) obtenidas con la interacción de cuatro dosis de melaza y en presencia y ausencia de uredosporas de roya.

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Pr>F</i>
Melaza	3	0.7993	0.2664	0.26	0.8524
Uredosporas	1	0.1227	0.1227	0.12	0.7383
Interacción Melaza*Uredosporas	3	2.5333	0.8444	0.82	0.5168
		$R^2 = 0.2963$		C.V.=	6.8834

*Significativo $P < 0.05$

Anexo 4. Análisis de varianza de la concentración final de conidias de la cepa de Guayabo con datos transformados (Log Y) obtenidas con la interacción de cuatro dosis de melaza y en presencia y ausencia de uredosporas de roya.

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Pr>F</i>
Melaza	3	62.3389	20.7796	7.66	0.0097*
Uredosporas	1	19.4065	19.4065	7.16	0.0281*
Interacción Melaza*Uredosporas	3	82.7341	27.578	10.17	0.0042*
		$R^2 = 0.8835$		C.V.=	10.2

*Significativo $P < 0.05$

Anexo 5. Análisis de varianza de la concentración final de conidias de la cepa de Pejibaye con datos transformados (Log Y) obtenidas con la interacción de cuatro dosis de melaza y en presencia y ausencia de uredosporas de roya.

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Pr>F</i>
Melaza	3	3.6288	1.2096	1.01	0.4388
Uredosporas	1	0.1193	0.1193	0.1	0.7609
Interacción Melaza*Uredosporas	3	4.3868	1.4623	1.22	0.365
		$R^2 = 0.4582$		C.V.=	7.9659

*Significativo $P < 0.05$

Anexo 6. Análisis de varianza del nivel final de conidias de la cepa de Tuis con datos transformados (Log Y) obtenidas con la interacción de cuatro dosis de melaza y en presencia y ausencia de uredosporas de roya.

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Pr>F</i>
Melaza	3	38.4153	12.8051	2.17	0.1691
Uredosporas	1	6.3389	6.3389	1.08	0.33
Interacción Melaza*Uredosporas	3	17.5573	5.8524	0.99	0.4438
		$R^2 = 0.5693$		C.V.=	15.9931

*Significativo $P < 0.05$

Anexo 7. Análisis de varianza del tiempo (días) del punto de inflexión (Log Y) obtenidas con la interacción de cuatro cepas de *Verticillium* sp., cuatro dosis de melaza y en presencia y ausencia de uredosporas de roya.

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Pr>F</i>
Cepa	3	2744.4643	914.8214	3.56	0.0249*
Melaza	3	2396.9564	798.9855	3.11	0.04*
Interacción Cepa*Melaza	9	8614.9837	957.2204	3.73	0.0027*
Uredosporas	1	202.3442	202.3442	0.79	0.3815
Interacción Cepa*Uredosporas	3	2994.1121	998.0374	3.88	0.0178*
Interacción	3	3654.0517	1218.0172	4.74	0.0076*
Melaza*Uredosporas					
Interacción	9	7859.7927	873.3103	3.4	0.0049*
Cepa*Melaza*Uredosporas					
		$R^2 = 0.7759$		C.V.=	172.6203

*Significativo $P < 0.05$

Anexo 8. Análisis de varianza del tiempo (días) del punto de inflexión de las curvas de crecimiento de conidias obtenidas con la interacción de la cepa de CATIE con cuatro dosis de melaza y en presencia y ausencia de uredosporas de roya.

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Pr>F</i>
Melaza	3	10.2211	3.407	0.96	0.4577
Uredosporas	1	0.0044	0.0044	0	0.9728
Interacción Melaza*Uredosporas	3	7.1402	2.38	0.67	0.5941
		$R^2 = 0.3792$		C.V.=	55.6639

*Significativo $P < 0.05$

Anexo 9. Análisis de varianza del tiempo (días) del punto de inflexión de las curvas de crecimiento de conidias obtenidas con la interacción de la cepa de Guayabo con cuatro dosis de melaza y en presencia y ausencia de uredosporas de roya.

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Pr>F</i>
Melaza	3	9259.3906	3086.4635	4.57	0.0382*
Uredosporas	1	2694.6507	2694.6507	3.99	0.0809
Interacción	3	10974.3834	3658.1278	5.41	0.0251*
Melaza*Uredosporas		$R^2 = 0.8092$		C.V.=	132.4332

*Significativo $P < 0.05$

Anexo 10. Análisis de varianza del tiempo (días) del punto de inflexión de las curvas de crecimiento de conidias obtenidas con la interacción de la cepa de Pejibaye con cuatro dosis de melaza y en presencia y ausencia de uredosporas de roya.

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Pr>F</i>
Melaza	3	94.8001	31.6	1.41	0.3098
Uredosporas	1	1.033	1.033	0.05	0.8355
Interacción Melaza*Uredosporas	3	26.8466	8.9487	0.4	0.7577
		$R^2 = 0.4059$		C.V.=	120.9747

*Significativo $P < 0.05$

Anexo 11. Análisis de varianza del tiempo (días) del punto de inflexión de las curvas de crecimiento de conidias obtenidas con la interacción de la cepa de Tuis con cuatro dosis de melaza y en presencia y ausencia de uredosporas de roya.

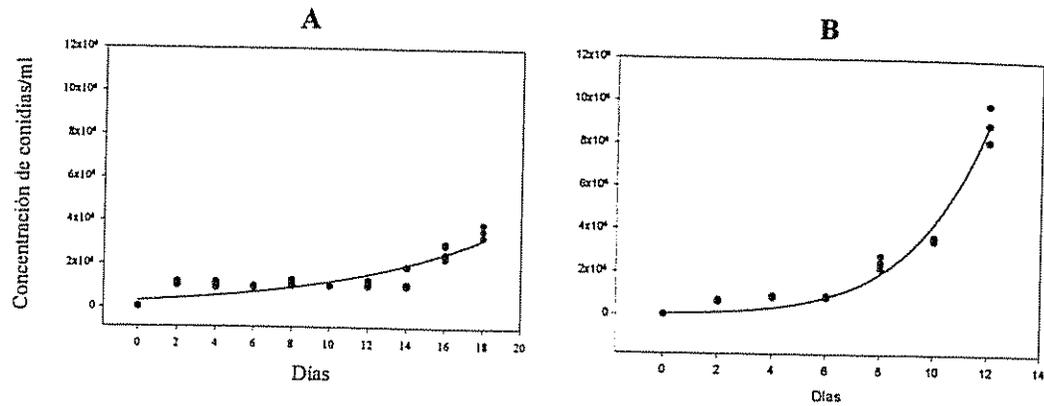
<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Pr>F</i>
Melaza	3	1647.5282	549.1761	1.69	0.2465
Uredosporas	1	500.7682	500.7682	1.54	0.2502
Interacción Melaza*Uredosporas	3	505.4741	168.4914	0.52	0.682
		$R^2 = 0.4059$		C.V.=	120.9747

*Significativo $P < 0.05$

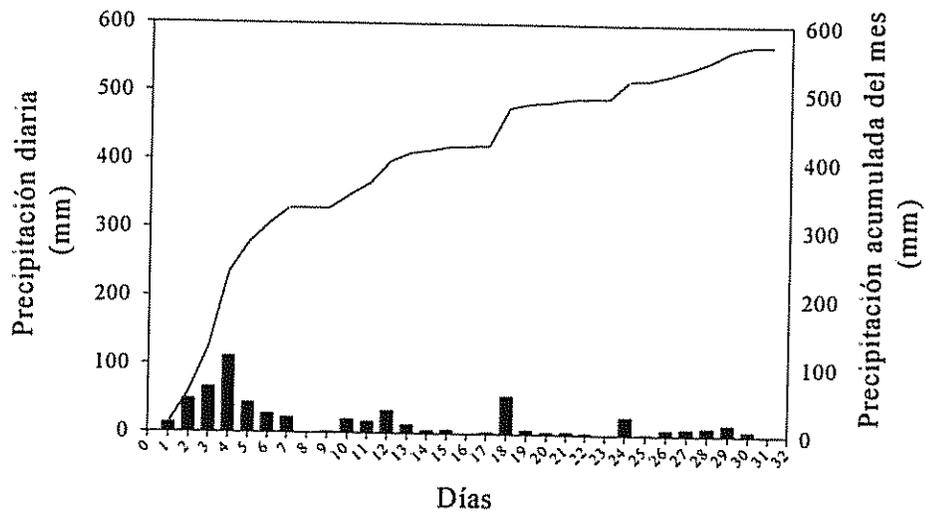
Anexo 12. Análisis de varianza de la pendiente en el punto de inflexión de las curvas de crecimiento de conidias obtenidas con la interacción de cuatro cepas de *Verticillium* sp. con cuatro dosis de melaza y en presencia y ausencia de uredosporas de roya.

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Pr>F</i>
Cepa	3	0.5014	0.1671	0.02	0.9962
Melaza	3	12.7605	4.2535	0.5	0.6848
Interacción Cepa*Melaza	9	56.4577	6.2731	0.74	0.6719
Uredosporas	1	3.2337	3.2337	0.38	0.5418
Interacción Cepa*Uredosporas	3	14.294	4.7647	0.56	0.6451
Interacción Melaza*Uredosporas	3	36.9571	12.319	1.45	0.247
Interacción	9	64.7739	7.1971	0.85	0.5802
Cepa*Melaza*Uredosporas		$R^2 = 0.4099$		C.V.=	157.8899

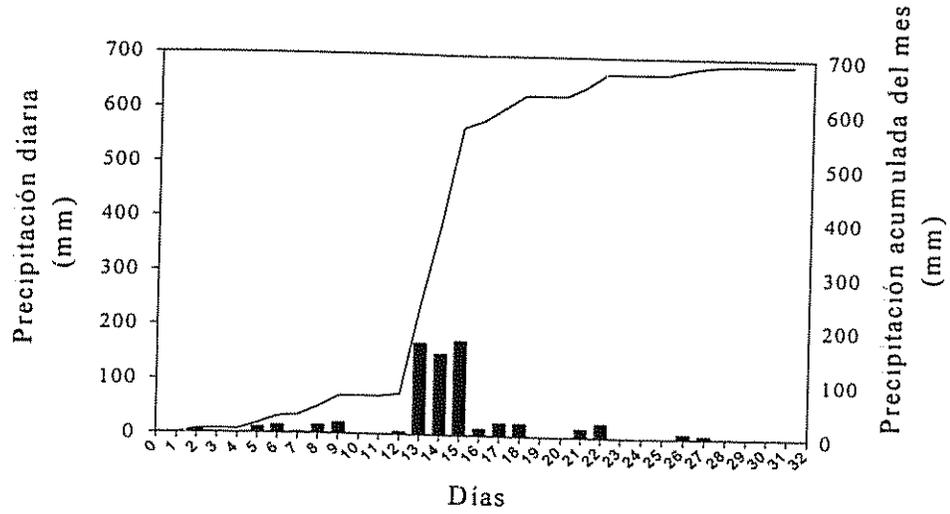
*Significativo $P < 0.05$



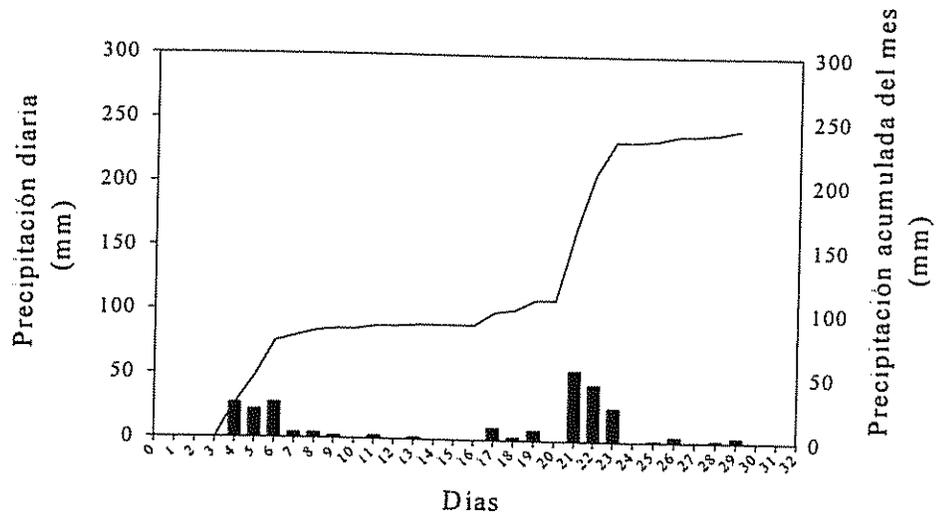
Anexo 13. Concentración de conidias de la cepa de Guayabo obtenidas en fermentadores artesanales con dosis 3 de melaza (40 gm/L) sin uredosporas de roya. A. Concentración de conidias durante un periodo de 18 días (repetición 1). B. Concentración de conidias durante un periodo de 12 días (repetición 2)



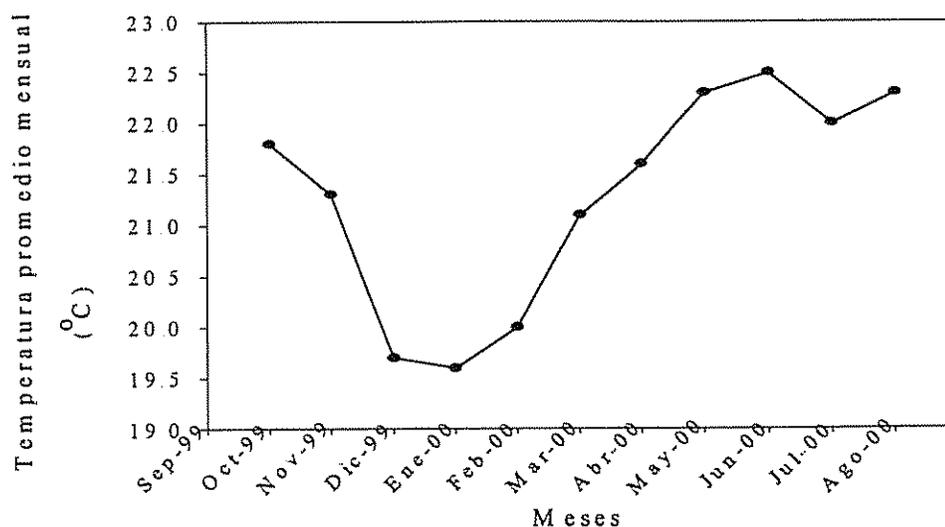
Anexo 14. Precipitación diaria y acumulada del mes de Diciembre de 1999, CATIE, Turrialba, Costa Rica.



Anexo 15. Precipitación diaria y acumulada del mes de Enero de 2000, CATIE, Turrialba, Costa Rica.



Anexo 16. Precipitación diaria y acumulada del mes de Febrero de 2000, CATIE, Turrialba, Costa Rica.

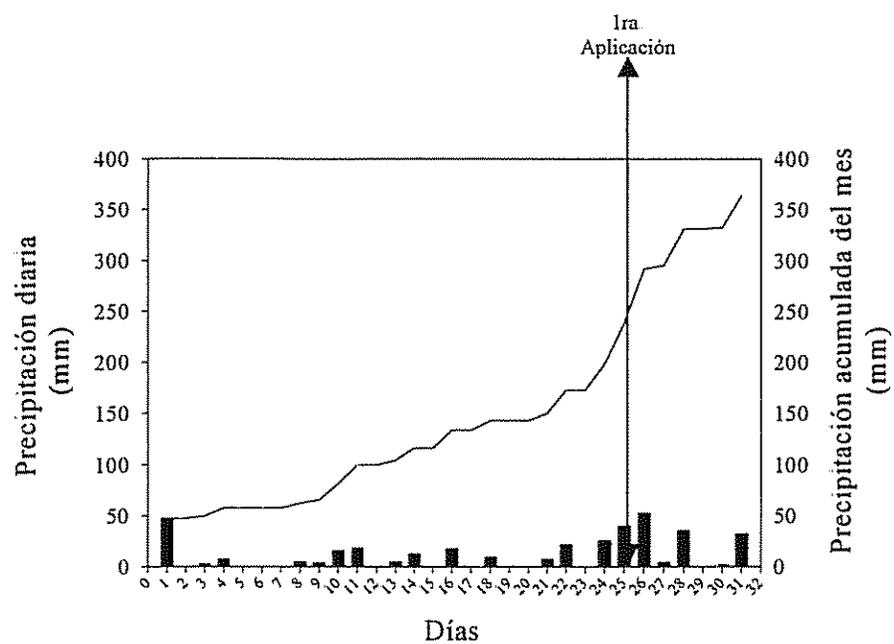


Anexo 17. Temperatura promedio mensual durante el periodo de Octubre de 1999 a Agosto de 2000. CATIE, Turrialba, Costa Rica.

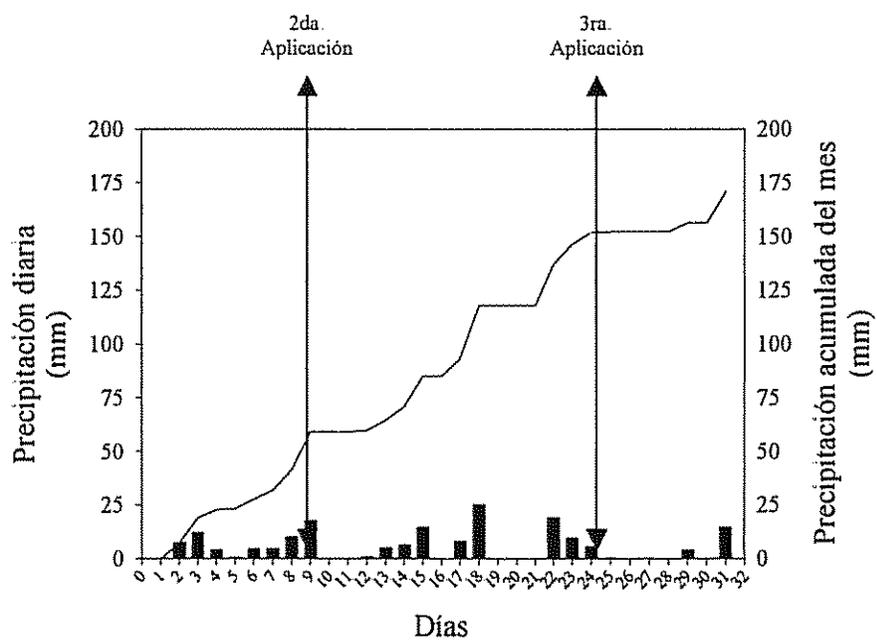
Anexo 18. Análisis de varianza de la incidencia de *Verticillium* sp. en hojas con pústulas

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Pr>F</i>
Bloque	4	0.04513811	0.01128453	0.56	0.6912
Tratamiento	5	0.50949959	0.10189992	5.07	0.0002*
Bloque*Tratamiento	20	1.37789924	0.06889496	3043	0.0001*
Medición	7	15.81324459	2.25903494	112.34	0.0001*
Tratamiento*Medición	35	0.76569589	0.02187703	1.09	0.3529
Error	160	3.21748810	0.02010930		
Total	231	21.72896552		C.V. =	55.20

*Significativo $P < 0.05$



Anexo 19. Precipitación diaria y acumulada del mes de Julio de 2000, CATIE, Turrialba, Costa Rica.



Anexo 20. Precipitación diaria y acumulada del mes de Agosto de 2000, CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Anexo 21. Análisis de varianza para la incidencia de *Verticillium* sp. en pústulas de roya.

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Pr>F</i>
Bloque	4	0.00763996	0.00190999	1.02	0.3985
Tratamiento	5	0.001418770	0.00283754	1.52	0.1888
Bloque*Tratamiento	20	0.10416007	0.005208	2.79	0.0003*
Medición	5	0.32909028	0.06581806	35.24	0.0001*
Tratamiento*Medición	25	0.02949564	0.00117983	0.63	0.9082
Error	120	0.22413080	0.00186776		
Total	179	1.39952335		C.V. =	113.5031

*Significativo $P < 0.05$