

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL
DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

PROGRAMA DE POSGRADO

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE
BIOPLAGUICIDAS PARA EL MANEJO DE *Hemileia vastatrix* EN PLANTACIONES DE
CAFÉ**

Por

Gerardo García Nevárez

Tesis sometida a consideración del Programa de Posgrado como requisito para optar al grado de

DOCTOR OF PHILOSOPHY

EN AGRICULTURA SOSTENIBLE

Turrialba, Costa Rica, 2018

CATIE
PROGRAMA DE POSGRADO

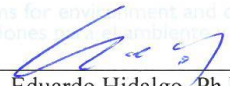
FORMULARIO DE APROBACIÓN DE LA TESIS DE Ph.D

Esta tesis de Gerardo García Nevárez sometida a
Nombre del estudiante

consideración para el grado de ***Doctor of Philosophy***, titulada:
Evaluación de la calidad y métodos de producción de bioplaguicidas para el manejo de *Hemileia vastatrix* en plantaciones de café.

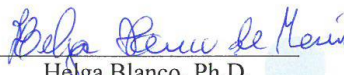
Ha sido revisada en su forma final y aprobada, según lo indican las firmas y fechas que aparecen a continuación:

Consejero principal 1:


Eduardo Hidalgo, Ph.D.
Codirector de tesis


Fecha: 16-04-2018

Consejero principal 2:

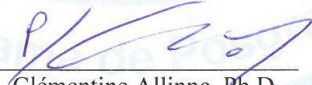

Helga Blanco, Ph.D.
Codirectora de tesis

Fecha: 16-04-2018

Miembros del comité:


Elías de Melo Virgíno, Ph.D.
Miembro de Comité

Fecha: 16-04-2018


Clémentine Allinne, Ph.D.
Miembro de Comité

Fecha: 16-04-2018

Decanatura, Escuela
Posgrado:

de 
Isabel A. Gutiérrez-Montes, Ph.D.

Fecha: 16-04-2018

Índice

Dedicatoria.....	VII
Agradecimientos	VIII
Índice de cuadros	IX
Índice de figuras.....	X
Lista de siglas, acrónimos y símbolos.....	XI
RESUMEN GENERAL.....	XIII
SUMMARY	XV
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Literatura citada.....	2
1.1. Objetivos	4
1.1.1. Objetivo general	4
1.1.2. Objetivos específicos.....	4
1.2. Hipótesis	4
Capítulo I. Evaluación de calidad de productos biológicos comerciales y artesanales para el control de roya <i>Hemileia vastatrix</i> Berkeley y Broome en Costa Rica.	5
Resumen.....	5
1. Introducción	5
2. Materiales y métodos	7
2.1. Productos analizados	7
2.2. Variables y metodología para su medición	7
2.3. Identificación taxonómica	8
3. Resultados	8
4. Discusión.....	9
5. Literatura citada	10
Capítulo II. Identificación molecular y caracterización de cepas de hongos hiperparásitos de <i>Hemileia vastatrix</i> Berkeley y Broome.....	12
Resumen.....	12
1. Introducción.....	12
2. Materiales y Métodos	14
2.1. Aislamiento de cepas.....	14
2.2. Identificación molecular.....	14

2.3.	Caracterización cultural	15
2.3.1.	Macroscópica.....	15
2.3.2.	Microscópica	15
2.4.	Caracterización fisiológica.....	16
2.4.1.	Crecimiento radial y producción de conidios	16
2.5.	Análisis estadístico.....	16
3.	Resultados.....	16
3.1.	Identificación molecular.....	16
3.2.	Caracterización cultural	17
3.2.1.	Macroscópica.....	17
3.2.2.	Microscópica	18
3.2.2.1.	Tamaño de conidios	18
3.2.2.2.	Morfología y disposición de fiálides de <i>Simplicillium</i>	19
3.3.	Caracterización fisiológica.....	20
3.3.1.	Crecimiento radial	20
3.3.2.	Producción de conidios.....	21
4.	Discusión	21
5.	Literatura citada.....	23
Capítulo III. Medios líquidos para producción de blastosporas de <i>Simplicillium</i> sp. (Zimm.) ...		26
Resumen.....		26
1.	Introducción.....	26
2.	Materiales y métodos.....	27
2.1.	Cepa y obtención de inóculo inicial	27
2.2.	Composición de medios y criterios de selección de nutrientes	27
2.3.	Preparación e inoculación de medios	29
2.4.	Condiciones de cultivo y toma de datos.....	29
2.5.	Diseño y análisis estadístico.....	29
3.	Resultados.....	30
4.	Discusión	31
5.	Literatura citada.....	32
Capítulo IV. Eficacia de cepas locales y comerciales de <i>Simplicillium</i> spp. en el control de la roya del cafeto <i>Hemileia vastatrix</i> Berkeley y Broome.....		34
Resumen.....		34

1. Introducción.....	34
2. Materiales y métodos.....	35
2.1. Bioensayos de cepas locales y comerciales.....	36
2.1.1. Aislamiento e identificación de cepas locales y comerciales	36
2.1.2. Colecta de pústulas de roya y preparación de discos de hoja	36
2.1.3. Método y dosis de aplicación.....	37
2.1.4. Medición de la variable respuesta.....	37
2.1.5. Diseño y análisis estadístico	37
2.2. Eficacia de conidios y blastosporas de <i>Simplicillium</i> colonizando pústulas de roya - Bioensayos	38
2.2.1. Producción de conidios.....	38
2.2.2. Producción de blastosporas	38
2.2.3. Método y dosis de aplicación	38
2.2.4. Medición de la variable respuesta	39
2.2.5. Diseño y análisis estadístico	39
2.3. Eficacia de conidios y blastosporas de <i>Simplicillium</i> en el control de roya – Fase de campo 39	
2.3.1. Ubicación.....	39
2.3.2. Método y dosis de aplicación	39
2.3.3. Diseño y análisis estadístico	40
3. Resultados.....	40
3.1. Bioensayos de cepas locales contra <i>H. vastatrix</i>	40
3.2. Bioensayos de cepas comerciales contra <i>H. vastatrix</i>	41
3.3. Eficacia de conidios y blastosporas de <i>Simplicillium</i> colonizando pústulas de roya	42
3.4. Eficacia de conidios y blastosporas de <i>Simplicillium</i> en el control de roya – Fase de campo 2016 – 2017.	43
4. Discusión	45
5. Literatura citada.....	46
Capítulo V. Composición microbiana y efecto de los biofermentos (“bioles”) en el control de enfermedades	49
Resumen.....	49
1. Introducción.....	49
2. Materiales y métodos.....	50

2.1. Colecta de bioles	50
2.2. Diversidad genética de MM y bioles.....	50
2.3. Composición microbiana de biofermentos.....	51
2.4. Efecto de biofermentos en el control de enfermedades.....	51
2.5. Cultivos duales	51
2.6. Efecto de metabolitos secundarios contra <i>C. coffeicola</i>	52
2.7. Análisis estadístico.....	52
3. Resultados.....	52
3.1. Diversidad genética y Composición microbiana de biofermentos.....	53
3.2. Efecto de biofermentos en el control de enfermedades.....	54
4. Discusión	54
5. Literatura citada.....	55
DISCUSIÓN GENERAL.....	56
CONCLUSIONES GENERALES.....	57
RECOMENDACIONES.....	58
A productores	58
A compañías formuladoras.....	58
A investigaciones futuras	58
Anexos	60
Anexo 1. Identificación molecular de cepas locales y un microorganismo frecuentemente encontrado en bioles.....	60
Anexo 2. Identificación molecular de la cepa local EC proveniente de diferentes propágulos (conidios, blastosporas y microesclerocios), del producto artesanal INA, del comercial OB y un microorganismo encontrado constantemente en las diferentes muestras de bioles.	61
Anexo 3. Identificación molecular e índices de diversidad de Shannon en muestras de MM y bioles	62

Dedicatoria

Con mucho amor dedico este trabajo a mi esposa Yadira Rico, por su valentía al atreverse a vivir esta experiencia conmigo, sin su apoyo no me hubiera sido posible lograr este objetivo. A mis hijos, Kenia García y Raúl García, por ser los mejores hijos del mundo.

A mi madre Rosalía Nevárez, quien ha sido ejemplo de fortaleza y tenacidad para superar adversidades y lograr objetivos, a mi padre Raúl García[†], a mis hermanos y hermanas, Raúl, Elías, Margarita y Rosalía.

Agradecimientos

A Dios por darnos la oportunidad a mí y a mi familia de emprender este viaje maravilloso.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por el apoyo y facilidades otorgadas para realizar mi doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el soporte económico.

Al CATIE, por darme la oportunidad de estudiar y vivir durante estos años en este lugar maravilloso.

A los miembros del comité de tesis: Eduardo Hidalgo Jaminson, Helga Blanco Metzler, Elías de Melo Virginio Filho y Clémentine Alline. Muy especialmente al Dr. Hidalgo, quien fue parte fundamental desde el proceso de admisión hasta el fin de mis estudios de doctorado.

A Hugo Mendez, por su valioso apoyo en el trabajo de campo.

Índice de cuadros

Cuadro 1. Concentración, pureza y viabilidad de productos comerciales y artesanales destinados al control de roya en Costa Rica.

Cuadro 2. Concentración y pureza durante el proceso de formulación en polvo de *Simplicillium*.

Cuadro 3. Identificación molecular de cepas locales y comerciales de hongos hiperparásitos asociados a *H. Vastatrix*.

Cuadro 4. Morfología de cepas de *Simplicillium* spp. aisladas de pústulas de *H. vastatrix*.

Cuadro 5. Composición de los medios líquidos evaluados en la producción de blastosporas de *Simlicillium* sp.

Cuadro 6. Número de observaciones y variables medidas en campo durante 2017.

Cuadro 7. Descripción de los biofermentos analizados.

Cuadro 8. Índice de diversidad de Shannon (H') presentes en microorganismos de montaña (MM) y en bioles.

Cuadro 9. Unidades formadoras de colonias (ufc) en MM y diferentes formulaciones de bioles producidos para el combate de enfermedades del cultivo del café

Índice de figuras

Figura 1. Desviación estándar de diferentes tamaños de muestra para tamaño de conidios de cepas locales de hongos hiperparásitos asociados a *H. Vastatrix*.

Figura 2. Colonias monospóricas de las cepas AQ (arriba) y EC (abajo), vistas por la parte superior e inferior.

Figura 3. Tamaño de conidios (μm) cepas locales de *Simplicillium* spp. asociadas al control natural de *H. Vastatrix*. Medias con misma letra son estadísticamente iguales DGC ($P=0.05$).

Figura 4. Fiálides solitarias y conidios de *Simplicillium* sp. (Cepa EC).

Figura 5. Crecimiento radial (mm) de cepas locales de *Simplicillium* spp. asociadas al control natural de *H. Vastatrix*. Medias con misma letra no difieren estadísticamente LSD ($p=0.05$)

Figura 6. Producción de conidios de cepas locales de de *Simplicillium* spp. asociadas al control natural de *H. Vastatrix*. Medias con misma letra son estadísticamente iguales DGC ($p=0.05$).

Figura 7. Producción de blastosporas (variable transformada a logaritmo natural) de *Simplicillium* en diferentes medios de cultivo medias con distinta letra son estadísticamente diferentes ($p=0.05$).

Figura 8. Eficacia de cepas locales de *Simplicillium* spp. colonizando pústulas de *H. vastatrix*.

Figura 9. Eficacia de cepas comerciales colonizando pústulas de *H. vastatrix*.

Figura 10. Eficacia de conidios y blastosporas de *Simplicillium* colonizando pústulas de roya.

Figura 11. Parasitismo (%) en pústulas de roya por dos tipos de esporas de *Simplicillium* y parasitismo natural al aplicar un biol.

Figura 12. Inhibición del crecimiento radial de *Cercospora coffeicola* debido al efecto individual de microorganismos y metabolitos difusibles al medio.

Lista de siglas, acrónimos y símbolos

CATIE: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza

CIRAD: Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique le Developpement, Francia

INA: Instituto Nacional de Aprendizaje

CBN: Control Biológico Natural

mL: mililitro

MM: Microorganismos de montaña

MIP: Manejo integrado de plagas

PDA: Papa Dextrosa Agar

SDA: Agar Sabouraud Dextrosa

Ca: calcio

Fe: hierro

ufc: unidades formadoras de colonias

ADE: Agua destilada estéril

Corbana: Corporación Bananera Nacional

µm: micrómetro

cm²: centímetro cuadrado

K: potasio

N: nitrógeno

P: fósforo

S: azufre

Zn: zinc

kg: kilogramo

L: litro

m: metro

°C: grados centígrados

cm: centímetro

mm: milímetro
mm²: milímetro cuadrado
g: gramo
mg: miligramo
msnm: metros sobre el nivel del mar
HE: Hongos entomopatógenos
KH₂PO₄: Fosfato monopotásico
MgSO₄·7H₂O: Sulfato de magnesio
FeSO₄·7H₂O: Sulfato de fierro
MnSO₄·H₂O: Sulfato de manganeso
ZnSO₄·7H₂O: Sulfato de zinc
CoCl₂·6H₂O: Cloruro de cobalto
CaCl₂: Cloruro de calcio
CuSO₄: Sulfato de cobre
Ca: Calcio
B: Boro
C: Cobre
K: Potasio
IU: unidades internacionales
rpm: revoluciones por minuto
h: horas
ME: Microorganismos eficientes
AN: Agar nutriente
H': índice de diversidad de Shannon

RESUMEN GENERAL

El trabajo enfoca aspectos de identificación, calidad y eficacia de micofungicidas y biofermentos comercializados para el manejo de la roya del café comparándolos con cepas locales aisladas para esta investigación.

En el primer capítulo se analizaron dos productos comerciales (C1 y C2) y dos artesanales (INA y Productor), destinados al control de roya en Costa Rica. Las variables evaluadas fueron: pureza, concentración, viabilidad; además se hizo una identificación taxonómica para los cuatro productos. Adicionalmente se utilizaron técnicas moleculares para identificar uno de los productos comerciales y uno artesanal como medida de corroboración de la identificación morfológica. La concentración de esporas fue superior en los productos comerciales; sin embargo, estos registraron los menores porcentajes de pureza y viabilidad. La ausencia total de contaminantes observada en ambos productos artesanales indica que es posible obtener productos de buena calidad a baja escala. La identificación taxonómica y molecular coincide con el género *Lecanicillium* que estipulan los productos comerciales. Por el contrario, en los productos artesanales se indica que contienen *Lecanicillium* y los resultados obtenidos identifican al género *Simplicillium*.

En el segundo capítulo se estudiaron siete cepas de hongos asociadas al control natural de *Hemileia vastatrix*. Cinco de ellas fueron aisladas de la zona cafetalera de Turrialba, Cartago, Costa Rica, una cepa artesanal y una comercial. Se hizo una identificación molecular y una caracterización cultural y fisiológica. La secuenciación de las cinco cepas locales de hongos asociadas al control biológico natural (CBN) de *H. vastatrix* las identifica como perteneciente al género *Simplicillium* con una confiabilidad de 98 a 99%. La cepa artesanal coincidió en un 99% con el género *Simplicillium*, mientras que la cepa comercial fue identificada como *Lecanicillium attenuatum*. En general, las características macroscópicas fueron muy similares entre las cepas aisladas; la diferencia más notable fue la coloración producida en el medio de cultivo, al observar la parte inferior del plato Petri. Las cepas que tuvieron coloración de blanco a amarillo oliva tuvieron un menor crecimiento radial. Se encontraron diferencias estadísticas significativas en cuanto al tamaño y producción de conidios ($p < 0.0001$). Las cepas que registraron los valores más bajos de producción de conidios fueron aquellas que tuvieron conidios de mayor tamaño. Los resultados obtenidos son el primer reporte que evidencia al género *Simplicillium* como controlador natural de *H. vastatrix* en Costa Rica.

En el tercer capítulo se evaluaron cuatro medios de cultivo líquidos para la producción de blastosporas de *Simplicillium* sp. Dos de estos medios contemplaron fuentes locales alternativas de carbono y nitrógeno (medios BS y BQ). Como control se utilizó un medio comúnmente usado en laboratorio con fuentes comerciales de nitrógeno y carbono (MB), y como cuarto tratamiento se utilizó el medio Jackson (1997). La producción de blastosporas de *Simplicillium* fue afectada por los diferentes medios evaluados a través del tiempo ($p < 0.0001$). En general, los medios BQ y BS registraron una mayor producción de blastosporas. La curva de producción en estos medios tuvo un comportamiento muy similar. El valor máximo de producción de blastosporas para ambos medios fue el día 14 después de la inoculación, donde BQ fue superior alcanzando 1.2×10^8 blastosporas/mL, mientras que el valor máximo para BS fue de 4.8×10^7 con el mismo tiempo de

fermentación. El pico de producción en estos medios se alcanzó seis días después que el medio Jackson y nueve días después que el medio MB; en el periodo que estos dos últimos medios alcanzaron la máxima producción, los medios BQ y BS rindieron 100 veces más que el medio MB y 10 veces más que el medio Jackson.

El cuarto capítulo tuvo por objetivo comparar la eficacia de cepas locales de *Simplicillium*, una cepa artesanal y dos cepas comerciales de micoparásitos destinados al control de *H. vastatrix* en Costa Rica. El estudio comprendió ocho cepas de hongos, cinco de ellas fueron aisladas para este estudio en la zona cafetalera de Turrialba (San Juan Norte, Santa Rosa, Aquiares, Jabillos y CATIE) y tres biofungicidas (C1, C2 e INA) recomendados para combatir la roya en Costa Rica. La cepa aislada en CATIE colonizó en menor tiempo las pústulas de roya. Los aislamientos locales presentaron un mayor grado de virulencia que el resto de las cepas; dentro de estas últimas, el biofungicida más eficiente fue el proveniente de INA, el cual tiene como ingrediente activo *Simplicillium* sp., mismo género que cepas locales. Hasta nuestro conocimiento, estos son los primeros resultados que anteponen a *Simplicillium* como el principal enemigo natural (micoparásito) de *H. vastatrix* en Costa Rica. En la evaluación de campo durante el 2016, la diferencia más notable fue de cuatro puntos porcentuales entre el tratamiento donde se comparó el efecto de la aplicación de blastosporas de *Simplicillium* (cepa CATIE) contra un testigo sin aplicación. A pesar de la especificidad que demuestra *Simplicillium* hacia *H. vastatrix*, los resultados obtenidos en campo no aumentaron significativamente el porcentaje de parasitismo respecto al control natural. Durante el 2017 la incidencia de roya en la parcela donde se llevó a cabo el ensayo fue baja. El número de lesiones de roya por hoja no fue perceptible y por ende el efecto del parasitismo de *Simplicillium* sobre estas se vio “diluido”, impidiendo obtener resultados concluyentes sobre el potencial de control de las cepas seleccionadas bajo condiciones de campo.

El quinto capítulo abordó el análisis de diversidad genética en biofermentos (bioles) aplicados en café para mejorar el vigor de las plantas y disminuir la incidencia de roya; para esto se determinó la composición microbiana de un fermentado utilizado como base para la producción de bioles, conocido como microorganismos de montaña (MM) y la riqueza biológica de bioles provenientes de diferentes fabricantes y producidos con diferentes sales minerales. También se estudió el efecto antagónico individual de microorganismos aislados de estos biofermentos y el efecto de metabolitos secundarios de estos contra *Cercospora coffeicola* en cultivo *in vitro*. Tanto los MM como los bioles poseen una carga genética diversa para hongos y bacterias (índices de diversidad de Shannon superiores a 3 en las muestras analizadas). El proceso de fermentación de los bioles que conlleva la inclusión de sales minerales afecta negativamente la viabilidad de la población microbiana que estos puedan contener. De manera particular, aquellas muestras a las que se añadió alguna fuente de cobre no tuvieron crecimiento en los medios en que fueron sembrados. De acuerdo a las pruebas de cultivos duales y evaluación de metabolitos secundarios, se determinó que el efecto antagónico producido por los bioles estudiados hacia *C. coffeicola* está determinado por el efecto directo de los microorganismos presentes y no por la producción de metabolitos secundarios.

SUMMARY

In the first chapter, two commercial and two artisanal products were analyzed, both used to control coffee rust in Costa Rica. The assessed variables were: purity, concentration, viability and also a taxonomic identification was made for the four products, additionally a commercial and an artisanal product were molecularly identified to corroborate our results. Spores concentration was higher in commercial products, nevertheless, they recorded the lowest purity and viability percentages. The absence of contaminants in both artisanal products (INA and Producer) points out that it is possible to obtain good quality products on a small scale. The taxonomic and molecular identification coincide with the genus *Lecanicillium*, which is stated by commercial products. Otherwise, in artisanal products it is stated that contain *Lecanicillium* and the results we obtained indicate the genus *Simplicillium*.

In the second chapter seven strains of fungi associated with natural control of *Hemileia vastatrix* were studied, five of them were isolated from the coffee region of Turrialba, Cartago, CR and three were commercial strains. A molecular identification, cultural and physiological characterization were made. The ADN analysis of the five local strains of fungi associated with the Natural Biological Control (CBN) of *H. vastatrix* showed a 99% identity with the genus *Simplicillium*, with the exception of the EC strain, which showed 98% identity with this genus. One of the strains distributed for the biological control of coffee rust in Costa Rica coincided 99% with the genus *Simplicillium*, the other one was identified as *Lecanicillium attenuatum*. Macroscopic characteristics were very similar between the isolated strains, the most notable difference was the coloration seen on the lower part of the Petri dish; the strains that had a change in coloration from white to brown had a lower radial growth. Significant statistical differences were found in size and production of conidia ($p < 0.0001$). The strains that recorded the lowest values of conidia production were those that had larger conidia. The results obtained are the first report pointing out the genus *Simplicillium* as a natural controller of *H. vastatrix* in Costa Rica.

In the third chapter, four liquid culture media were assessed for the production of *Simplicillium* sp. blastospores. Two of them using alternative local sources of carbon and nitrogen (BS and BQ media). On the other hand, a medium commonly used in the laboratory with commercial sources of nitrogen and carbon (MB), and a fourth treatment was Jackson (1997). The production of blastospores of *Simplicillium* was affected by the different media evaluated for the duration of time ($p < 0.0001$). Overall, BQ and BS media recorded a higher production of blastospores. The production curve in these media had a very similar performance. The maximum production value of blastospores for both media was on day 14 after inoculation, where BQ was higher reaching 1.2×10^8 spores / mL, maximum value for BS was 4.8×10^7 . The production peak in these media was reached six days after the Jackson medium and nine days after the MB medium, in the period that these last two media reached maximum production, the proposed media yielded 100 times more than the MB medium and 10 times more than Jackson media. The most notable difference was recorded between BQ medium and MB medium, BQ yielded 1000 times more than MB.

The fourth chapter aimed to select a local strain of *Simplicillium* with a high degree of virulence, as well as to assess the efficiency of commercial strains of mycoparasites for the control of *H. vastatrix* in Costa Rica. The study included eight strains of fungi, five of them were isolated from the coffee region of Turrialba, and three biopesticides recommended to control coffee rust in Costa Rica. The EC strain showed to be the most effective, by colonizing coffee rust pustules in a shorter time. This strain was compared with commercial formulations after two successive passes in PDA and after having stored it on filter paper. The local isolates presented a greater degree of specificity than the rest of the strains. Regarding biopesticides recommended to control coffee rust, the most efficient was the product based on *Simplicillium* (same genus than local strains). This is the first report pointing out *Simplicillium* as the main natural enemy of *H. vastatrix* in Costa Rica. In the field evaluation during 2016 the most notable difference was four percentage points between the treatment where blastospores were applied and the control without application. Despite the specificity shown by *Simplicillium* towards *H. vastatrix*, the results obtained in the field did not significantly increase the parasitism percentage regard to CN. During the year 2017 the occurrence of coffee rust was low on the plot where the trial was carried out. The number of coffee rust lesions per leaf were not noticeable, therefore the effect of the parasitism of *Simplicillium* on these was "diluted".

The fifth chapter aimed to analyze genetic diversity, for which a general quantification was made on the microbial composition of mountain microorganisms (MM) and "bioles". The individual antagonistic effect of microorganisms isolated from bioles and the effect of secondary metabolites of these against *Cercospora coffeicola* was also studied. Both MM and bioles have a very diverse genetic load, for both fungi and bacteria (Shannon diversity indexes greater than 3 in the analyzed samples). The process of fermentation of bioles that involves adding mineral salts, affects the viability of microbial population, specially, those samples to which a copper source was added had no growth in the media in which they were grown. According to the dual tests and evaluation of secondary metabolites, antagonistic effect of bioles towards *C. coffeicola* is determined by the individual effect of microorganisms present and not due to secondary metabolites these contain.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El control de plagas de importancia económica en la agricultura ha sido dominado por el uso de insecticidas químicos, pero debido a efectos no deseables en organismos benéficos, aguas subterráneas, inocuidad de alimentos y desarrollo de resistencia en insectos, se ha puesto énfasis en la investigación de nuevas opciones para el manejo de plagas y enfermedades (Shahid *et al.* 2012). Actualmente, el uso de bioplaguicidas es una herramienta para mejorar las estrategias de uso racional de insecticidas por lo que el desarrollo de nuevos productos deberá, además de ser efectivo, competir económicamente con el sistema de manejo convencional de plagas (Khater 2012). El control biológico de organismos dañinos en ocasiones hace uso de bioplaguicidas, pero la mayoría de estos productos no entran dentro del concepto de control biológico. Este término incluye a enemigos naturales: depredadores, parasitoides y patógenos (Rodríguez 2007; Bailey *et al.* 2010). Eilenberg *et al.* (2001) señala que también los virus pueden ser incluidos en los programas de control biológico, pero no los metabolitos o genes obtenidos de organismos. La eficiencia del control biológico varía de acuerdo a la densidad del organismo plaga, y la mayoría de técnicas que integran el uso de bioplaguicidas, ejercen un control de organismos dañinos independientemente de su densidad (Rodríguez 2007). Los bioplaguicidas también son una herramienta de manejo sostenible de organismos dañinos; incluyen patógenos como plaguicidas microbiales pero además productos bioquímicos. Los primeros contienen en su formulación bacterias, hongos, virus y nemátodos; los segundos contemplan diferentes extractos de plantas, feromonas, arcillas, bicarbonato de potasio, genes y enzimas usadas como ingredientes activos (Cao *et al.* 2010; Gasic y Tanovic 2013). Dentro de este grupo de plaguicidas, los hongos entomopatógenos son una alternativa de las más promisorias para el manejo de organismos dañinos (Mahmoud 2009; Bastidas *et al.* 2009), y a la vez una estrategia para reducir el uso de plaguicidas sintéticos. La mayoría de los bioplaguicidas comerciales a base de hongos entomopatógenos son formulados a base de *Metarhizium*, *Beauveria*, *Lecanicillium* e *Isaria*, los cuales son fáciles y económicos de multiplicar a gran escala (Vega *et al.* 2009). De manera general, casi todos los insectos son susceptibles al ataque de hongos entomopatógenos (González *et al.* 2012).

Por otra parte, existe un creciente interés en el uso de enmiendas orgánicas líquidas (“tés de composta” y “bioles”) para el manejo de organismos dañinos. Estos productos son hechos mezclando agua, composta y diferentes fuentes nutricionales durante un proceso de fermentación anaeróbica; otros pueden ser elaborados en presencia de oxígeno (Scheuerell y Mahaffee 2006). En países como Costa Rica se hace uso de “bioles”, los cuales son enmiendas orgánicas enriquecidas con microorganismos aislados del manto de suelos montañosos. Estos productos, además de ser utilizados como biofertilizantes, son aplicados también para el manejo de plagas y enfermedades (Infoagro 2012); incluso, se llegan a considerar como una técnica factible para mejorar la calidad del suelo (Campo *et al.* 2014). Hasta la fecha, se puede decir que son muy escasos los casos donde se corrobora científicamente sus alcances, razón por la cual se vuelve fundamental la investigación al respecto.

El uso de bioplaguicidas en general, es una técnica más para fortalecer los programas de manejo integrado de plagas (MIP). Sin embargo, existe una gran cantidad de desafíos a superar durante el

proceso de desarrollo y aplicación para asegurar su buen funcionamiento. Por lo anterior, es necesario llevar a cabo investigación dirigida al proceso de producción, formulación, almacenamiento y aplicación de bioplaguicidas (Gasic y Tanovic 2013), que permitan esclarecer las causas de pérdida de viabilidad en cada uno de los pasos de producción (Boteyenko *et al.* 1998).

Debido a lo anterior, la evaluación constante de bioplaguicidas comerciales y artesanales se vuelve crucial, ya que en ocasiones estos pueden no reunir los requisitos mínimos de calidad para lograr niveles aceptables de efectividad contra el organismo al cual van dirigidos. Por ejemplo, en México se ha demostrado que aislamientos nativos de *M. anisopliae* son más efectivos que formulaciones comerciales importadas para el control de *Bemisia tabaci* (Ruíz *et al.* 2011). En Colombia, al evaluar cuatro formulaciones comerciales de *L. lecanii*, una de *Beauveria* y otra de *Paecilomyces*, se evidenció que cinco de estos productos no contenían ni el 40% de la cantidad de conidios que especificaba la etiqueta; también, únicamente uno de ellos presentó una germinación aceptable y lo que es más grave aún, en las pruebas de pureza en tres de estos formulados no hubo crecimiento del entomopatógeno pero si de contaminantes como *Penicillium* y *Aspergillus* (Alean *et al.* 2004).

Ante lo expuesto anteriormente y frente a la creciente necesidad de los productores y la presión de los consumidores de un menor uso de plaguicidas convencionales, el presente estudio tuvo por objetivo generar información científica que permita comprobar la eficacia de cepas locales y de preparados biológicos artesanales cuya composición y aporte para el control de problemas fitosanitarios no ha sido cuantitativamente analizada, y analizar la calidad y posibilidades de mejora en los procesos de producción de hongos entomopatógenos y antagonistas que se ofrecen en el mercado formulados como bioplaguicidas para controlar la roya del café.

Literatura citada

- Alean C, I; Morales R, A.; Holguín A, C. M; Bellotti, A. C. 2004. Patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de *Aleurotrachelus sociales* (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. *Rev Colomb. Entomol.* 30(1):29–36.
- Bailey, A; Chandler, D; Grant, W. P; Greaves, J; Prince, G; Tatchell, M. 2010. *Biopesticides: Pest Management and Regulation*. London, United Kingdom, CAB International. 232 p.
- Bastidas, A; E. Velásquez S.; P. Marín M.; P. Benavides M; A. E. Bustillo P; F. J. Orozco C. 2009. Evaluación de preformulados de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, para el control de la broca del café. *Agron.* 17(1):44–61.
- Boyetchko, S; Pedersen E; Punja Z; Reddy M. 1998. Formulation of Biopesticides. *In* Hall, F. R.; Menn, J. J (eds.) *Biopesticides: Use and Delivery Methods in Biotechnology*. p. 487–508.
- Cao, C; Park S; McSpadden B. B. 2010. *Biopesticide controls of plant diseases: resources and products for organic farmers in Ohio*. Ohio, United States of America, The Ohio State University. (FACT SHEET. SAG 18-10).

- Campo, M. A. P; Acosta S. R. L; Morales V. S; Alonso P. F. 2014. Evaluación de microorganismos de montaña (MM) en la producción de acelga en la meseta de Popayán. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial* 12(1):79–87.
- Eilenberg, J; Hajek A; Lomer C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46(4):387–400.
- Gasic, S; Tanovic B. 2013. Biopesticide formulations, possibility of application and future trends. *Pestic. Phytomed. (Belgrade)* 28(2):97–102.
- González, C. M.; Noé A. C; Rodríguez H. R. 2012. Control de insectos plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: Retos y perspectivas. *Rev. Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila* 8(4):42–55.
- Infoagro. 2016. Elaboración de MM, bioles y biopesticidas en Costa Rica (en línea) Disponible en www.infoagro.go.cr/.../elaboracion%20Abonos%20y%20bioles%20nov%202012.pdf.
- Jackson, M. A; McGuire, M. R., Lacey, L. A; Wraight. S. P. 1997. Liquid Culture Production of Desiccation Tolerant Blastospores of the Bioinsecticidal Fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol. Res.* 101(1):35–41.
- Khater, H. F. 2012. Prospects of botanical biopesticides in insect pest management. *J. of Applied Pharmaceutical Science* 02(05):244–259.
- Mahmoud, M.G. 2009. Pathogenicity of three commercial products of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisoplae* and *Lecanicillium lecanii* against adults of olive fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae) in the laboratory. *Plant Protect. Sci.* 45(3):98–102.
- Rodríguez – del Bosque, L. A. 2007. Fundamentos Ecológicos del Control Biológico. *In* Rodríguez – del Bosque, L. A; Arredondo B, H. C. (eds.). *Teoría y aplicación del Control Biológico*. México D. F., México, Sociedad Mexicana de Control Biológico. p. 19-35.
- Ruíz, S. E; Chan C. W; Pérez G. A; Cristobal A. J; Uch V. B; Tun S. J. M; Munguía R. R. 2011. Crecimiento, esporulación y germinación *in vitro* de cinco cepas de *Metarhizium* y su virulencia en huevos y ninfas de *Bemisia tabaci*. *Rev. Mex. de Micología* 33:9–15.
- Shaid, A. A; Rao Q. A; Bakhsh A; Husnain T. 2012. Entomopathogenic fungi as biological controllers: New insights into their virulence and pathogenicity. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 64(1):21-42.
- Scheuerell, S. J; Mahaffe W. F. 2006. Variability associated with suppression of gray mold (*Botrytis cinerea*) on geranium by foliar applications of nonaerated and aerated compost teas. *Plant Dis.* 90:1201- 1208.
- Vega, E. F; Goettel M.S; Blackwell M; Chandler D; Jackson M. A; Keller S; Koike M; Maniania N. K; Monzon A; Ownley B. H; Pell J. K; Rangel D. E. N; Roy H. E. 2009. Fungal entomopathogens: New insights on their ecology. *Fungal Ecology* (2):149-159.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

Generar información científica sobre los principales hiperparásitos que controlan naturalmente la roya (*Hemileia vastatrix* Berkeley y Broome) en cafetales de Costa Rica y comparar su eficacia con la de formulados comerciales disponibles en el país para el manejo de este fitoparásito.

1.1.2. Objetivos específicos

1. Analizar algunos parámetros de calidad de productos comerciales y artesanales para el control de *H. vastatrix* en Costa Rica.
2. Identificar y caracterizar cepas de hongos hiperparásitos de *H. vastatrix*.
3. Evaluar medios de producción de hongos hiperparásitos de *H. vastatrix*.
4. Medir la eficacia de cepas locales y comerciales en el control de *H. vastatrix*.
5. Determinar la composición microbiana y el efecto de los biofermentos ("bioles") en el control de *Cercospora coffeicola*.

1.2. Hipótesis

1. Los parámetros de calidad de bioplaguicidas comerciales y artesanales no se cumplen.
2. Existen especies de hongos no reportadas como enemigos naturales de *H. vastatrix* en Costa Rica.
3. Es factible reproducir masivamente hongos hiperparásitos de *H. vastatrix*.
4. Existen cepas locales con mayor grado de virulencia que cepas comerciales recomendadas para el control de *H. vastatrix*.
5. La composición microbiana de biofermentos tiene un efecto antagónico sobre *C. coffeicola*.

Capítulo I. Evaluación de la calidad de productos biológicos comerciales y artesanales para el control de la roya *Hemileia vastatrix* Berkeley y Broome en Costa Rica

Resumen

Se analizaron dos productos comerciales (C1 y C2) y dos artesanales (INA y Productor), destinados al control de la roya del café en Costa Rica. Las variables evaluadas fueron: pureza, concentración, viabilidad e identificación taxonómica para ingredientes activos en los cuatro productos. Adicionalmente se identificaron molecularmente un producto comercial y uno artesanal para corroborar los resultados de la identificación taxonómica por morfología de los microorganismos.

La concentración de esporas fue superior en los productos comerciales, pero estos registraron los menores porcentajes de pureza y viabilidad. La ausencia de contaminantes en cultivos de ambos productos artesanales indica que es posible obtener productos de buena calidad a baja escala. La identificación taxonómica y molecular de los productos comerciales coincide con el género *Lecanicillium* que estipulan sus etiquetas. Contrariamente, en los productos artesanales se indica que contienen *Lecanicillium*, sin embargo, los resultados obtenidos lo clasifican como *Simplicillium*.

1. Introducción

Los bioplaguicidas representan una pequeña fracción dentro del total de plaguicidas comercializados, equivalente al 2.5% en ventas (Bailey *et al.* 2010). No obstante, existe un crecimiento acelerado de bioplaguicidas; la tasa de crecimiento anual compuesta de cinco años es del 16%, mientras que la de los insecticidas convencionales es del 3% (Marrone 2007). Los insecticidas microbiales dominan este grupo de bioplaguicidas (Kabaluk y Gazdik 2007). Este rápido ascenso en este grupo de productos destinados a la protección de cultivos y la técnica de producción de entomopatógenos relativamente sencilla, ha propiciado que en ocasiones estos se comercialicen sin un respaldo técnico a la hora de hacer las recomendaciones de uso. Igualmente, es importante dar seguimiento a los productos comercializados actualmente, ya que una gran parte de los entomopatógenos presentan una especificidad muy marcada; por ejemplo, formulaciones comerciales del hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin son eficaces para controlar ciertas plagas en regiones subtropicales de Norteamérica y otras zonas, pero han resultado ineficaces cuando se usan en Centroamérica (Carballo *et al.* 2000). Es muy común que los fabricantes de micoinsecticidas tengan estrategias mercadotécnicas en donde se resta importancia al fundamento técnico para la eficacia de estos. Las etiquetas de muchos de estos productos recomiendan su uso para una gran variedad de insectos, lo cual resulta arriesgado por lo indicado anteriormente. Ante esto, se corre el riesgo de que no se obtengan los resultados deseados para el control de plagas y los productores empiecen a desconfiar del control biológico y confiar más en productos convencionales.

Un aspecto fundamental durante el proceso de producción de bioplaguicidas es el sistema de control de calidad empleado, ya que si esto se pasa por alto, los resultados esperados seguramente no se alcanzarán. Además, se corre el riesgo de que el usuario final desconfíe de los bioplaguicidas y con esto se retrase su adopción. Por otra parte, también existe la posibilidad de que el producto final tenga contaminantes perjudiciales para la salud humana.

El primer paso del control de calidad en la producción de bioplaguicidas es la correcta identificación del ingrediente activo. Para el caso de entomopatógenos, se deberá recurrir a taxónomos especialistas; actualmente el uso de marcadores moleculares es una técnica adecuada para tales fines (Jenkins y Grzywacz 2003). Una vez que se tiene la certeza de que lo que se está produciendo es lo que se busca, se debe mantener una cepa madre del bioplaguicida bajo condiciones de almacenamiento que garanticen su estabilidad genética a largo plazo. Para ello, los métodos más utilizados son la liofilización y la criopreservación. El control de calidad de agentes biológicos debe seguir durante todo el proceso de producción y posterior a este.

A diferencia de los insecticidas químicos en donde basta un análisis químico para evaluar su calidad, los parámetros de calidad en los bioplaguicidas deben ser evaluados minuciosamente (Jenkins y Grzywacz 2003). Es importante mencionar que en países donde el registro de bioplaguicidas es obligatorio, se debe contar con una descripción completa del proceso de producción (McClintock 1999) y, aunque es difícil estandarizar un protocolo de control de calidad para todos los microorganismos, en la producción de hongos entomopatógenos se pueden citar los principales parámetros a evaluar: pureza o no presencia de contaminantes, concentración, viabilidad y finalmente la efectividad contra el organismo objetivo (Monzón 2001). Estos parámetros deberán ser registrados en cada lote de producción.

La detección de contaminantes debe ser constante durante todos los pasos que contempla el proceso de producción. El método más sencillo para esto es tomar muestras del medio (antes y después de la inoculación) para después hacer una siembra sobre un medio agarizado; los medios Papa Dextrosa Agar (PDA) y Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) son comúnmente usados. Después de la siembra se incuban a 25°C por dos a tres días para observar si hay presencia de bacterias u hongos contaminantes; si se detectara alguno, se deberá implementar una estrategia para eliminarlo. De no ser posible su eliminación, el lote de producción deberá ser descartado (Jenkins y Grzywacz 2003).

En cuanto al rendimiento, la concentración final del producto tiene que ser igual o superior al rendimiento promedio de la cepa (Monzón 2001); este punto es medido generalmente mediante conteo directo en cámara Neubauer (Elosegui 2006). Un método práctico para medir la viabilidad de conidios es sembrar alícuotas de una suspensión del sustrato en medio PDA e incubar a 20°C durante 24 horas; después se agrega azul lactofenol para detener la germinación y se cuenta el número de conidios germinados (Cañedo y Ames 2004), el porcentaje de viabilidad debe ser superior a 95% (Monzón 2001).

2. Materiales y métodos

2.1. Productos analizados

Se analizaron dos productos comerciales (C1 y C2) y dos artesanales (INA y Productor), destinados al control de la roya en Costa Rica. Lecano C1 se comercializa sobre el sustrato de producción arroz, debidamente empacado y etiquetado para la venta y C2 en una formulación en polvo mojable. El producto artesanal INA proviene de un centro de capacitación y transferencia de tecnología y Productor proviene de la finca Cristina en Paraíso, Cartago; este biofungicida es producido dentro de la misma finca. El análisis de productos fue inmediatamente después de su colecta. Además, por nuestra parte hicimos una formulación de *Simplicillium* en polvo de la cepa aislada de CATIE para comparar pérdidas durante el proceso de formulación. Inicialmente el hongo fue producido en medio líquido BSQ (ver composición y metodología en Capítulo III). Mediante pruebas de ensayo y error. La metodología usada para la formulación fue la siguiente:

1. Un litro de medio BSQ con una concentración inicial de 1×10^7 blastosporas más micelio se licuó para separar propágulos.
2. Después el medio fue pasado tres veces por una descremadora de leche para separar los sólidos, los cuales fueron colocados en un mortero para ser mezclados con los componentes inertes de la formulación.
3. En el proceso de formulación se agregó sílica en polvo como agente de flujo libre y celite para aumentar el volumen. Luego se maceró y mezcló para homogenizar la mezcla.
4. El polvo obtenido, con un porcentaje de humedad inicial de 53.95, fue colocado en una bandeja plástica en un cuarto con aire acondicionado para acelerar el secado. Después de 24 horas el porcentaje de humedad disminuyó hasta 4.3%.

2.2. Variables y metodología para su medición

Las variables evaluadas fueron: 1) **pureza**, 2) **concentración** y 3) **viabilidad**. Estas variables son un factor clave durante el proceso de producción de entomopatógenos para asegurar la calidad del organismo que se está produciendo. También son parte fundamental para lograr el objetivo final en campo (Fernández y Vega 2006).

La variable 1 se midió mediante un proceso descriptivo y visual (Monzón 2001); se hicieron rayados de los diferentes productos en cajas Petri que contenían medio de cultivo Agar Nutriente, con el fin de detectar unidades formadoras de colonias (ufc) ajenas al ingrediente activo que indicaba el producto. Para asegurar que los posibles contaminantes detectados provinieron del producto y no fueron obtenidos durante el proceso de inoculación, se hizo un rayado con agua destilada estéril (ADE) como control. Para determinar y corroborar la concentración de conidios se hicieron diluciones seriadas, tomando 1 g del producto original y se suspendió en 9 mL de ADE más Tween 80 a 0.1%. De esta suspensión se tomó 1 mL para nuevamente ser suspendido en 9 mL de ADE; este procedimiento se repitió hasta obtener una concentración de esporas que permitiera

su conteo en cámara de Neubauer, usando el método propuesto por Cañedo y Ames (2004). Se utilizaron un total de 10 repeticiones (cajas Petri) por producto a evaluar para ambas variables.

Para estimar la viabilidad de conidios se tomó un gramo de bioplaguicida para luego hacer diluciones seriadas en ADE más Tween 80 al 0.1% al igual que en las dos variables anteriores. Después se tomó aquella dilución que permitió la correcta observación de conidios y del tubo germinativo sólo se tomaron en cuenta aquellos cuya longitud fue superior al largo del conidio del que procedían. Finalmente se hizo una relación entre conidios germinados y no germinados para determinar el porcentaje de viabilidad.

Para la formulación hecha a partir del medio BSQ se contabilizaron ufc y porcentaje de pureza al final de los pasos 1, 2 y 4 descritos en el apartado anterior.

2.3. Identificación taxonómica

Para identificar el ingrediente activo de las formulaciones se hicieron aislamientos de colonias puras del microorganismo para luego utilizar las claves taxonómicas propuestas por Zare y Gams (2001) y Zare y Gams (2004). Las observaciones de conidios y arreglo de fiálides fueron hechas utilizando una cámara OMAX ToupView© x86, montada a un microscopio compuesto. Además de lo anterior, se realizó una identificación molecular para el producto comercial C1 y para el artesanal INA para de esta manera, corroborar la identificación taxonómica por características morfológicas. La identificación molecular se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Corporación Bananera Nacional de Costa Rica (Corbana).

3. Resultados

Cuadro1. Concentración, pureza y viabilidad de productos comerciales y artesanales destinados al control de roya en Costa Rica

Bioplaguicida	Concentración	Pureza (%)	Viabilidad (%)	Organismo identificado
C1	4.25X10 ⁸	40.7	10.5	<i>Lecanicillium attenuatum</i>
C2	2.2X10 ¹⁰	15	5	<i>Lecanicillium</i>
INA	8.65X10 ⁸	100	54	<i>Simplicillium</i>
Productor	1.1X10 ⁸	100	91	<i>Simplicillium</i>

El producto comercial con mayor concentración de conidios fue C2, éste producto presentó 51.76 veces más conidios que el otro producto comercial (C1). Este último registró la mitad de conidios que el producto artesanal INA y 0.38 veces más que el bioplaguicida Productor, siendo este el menor concentración de conidios.

Los productos con menor grado de pureza fueron C2 y C1, con 15 y 40.76%, respectivamente. A diferencia de los productos artesanales en donde no se registraron colonias de contaminantes (Cuadro 1). Respecto al formulado de *Simplicillium* en polvo, formulado por nuestra cuenta, se partió de un 100% de pureza en el medio en el cual se produjo el propágulo, ese mismo porcentaje se mantuvo en el primer paso de formulación, se registró una disminución de 5% al obtener el supernatante y al final del secado el porcentaje de pureza disminuyó 15% (Cuadro 2).

Al igual que la variable anterior, los productos comerciales fueron los que registraron los valores más bajos de viabilidad de conidios. El producto INA superó ligeramente el 50% de viabilidad mientras que el bioplaguicida productor alcanzó más de 90% (Cuadro 1). La cantidad de ufc en la formulación de *Simplicillium* disminuyó de 3.2×10^{10} a 2.3×10^8 del primer a segundo paso del proceso; no se registró una disminución de ufc al final (Cuadro 2).

En cuanto a la identificación taxonómica y molecular, los productos comerciales coincidieron con el género *Lecanicillium*, indicado por ambos productos como ingrediente activo. El producto C1, al cual se le hizo identificación molecular, coincidió en un 99 % con *L. attenuatum*. Por otra parte, la identificación taxonómica de productos artesanales indicó que ambos bioplaguicidas contenían el género *Simplicillium*. Una causa posible para que estos fueran confundidos con *Lecanicillium* es por la semejanza de las características macroscópicas que ambos géneros comparten. La identificación molecular para el producto INA coincidió en un 99% con el género *Simplicillium*, por lo que se corroboran nuestras observaciones (ver anexos 1 y 2).

Cuadro2. Concentración y pureza durante el proceso de formulación en polvo de *Simplicillium*

Pasos	Concentración (ufc)	Pureza (%)
1. Licuado del medio	3.2×10^{10}	100
2. Obtención del supernatante	2.3×10^8	95
4. Secado del producto	3×10^8	85

4. Discusión

Si bien la concentración de esporas fue superior en los productos comerciales, estos registraron los menores porcentajes de pureza y viabilidad. Se puede apreciar que entre mayor es el grado del proceso de los diferentes productos, menor es la viabilidad de conidios. Una posible explicación sería su afectación durante el proceso de desecación. Al respecto Jackson *et al.* (1997) mencionan que esporas producidas por diferentes hongos son muy susceptibles a este proceso. La viabilidad de conidios tan baja (5%) registradas para el bioplaguicida C2 contrasta con lo reportado por Vargas (2017), quien reportó una viabilidad de 100% para este mismo producto antes de ser evaluado para el control de *H. vastatrix*.

Este contraste se dio también con los datos de pureza, pues mientras que Vargas (2017) reporta un 56% de pureza, nuestros resultados indican un 15%; la mayor cantidad de colonias fue de bacterias contaminantes. Si bien es cierto que el producto analizado en este estudio puede ser de un lote diferente, las diferencias en ambos estudios indican una falta de estabilidad del producto, posiblemente originada desde la conservación de la cepa. Al respecto se evaluó un método de conservación práctico propuesto por Morales (2008), que en otros estudios ha demostrado conservar cepas de hongos hasta por cinco años sin disminuir su patogenicidad y el cual puede ser usado fácilmente por productores artesanales. Este método fue utilizado con una cepa local de *Simplicillium*, la cual fue evaluada un mes después de conservada; los resultados no indicaron pérdida de virulencia contra *H. vastatrix*. Si bien, el tiempo de almacenamiento es corto, se destaca la tolerancia de conidios de *Simplicillium* al proceso de desecación (ver Capítulo IV).

La ausencia de contaminantes en ambos productos artesanales (INA y Productor), indica que es posible obtener productos de buena calidad a baja escala. El producto elaborado por el productor en su finca presentó el grado más alto de viabilidad lo que se puede deber a que la producción se realiza al momento de hacer las aplicaciones en campo, por lo que el producto no es sometido a cambios de temperatura de almacenamiento ni al manipuleo que reciben los demás productos durante todo el proceso. Este hecho fue observado también en el formulado de *Simplicillium*, donde conforme se incrementa el proceso se van obteniendo contaminantes, principalmente bacterias. En este último caso, la cantidad de ufc se vio favorecida con la fragmentación de micelio producida por el licuado del producto, ya que de una concentración inicial de 1×10^7 blastosporas se obtuvieron de inicio 10^{10} ufc. Los valores finales fueron de 10^8 .

La identificación taxonómica y molecular coincidió con el género *Lecanicillium* indicados por los productos comerciales. Contrariamente, en los productos artesanales se indica que contienen *Lecanicillium* y los resultados obtenidos mostraron al género *Simplicillium*. La confusión de ambos géneros puede dar lugar a que estos se apliquen por igual para controlar la roya, cuando se ha demostrado que *Simplicillium* tiene una mayor especificidad hacia *H. vastatrix* (ver Capítulo IV).

5. Literatura citada

- Bailey, A; Chandler D; Grant W. P; Greaves J; Prince G; Tatchell M. 2010. Biopesticides: Pest Management and Regulation. London, United Kingdom, CAB International. 232 p.
- Carballo, M.; Hilje L; Stansly A. P; Arroyo C. Hidalgo J. E; 2000. Evaluación de *Metarhizium anisopliae* en mezcla con aceite para el control de *Bemisia tabaci*. In IX Taller Latinoamericano y del Caribe sobre moscas blancas y geminivirus. Panamá, Panamá. 131 p.
- Cañedo, V; Ames, T. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Lima, Perú, Centro Internacional de la Papa. 62 p.
- Elósegui, O. C. 2006. Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. La Habana, Cuba, INISAV. 61 p.

- Fernández, O; Vega, L. 2006. Temas interesantes acerca del control biológico de plagas. 2a. ed. Venezuela, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. 240 p.
- Jackson, M. A.; McGuire, M. R., Lacey, L. A; Wraight S. P. 1997. Liquid Culture Production of Desiccation Tolerant Blastospores of the Bioinsecticidal Fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. Mycol. Res. 101(1):35-41.
- Jenkins, N.E; Grzywacz, D. 2003. Towards the standardization of quality control of fungal and viral biocontrol agents. In Van Lenteren, J. C. (ed.) Quality Control and Production of Biological Control Agents. Theory and Testing Procedures. CAB International. p. 247-264.
- Kabaluk, J. T; Gazdik, K. 2007. Directory of Microbial Pesticides for Agricultural Crops in OCDE Countries. Agassiz, British Columbia, Agriculture and Agri-Food Canada. 212 p.
- McClintock, J.T. 1999. The Federal Registration Process and Requirements for the United States. In Hall, F.R; Menn, J. J (eds.). Biopesticides: Use and Delivery. New Jersey, United States of America. Humana Press. P. 415-441. (Series Methods in Biotechnology Volume 5).
- Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas (63):95–103.
- Vargas, T. D. A. 2017. Efecto de la aplicación de *Lecanicillium lecanii* sobre la incidencia y severidad de la roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo de café (*Coffea arabica*). Práctica dirigida de Licenciatura en Agronomía. Universidad de Costa Rica. 44 p.
- Zare, R; Gams, W. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. Nova Hedwigia 73:1-50.
- Zare, R; Gams, W. 2004. A monograph of *Verticillium* section *Prostrata*. Rostaniha 3, Supplement):1-188.

Capítulo II. Identificación molecular y caracterización de cepas de hongos hiperparásitos de *Hemileia vastatrix* Berkeley y Broome

Resumen

La roya (*Hemileia vastatrix*) es una de las enfermedades de mayor importancia económica en el cultivo de café, llegando a ocasionar pérdidas en producción de hasta un 50%. Además del control químico convencional de esta enfermedad, existen enemigos naturales que regulan su incidencia y severidad, tal es el caso de hongos micoparásitos. En la presente investigación se estudiaron siete cepas de hongos asociadas al control natural de *H. vastatrix*; cinco de ellas fueron aisladas de la zona cafetalera de Turrialba, Cartago, Costa Rica. También se incluyó una cepa artesanal (INA) y una comercial (C1) para ser utilizadas como control en pruebas de eficacia posteriores. Se realizó una identificación molecular y una caracterización cultural y fisiológica. La secuenciación de las cinco cepas locales de hongos asociadas al control biológico natural (CBN) de *H. vastatrix* mostró una coincidencia del 99% de identidad con el género *Simplicillium* para las cepas provenientes de Aquiares (AQ), Santa Rosa (SR), San Juan Norte (JN) y Jabillos (JV) y del 98% para la cepa EC de CATIE. La cepa artesanal INA coincidió en un 99% con el género *Simplicillium*, mientras que el aislamiento de la cepa comercial C1 fue identificada como *Lecanicillium attenuatum*. En general, las características macroscópicas fueron similares entre las cepas aisladas; la diferencia más notable fue la coloración del medio de cultivo vista por la parte inferior de la caja Petri. Las cepas que tuvieron un cambio de coloración de blanco a marrón tuvieron un menor crecimiento radial.

Se encontraron diferencias estadísticas significativas en cuanto al tamaño y producción de conidios ($p < 0.0001$). Las cepas que registraron los valores más bajos de producción de conidios fueron aquellas que tuvieron conidios de mayor tamaño.

Los resultados obtenidos en la identificación de aislamientos locales de hongos antagonistas son el primer reporte que evidencia al género *Simplicillium* como controlador natural de *H. vastatrix* en Costa Rica.

Palabras clave: Caracterización cultural, caracterización fisiológica, cepas locales, aislamientos.

1. Introducción

Dentro del complejo de enfermedades que atacan al cultivo de café, la roya (*Hemileia vastatrix*) es de las de mayor importancia económica en todas las regiones de producción (Arneson 2000; Avelino *et al.* 2015) ya que puede ocasionar pérdidas superiores al 50% de la cosecha (Haddad *et al.* 2009). El brote más perjudicial de roya en Centroamérica ocurrió en el ciclo 2012 – 2013, donde las pérdidas estimadas fueron superiores a US\$499 millones, razón por la cual varios países consideraron el hecho como una emergencia nacional (Promecafe e IICA 2013).

Las técnicas de control para este patógeno están enfocadas en el uso unilateral de fungicidas convencionales o con aplicaciones de cobre. Los efectos indeseables de estas acciones de manejo

son bien conocidos. Como contraparte, existen enemigos naturales de *H. vastatrix* que regulan su incidencia y severidad; tal es el caso del hongo *Lecanicillium lecanii* (Guharay *et al.* 2001), con el cual se pueden implementar técnicas de manejo sostenibles, y el cual es citado constantemente como controlador biológico de *H. vastatrix* (Monzón 1992; Canjura *et al.* 2002; Vandermeer *et al.* 2009; Rivillas 2015; Pérez 2015). Incluso, al momento de aislar hongos parásitos de roya se llega a asumir que el hongo aislado es *Lecanicillium* (= *Verticillium*), sin pruebas que avalen su identificación, lo cual resulta riesgoso ya que bajo esta asunción se inician trabajos de investigación.

Por lo anterior, la inclusión de nuevos aislamientos de hongos asociados al control natural de plagas o enfermedades requiere una identificación correcta previamente a establecer los experimentos posteriores (Safavi 2010) enfocados a un programa de control biológico. Este aspecto también es considerado fundamental para el control de la calidad en la producción de bioplaguicidas, para lo cual es necesario recurrir a taxónomos especialistas y al uso de marcadores moleculares que es una técnica adecuada para tales fines usada actualmente (Jenkins y Grzywacz 2003). La combinación de técnicas moleculares y la taxonomía basada en características morfológicas es fundamental en la diferenciación de especies y variedades de hongos (Gherbawy y Voigt 2010). Al respecto, James *et al.* (2016), mediante análisis moleculares, encontraron una alta diversidad de hongos en discos de hoja de café infectados con roya. Los autores suponen con base en comparaciones de discos de hoja sin presencia de roya que existen 15 hongos micoparásitos posibles. Desafortunadamente el estudio no culminó con pruebas de efectividad que demostraran si realmente estos hongos poseían algún grado de control sobre *H. vastatrix*. En un estudio reciente realizado en zonas cafetaleras de Veracruz, México, Gómez *et al.* (2017) aislaron y evaluaron hongos micoparásitos sobre pústulas de roya y encontraron niveles superiores de control con un hongo del género *Simplicillium*.

Las principales características morfológicas que se deben observar para nuevos aislamientos son la forma y tamaño y velocidad de germinación de conidios, así como la apariencia (forma, elevación, aspecto de la superficie y color) de la colonia (Diaz y Lecuona 1995; Hajek y Leger 1994). Dichas características, si bien no son útiles para diferenciar aislamientos, pueden estar relacionadas con aspectos fisiológicos y el grado de patogenicidad (Jackson *et al.* 1985), aspecto que debe corroborarse pues puede variar dependiendo de la especie a estudiar; por ejemplo, Diaz y Lecuona (1995) al evaluar características culturales y fisiológicas de cepas de *Beauveria bassiana* Bals. (Vuillemin), no encontraron relación alguna con su patogenicidad contra *Diatraea saccharalis* Fabricius. Caso contrario, estudios realizados con *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sorok por Samuels *et al.* (1989), demostraron que existe correlación entre la velocidad de germinación, crecimiento y producción de conidios con el grado de virulencia para *Nilaparvata lugens* Stal.

El presente estudio tuvo por objetivo hacer una identificación molecular, así como una caracterización cultural y fisiológica de cepas de hongos locales asociadas al control natural de *H. vastatrix*. También, se incluyó una cepa artesanal (INA) y una comercial (C1) usadas para el manejo de roya en cafetales de Costa Rica.

2. Materiales y métodos

2.1. Aislamiento de cepas

Los aislamientos se realizaron durante los meses de octubre y noviembre de 2015. Para ello se colectaron hojas de plantas de café con lesiones de roya en estado avanzado y con presencia de hongos parásitos sobre la misma. El estudio incluyó siete cepas de hongos; cinco fueron aisladas de la zona cafetalera de Turrialba, Cartago, Costa Rica en las localidades de San Juan Norte (SJ), Jabillos (JV), Aquiares (AQ), Santa Rosa (SR) y CATIE (EC). Las parcelas donde se hicieron las colectas se encuentran entre los 600 y 950 msnm. Las dos cepas restantes (INA y OB), a las que únicamente se les hizo la identificación molecular, son recomendadas para combatir la roya en cafetales de Costa Rica. A éstas dos últimas cepas únicamente se hizo la identificación molecular.

Inicialmente se hicieron aislamientos directos haciendo un ligero toque continuo con una aguja entre las pústulas de roya parasitadas y cajas Petri que contenían el medio de cultivo general Papa Dextrosa Agar (PDA). Una vez que hubo crecimiento del hongo, se seleccionaron cultivos puros libres de contaminantes. Después de 10 días de crecimiento, se hicieron aislamientos monospóricos mediante diluciones seriadas. Primero, se hizo una dilución inicial de inóculo en agua destilada estéril más Tween 80 a una concentración de 0.1%; seguido de diluciones hasta 10^{-6} . De las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} se tomó 0.1mL y fueron sembrados en PDA e incubados a 25–28°C. Los medios fueron examinados 24 horas después de la siembra, luego dos veces diarias hasta detectar las primeras colonias. Posteriormente se seleccionaron colonias individuales, las cuales se consideraron provenientes de una sola espora; seguidamente, se re-aislaron en cajas Petri con PDA.

2.2. Identificación molecular

Las cepas monospóricas de los diferentes materiales colectados fueron enviadas al Laboratorio de Biología Molecular de la Corporación Bananera Nacional de Costa Rica (Corbana). Para la secuenciación de las muestras se realizó la extracción del material genético según el protocolo descrito por Kuske *et al.* (1998) con modificaciones hechas por Corbana, seguido de una amplificación de la región ITS del gen 18 S. Los iniciadores utilizados para dicha amplificación fueron ITS1 e ITS4; la corroboración de la amplificación se hizo en un gel al 1% de agarosa. El producto de la amplificación se envió a la empresa Macrogen Inc. para su purificación y secuenciación. Una vez generadas las secuencias se editaron con el programa BioEdit y se compararon en la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information) y su herramienta de Blast, así como en la base de datos de RDP y su herramienta Classifier (Center for Microbial Ecology, Michigan State University).

2.3. Caracterización cultural

2.3.1. Macroscópica

Las características macroscópicas de las cepas evaluadas a nivel de colonias fueron: color, forma, elevación y formación de estrías. Para esto se hicieron observaciones en 10 colonias aisladas en cajas Petri sobre el medio de cultivo PDA, de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 2.1. Las observaciones fueron hechas cuando las cepas tenían 15 días en incubación a 25–28 °C.

2.3.2. Microscópica

Primeramente se determinó el tamaño de muestra para la medición de conidios, lo cual se hizo midiendo diferentes tamaños de muestra y calculando la desviación estándar (DS) en cada uno para observar el número de muestras al cual la DS se estabilizaba (Kranz 1988; Cortez *et al.* 2003). En base a los resultados obtenidos (Figura 1), se hicieron mediciones de conidios en cinco repeticiones (colonias monospóricas de cada cepa). En cada repetición se midieron cuatro grupos de conidios y en cada grupo se observaron 35 conidios. Las mediciones fueron hechas con una cámara OMAX ToupView© x86, montada a un microscopio compuesto y previamente calibrada.

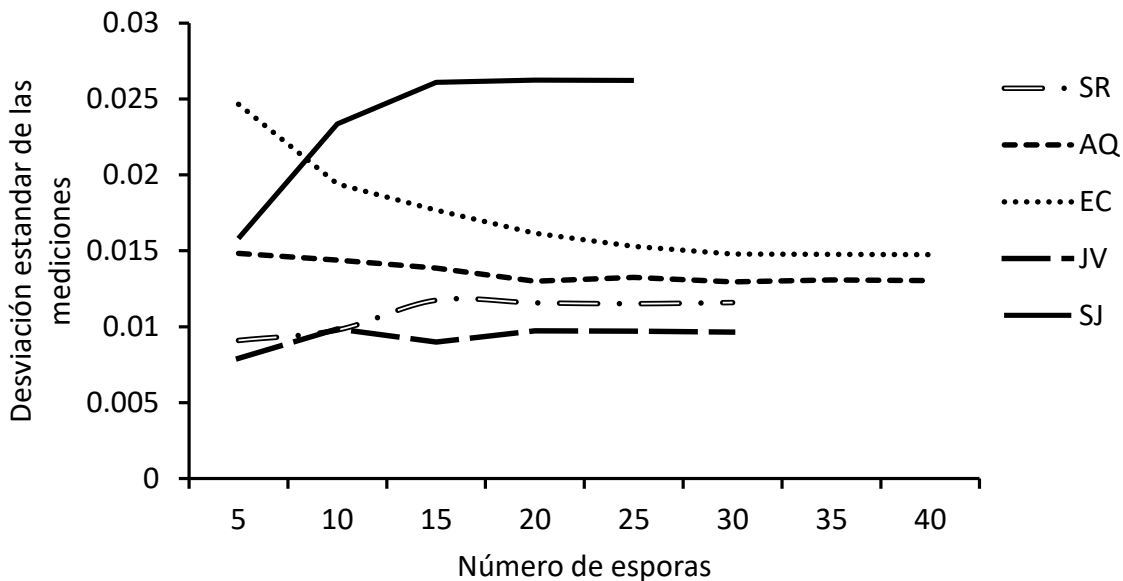


Figura 1. Desviación estándar de diferentes tamaños de muestra para tamaño de conidios de cepas locales de hongos hiperparásitos asociados a *H. vastatrix*

(SR: Cepa proveniente de Santa Rosa, AQ: Aquiares, EC: CATIE, JV: Jabillos, SJ: San Juan Norte)

2.4. Caracterización fisiológica

2.4.1. Crecimiento radial y producción de conidios

Mediante la técnica de diluciones seriadas, cada cepa monospórica fue re-aislada y colocada en el centro de una caja Petri que contenía PDA. Después de 10 días de incubación a 25–28°C y con la ayuda de un vernier digital se promedió el diámetro mayor y menor para obtener el crecimiento radial.

Para estimar la producción de conidios se tomó un cm² de cada cepa monospórica y se diluyó en 10 mL de ADE más Tween 80 al 0.1%. Después se colocó en baño con ultrasonido por tres minutos y luego se agitó en un vortex durante un minuto. Finalmente se hizo el conteo de conidios con la ayuda de una cámara Neubauer. Tanto el crecimiento radial como el conteo de conidios se hicieron para un total de 10 colonias por cepa.

Las cepas INA y C1 no fueron incluidas en la caracterización cultural ni en la fisiológica; únicamente se incluyeron en la identificación molecular con la finalidad de reforzar la identificación taxonómica.

2.5. Análisis estadístico

El experimento se llevó a cabo con un Diseño Completamente al Azar, con 10 repeticiones de una colonia para evaluar el crecimiento radial y cinco para evaluar el tamaño de conidios. El análisis fue hecho mediante Modelos Lineales Generales y Mixtos con el paquete estadístico infostat (Di Rienzo *et al.* 2016).

3. Resultados

3.1. Identificación molecular

La identificación de las cinco cepas locales de hongos asociadas al control biológico natural (CBN) de *H. vastatrix* en la región cafetalera de Turrialba, Cartago, Costa Rica, mostró un 99% de coincidencia con el género *Simplicillium*, a excepción de la cepa EC que mostró un 98% de identidad con este género. La cepa INA coincidió en un 99% con el género *Simplicillium*, mientras que C1 fue identificada como *Lecanicillium attenuatum* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Identificación molecular de cepas locales y comerciales de hongos hiperparásitos asociados a *H. Vastatrix*

Cepa	Organismos coincidentes RDP/UNITE	Confirmación (%)	Organismos coincidentes NCBI	Coincidencia (%)
EC	<i>Simplicillium</i> spp.	95	<i>Simplicillium</i> spp.	98
AQ	<i>Simplicillium</i> spp.	95	<i>Simplicillium</i> spp.	99
SR	<i>Simplicillium</i> spp.	95	<i>Simplicillium</i> spp.	99
SJ	<i>Simplicillium</i> spp.	95	<i>Simplicillium</i> spp.	99
JV	<i>Simplicillium</i> spp.	95	<i>Simplicillium</i> spp.	99
INA	<i>Simplicillium</i> spp.	95	<i>Simplicillium</i> spp.	99
C1	<i>Lecanicillium</i> spp.	95	<i>Lecanicillium attenuatum</i>	99

3.2. Caracterización cultural

3.2.1. Macroscópica

Las diferencias más notables entre las cepas estudiadas se observaron en el cambio de color que se produjo en el medio de cultivo, observado por la parte inferior de la caja Petri. Las cepas JV y SR presentaron color amarillo oliva, mientras que EC, AQ y SJ presentaron colores amarillo, blanco y amarillo pálido, respectivamente. El color blanco del micelio fue una constante para todas las cepas, así como también la forma (circular) y el borde (elevado) no varió entre cepas. Solo AQ presentó abundante formación de estrías en el medio de cultivo durante el crecimiento (Cuadro 4); incluso, estas en ocasiones podían notarse por la parte superior de la colonia (Figura 2).

Cuadro 4. Morfología de cepas de *Simplicillium* spp. aisladas de pústulas de *H. vastatrix*

Cepa	Color arriba/abajo*	Notación Munsell*	Forma	Borde	Relieve	Formación de estrías
EC	Blanco/amarillo	2.5Y 7/8	Circular	Completo	Elevada	Baja
AQ	Blanco/blanco	5Y 8/2	Circular	Completo	Elevada	Abundante
JV	Blanco/amarillo oliva	2.5Y 6/6	Circular	Completo	Elevada	Baja
SR	Blanco/amarillo oliva	2.5Y 6/6	Circular	Completo	Elevada	Baja
SJ	Blanco/amarillo pálido	2.5Y 8/4	Circular	Completo	Elevada	Baja

*La anotación del color de las colonias visto en la parte inferior de la caja Petri fue en base a la escala Munsell (Munsell Color Company 1988).

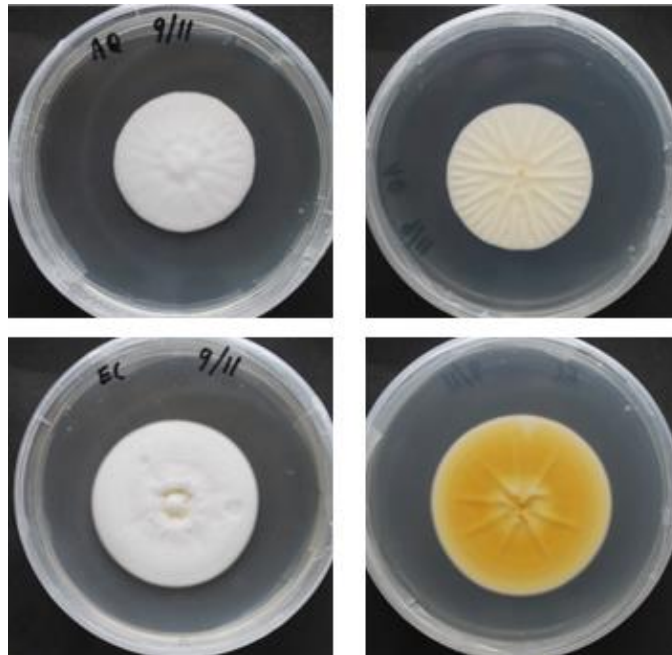


Figura 2. Colonias monospóricas de las cepas AQ (arriba) y EC (abajo), vistas por la parte superior e inferior

3.2.2. Microscópica

3.2.2.1. Tamaño de conidios

Los resultados obtenidos demuestran que existe una diferencia significativa entre cepas ($p < 0.003$) para el tamaño de conidios. Las cepas EC, AQ y JV no difirieron estadísticamente entre sí con tamaños de 1.97, 1.94 y 1.88 μm (DGC = 0.05). Estas cepas registraron valores superiores a las cepas SR (1.75 μm) y SJ (1.73 μm) (Figura 3).

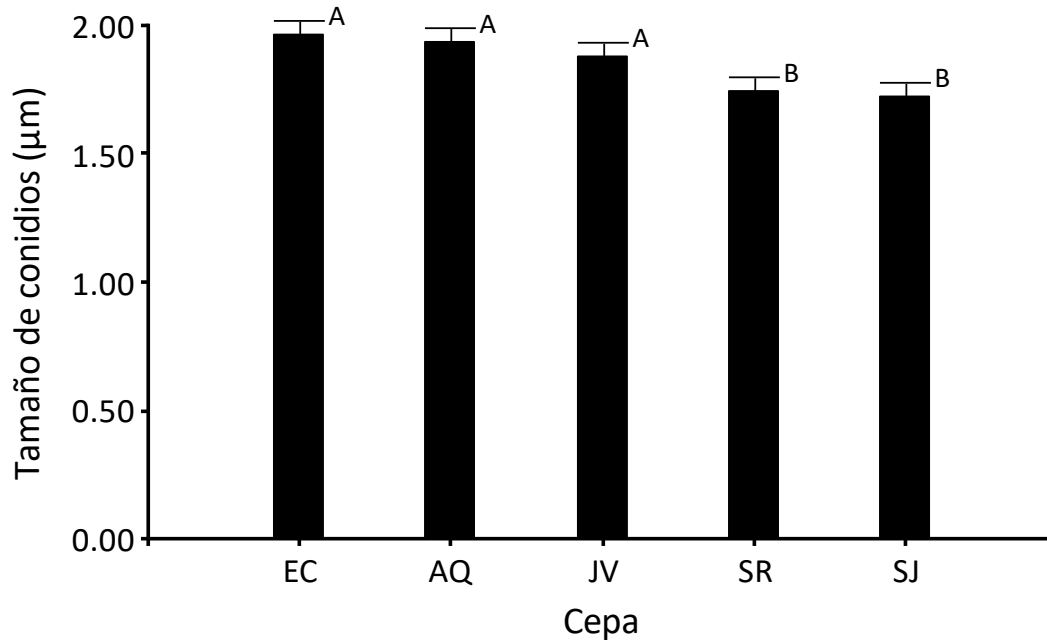


Figura 3. Tamaño de conidios (μm) de cepas locales de *Simplicillium* spp. asociadas al control natural de *H. vastatrix*. Medias con misma letra son estadísticamente iguales (DGC=0.05)

(EC: Cepa proveniente de CATIE; AQ: AQUIARES; JV: Jabillos SR: Santa Rosa; SJ: San Juan Norte)

3.2.2.2. Morfología y disposición de fiálides de *Simplicillium*

La división del género *Verticillium* hecha por Zare y Gams (2001; 2004) basada en estudios sistemáticos, separa los taxones formados por fiálides solitarias del género *Lecanicillium* y los coloca dentro del género denominado *Simplicillium*. Al respecto, las características microscópicas observadas en este estudio, conidios elipsoidales (1.7 a $1.97\mu\text{m}$) contenidas en cabezas globosas suspendidas de fiálides solitarias y en ocasiones postradas (Figura 4), coinciden con lo mencionado por los autores arriba mencionados, quienes también señalan que algunas especies de *Simplicillium* (ej. *lanosoniveum*) se asemejan a *L. lecanii* y *L. muscarium* pero puede ser diferenciada por el tamaño de conidios y la ausencia de fiálides ramificadas en *Simplicillium*. Cortez *et al.* (2003) registraron una variabilidad amplia del tamaño de conidios de diferentes aislamientos de *L. lecanii* ($1.2 - 10.8 \mu\text{m}$). En este estudio la diferencia máxima fue de $0.27 \mu\text{m}$. Por su parte, Gómez *et al.* (2017) registraron tamaño de conidios de 1 a $3 \mu\text{m}$ para una cepa del género *Simplicillium* aislada de pústulas de roya en México.

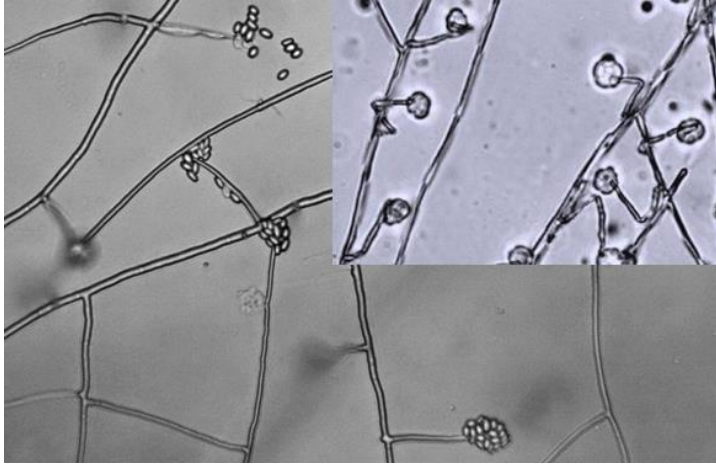


Figura 4. Fiálides solitarias y conidios de *Simplicillium* sp. (cepa EC)

3.3. Caracterización fisiológica

3.3.1. Crecimiento radial

Se registró una diferencia estadísticamente significativa entre cepas en cuanto al crecimiento radial a los cinco y diez días de crecimiento en PDA ($p < 0.0001$). Las cepas que presentaron el mayor crecimiento a los cinco días fueron SJ y EC con 18.9 y 18.39 mm, superiores a SR, AQ y JV con 16.44, 15.67 y 15.65 mm respectivamente, las cuales no difirieron estadísticamente. Después de 10 días de crecimiento, los valores más altos registrados fueron para las cepas SJ (36.1 mm) y EC (33.5 mm), seguidas de AQ (28.8 mm). Las cepas con menor crecimiento fueron SR y JV con 26.8 y 25.7 mm, respectivamente. Lo anterior demuestra una amplia variabilidad dentro de este género (Figura 5).

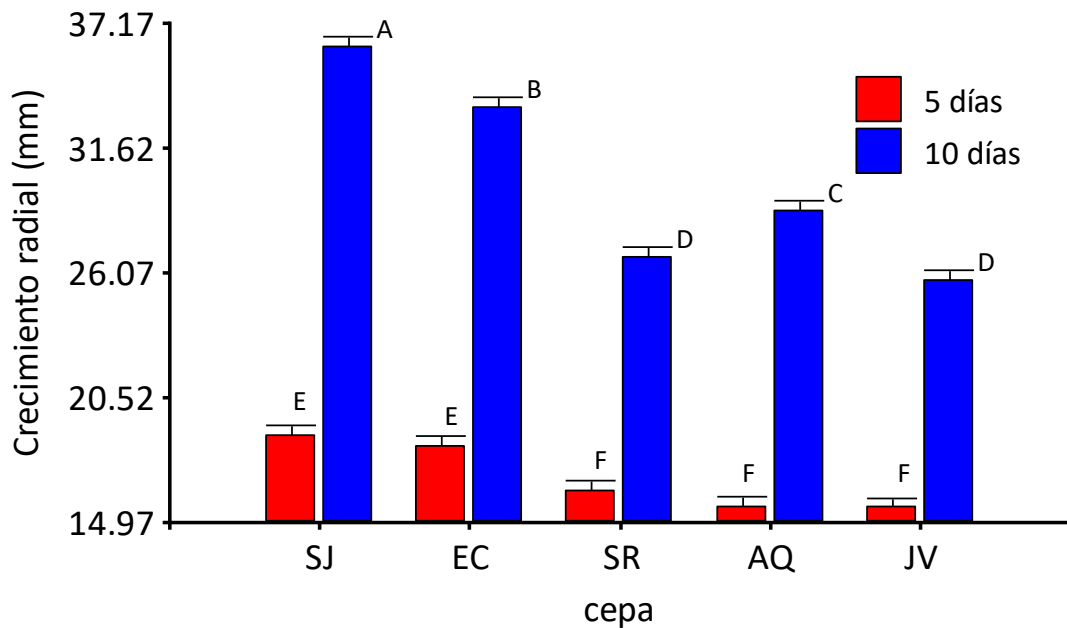


Figura 5. Crecimiento radial (mm) de cepas locales de *Simplicillium* sp. asociadas al control natural de *H. vastatrix*. Medias con la misma letra no difieren estadísticamente (LSD=0.05)

(**SJ**: Cepa proveniente de San Juan Norte; **EC**: CATIE; **SR**: Santa Rosa; **AQ**: AQUIÁRES; **JV**: Jabillos)

3.3.2. Producción de conidios

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la producción de conidios entre las cepas estudiadas ($p < 0.0001$). Las cepas SJ, JV y SR presentaron una mayor producción de conidios con valores de 1.4×10^7 , 1.3×10^7 y 1.2×10^7 , respectivamente. Las cepas SR y SJ fueron las que registraron un menor tamaño de conidios (1.75 y $1.73 \mu\text{m}$). Por el contrario, las cepas EC y AQ cuyos tamaños de conidios fueron superiores (1.97 y $1.94 \mu\text{m}$), tuvo una producción de conidios significativamente inferior: EC produjo 6.8×10^6 conidios/cm² y AQ registró 4.4×10^6 conidios/cm²; dichos valores no difieren estadísticamente (Figura 6).

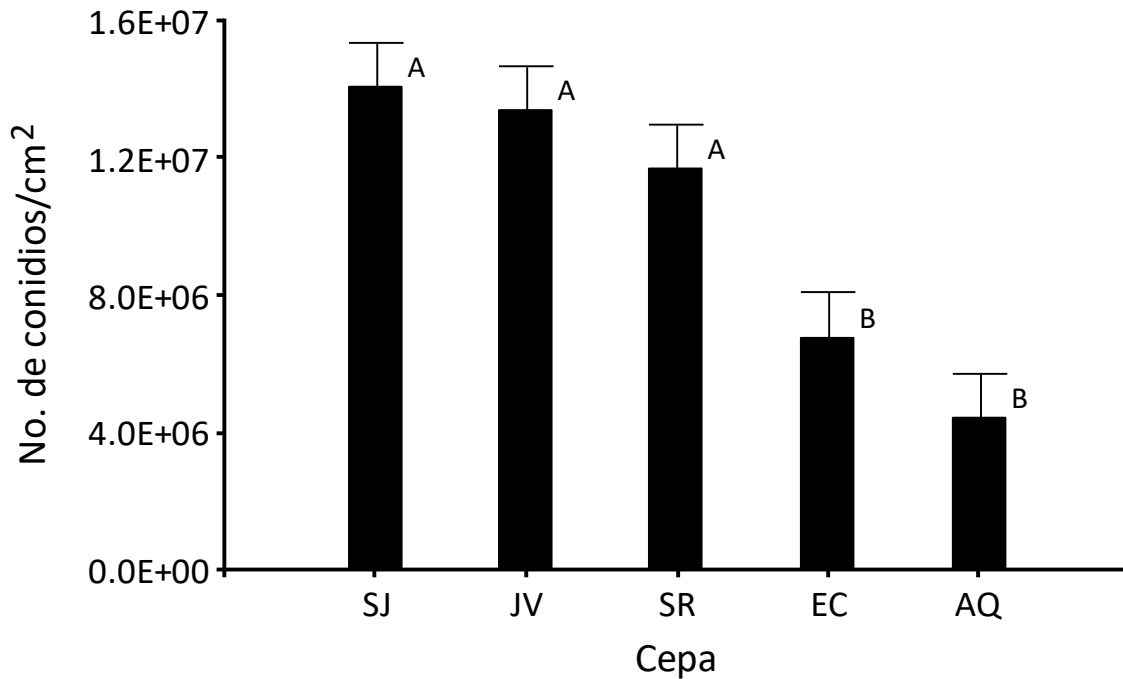


Figura 6. Producción de conidios de cepas locales de *Simplicillium* sp. asociadas al control natural de *H. vastatrix*. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (DGC=0.05)

(**SJ**: Cepa proveniente de San Juan Norte; **JV**: Jabillos; **SR**: Santa Rosa; **EC**: CATIE; **AQ**: AQUIÁRES)

4. Discusión

Los resultados de este estudio difieren con las publicaciones que involucran el CBN de *H. vastatrix* en Costa Rica, en donde constantemente se menciona al hongo *L. lecanii* como al principal

enemigo natural de la roya del cafeto (Virginio Filho y Astorga 2015; Pico Rosado 2014; Canjura et al. 2002), publicaciones hechas en base a datos obtenidos en la misma región que abarca el presente estudio. Las posibles causas de la determinación incorrecta del controlador natural de *H. vastatrix* puede ser debida a la semejanza en apariencia del hongo al hiperparasitar a la roya, debido a que tanto *Simplicillium* como *Lecanicillium* forman una capa blanca algodonosa. Aunado a lo anterior, estos géneros comparten características morfológicas lo cual conduce frecuentemente a una incorrecta clasificación (Lim et al. 2014).

Los resultados obtenidos son el primer reporte que evidencia al género *Simplicillium* como controlador natural de *H. vastatrix* en Costa Rica. Lo anterior implica que para futuras investigaciones relacionadas al CBN de *H. vastatrix* con el uso de hongos micoparásitos no se debe asumir que los micoparásitos encontrados que crecen sobre *H. vastatrix* son, por defecto, *L. lecanii* como se ha hecho hasta el momento. De igual manera, no es recomendable que el control biológico inducido de *H. vastatrix* sea con base en cepas introducidas del género *Lecanicillium*. Es importante mencionar que la cepa INA proveniente de un centro de capacitación y transferencia de tecnología de Costa Rica es distribuida como *Lecanicillium* cuando en el presente estudio se determinó que pertenece al género *Simplicillium*, por lo que posiblemente este género predomina como controlador natural de *H. vastatrix* en Costa Rica.

En un estudio realizado por James et al. (2016), el cual comprendió el análisis molecular de discos de hoja con pústulas de roya provenientes de México y Puerto Rico, se enlista a *Simplicillium* dentro del complejo de posibles micoparásitos de la roya en Puerto Rico, no así en México. También mencionan que además de la alta diversidad de hongos presentes en una pequeña superficie de hoja (28 mm²), las condiciones propias de cada región propician comunidades diferentes de hongos; por ejemplo, en México no se detectó *Simplicillium* como micoparásito de *H. vastatrix*.

Como contraparte, Gómez et al. (2017) después de aislar y evaluar el efecto del control de diferentes cepas de hongos micoparásitos en pústulas de roya, determinaron que el hongo *Simplicillium* fue el que presentó los mejores niveles de parasitismo. Por lo tanto, la correcta identificación de micoparásitos asociados al CBN de *H. vastatrix* debería ser el punto de partida para futuras investigaciones y referencia a la hora de seleccionar métodos de producción masiva de dichas cepas, que si bien pueden adaptarse a los métodos utilizados para *Lecanicillium*, podrían requerir de ajustes en los procesos de producción como las especies identificadas en este estudio.

La característica cultural con mayor variación entre cepas fue el color de las colonias visto por la parte inferior de la caja Petri. Una explicación para esto podría ser la formación de estructuras de resistencia sumergidas en el medio de cultivo, aspecto visto por Inderbitzin et al. (2011) en especies de *Verticillium*. Las observaciones realizadas de esta característica a los 15 días de crecimiento sugieren que las cepas JV y SR tienden a formar estructuras de resistencia en menor tiempo ya que el cambio de coloración del micelio sumergido presentó un cambio de blanco a amarillo oliva en el periodo de incubación. Observaciones similares fueron hechas por Cortez et al. (2003) en aislamientos de *Lecanicillium* (género relacionado con *Simplicillium*).

La tendencia de cepas que tienden a crear estructuras de resistencia en menor tiempo puede ser la respuesta de un menor crecimiento radial de las mismas, tal y como se observa en los resultados aquí obtenidos, donde las cepas JV y SR presentaron los valores más bajos de crecimiento (Figura 5). También, los cambios de color en el medio de cultivo pueden ser debidos a la capacidad de producción de metabolitos secundarios (VanderMolen *et al.* 2013). Respecto a la capacidad de producción de conidios de *Simplicillium*, la información es muy limitada por lo que las comparaciones de momento deben ser hechas con taxones relacionados como *Verticillium* o *Lecanicillium*.

5. Literatura citada

- Arneson, P. A. 2000. Coffee rust. The Plant Health Instructor. Coffee rust. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0718-02. The American Phytopathological Society.
- Avelino, J; Cristancho M; Gergiou S; Imbach P; Aguilar L; Bornemann G; Laderach P; Anzueto F; Hruska A. J; Carmen M. 2015. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008 – 2013): impacts and plausible causes and proposed solutions. Food Security. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0446-9>. (7 (2):303 – 321.
- Canjura, S. E. M; Sánchez G. V; Krauss U; Somarriba E. 2002. Reproducción masiva de *Verticillium* sp., hiperparásito de la roya del café, *Hemileia vastatrix*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología . (66):13-19.
- Córtez, M. H; Alatorre R. R; Mora A. G; Bravo M. H; Ortiz C. F; Aceves N. L A. 2003. Characterization of multisporic and monosporic isolates of *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* for the management of *Toxoptera aurantii* in cocoa. BioControl 48 (3):312-334.
- Díaz, B.M; E. Lecuona R. 1996. Evaluación de cepas nativas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* Bals. (Vuill.) (Deuteromicotina) como base para la selección de bioinsecticidas contra el barrenador *Diatraea saccharalis* (F.). Agriscientia 12: 33-38.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2016. Córdoba, Argentina, Universidad Nacional de Córdoba. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>
- Gherbawy, Y; Voigt, K. 2010. Molecular Identification of Fungi. Springer. ISBN: 978-3-642-05041-1.
- Gómez, D. C. I; Pérez P. E; Escamilla P. E; Martínez B. M; Carrion V. G. L. L; Hernández L. T. I. 2017. Selección *in vitro* de micoparásitos con potencial de control biológico sobre roya del café (*Hemileia vastatrix*). Revista Mexicana de Fitopatología 36 (1):172 – 183.
- Guharay, F; Monterroso D; Staver C. 2001 El diseño y manejo de la sombra para la supresión de plagas en cafetales de América Central. Agroforestería en las Américas 8(29):22-29.

- Haddad, F; Maffia L. A; Mizubuti E. S. G; Teixeira H. 2009. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. *Biol. Control* 49 (2):114-119.
- Hajek, A.E; Leger R.J. 1994. Interactions between fungal pathogenesis and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39:293–322.
- Inderbitzin, P; Bostock R. M; Davis R. M; Usami T; Platt H. W; Subbarao K. V. 2011. Phylogenetics and Taxonomy of the Fungal Vascular Wilt Pathogen *Verticillium*, with the Descriptions of Five New Species. *PLoS ONE* 6(12): e28341.
- Jackson, C. W; Heale J. B; Hall R.A. 1985. Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. *Ann. Appl. Biol* 106(1):39–48.
- James, T. Y; Marino J. A; Perfecto I; Vandermeer J. 2016. Identification of putative coffee rust mycoparasites via single-molecule DNA sequencing of infected pustules. *Appl. Environ. Microbiol* 82(2):631-639.
- Jenkins, N. E; Grzywacz, D. 2003. Towards the standardization of quality control of fungal and viral biocontrol agents. *In* Van Lenteren J. C (ed.) *Quality Control and Production of Biological Control Agents. Theory and Testing Procedures.* CAB International. P. 247 – 264.
- Kranz, J. 1988. Measuring Plant Disease. *In* Kranz J; Rotem, J (eds.). *Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology.* Springer, Verlag, Berlin. P. 35-50.
- Kuske, C. R; Banton K. L; Adorada D. L; Stark P. C; Gil K. K; Jackson J. P; 1998. Small – scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 64(7): 2463–2472.
- Lim, S. Y; Lee S; Kong H. G; Lee J. 2014. Entomopathogenicity of *Simplicillium lanosoniveum* isolated in Korea. *Mycobiology* 42(4):317:321.
- Monzón, JA. 1992. Distribución de *Verticillium* sp. en tres zonas cafetaleras de Nicaragua y evaluación de dos aislamientos del hongo como agente de control biológico de la roya (*Hemileia vastatrix*) del café (*Coffea arabica* L.). Thesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 66 p.
- Morales, A. 2008. A simple way to preserve fungal cultures. Cornell University. Disponible en <https://blog.mycology.cornell.edu/2008/01/10/a-simple-way-to-preserve-fungal-cultures/>
- Munsell Color Company. 1988. *Munsell Soil Color Charts.* Baltimore, Maryland, USA.
- Pérez, V. L. 2015. La roya del café (*Hemileia Vastatrix*) en Cuba: Evolución al manejo alternativo de la enfermedad. *In* Memorias del Seminario Científico Internacional “Manejo Agroecológico de la Roya del Café”. Panamá, Panamá. FAO. P. 17-19.
- Pico Rosado, J. T. 2014. Efecto de la sombra del café y el manejo sobre la incidencia, severidad, cantidad de inóculo y dispersión de *Hemileia vastatrix* en Turrialba, Costa Rica. Thesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 65 p.

- Promecafé (Programa Cooperativo Regional para el Desarrollo Tecnológico y la Modernización de la Caficultura); IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). 2013. La crisis del café en Mesoamérica, causas y respuestas apropiadas. Boletín Promecafé no. 135:10-15.
- Rivillas, O. C. A. 2015. Acciones emprendidas por Colombia en el manejo de la roya del cafeto. *In* Memorias del Seminario Científico Internacional “Manejo Agroecológico de la Roya del Café”. FAO. Cd. de Panamá. P. 11-16.
- Safavi, S. A. 2010. Isolation, identification and pathogenicity assessment of a new isolate of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in Iran. *J. of plant protection* 50(2):158-162.
- Samuels, K.D.Z; Heale J. B; Llewellyn M. 1989. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliaea* toward *Nilaparvata lugens*. *J. Invertebr. Pathot* 53(1):25-31.
- VanderMolen, M. K; Raja A. H; El-Elimat T; Oberlies H. N. 2013. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening programs. *AMB Express* 3:71.
- Vandermeer, J; Perfecto I; Liere H. 2009. Evidence for hyperparasitism of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) by entomogenous fungus, *Lecanicillium lecanii*, through a complex ecological web. *Plant Pathol.* (58): 636 – 641.
- Virginio Filho, E de M. y Astorga. 2015. Prevención y control de la roya del café. Manual de buenas prácticas para técnicos y facilitadores. Turrialba, Costa Rica, CATIE. (Serie técnica. Manual técnico no. 131).
- Zare, R; Gams W. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. *Nova Hedwigia* 73:1-50.
- Zare, R; Gams W. 2004. A monograph of *Verticillium* section *Prostrata*. *Rostaniha* 3, Supplement: 1-188.

Capítulo III. Medios líquidos para producción de blastosporas de *Simplicillium* sp. (Zimm.)

Resumen

Se evaluaron cuatro medios de cultivo líquidos para la producción de blastosporas de *Simplicillium* sp. Para dos de estos medios (BS y BQ) se utilizaron ingredientes disponibles en supermercados o tiendas locales, como fuentes de carbono y nitrógeno. Estos tratamientos fueron comparados con un medio a base de neopeptona, dextrosa y extracto de levadura (medio MB) y con el medio Jackson (2003) como cuarto tratamiento. La producción de blastosporas de *Simplicillium* fue afectada por los diferentes medios evaluados a través del tiempo ($p < 0.0001$). En general, los medios BQ y BS registraron una mayor producción de blastosporas. La curva de producción en estos dos medios tuvo un comportamiento muy similar. El valor máximo de producción de blastosporas para BS y BQ fue el día 14 después de la inoculación; la producción máxima de BQ fue superior alcanzando 1.2×10^8 blastosporas/mL, mientras que el de BS fue de 4.8×10^7 . El pico de producción de estos medios se alcanzó 6 días después que el del medio Jackson y 9 días después que el del medio MB; en el periodo que estos dos últimos medios alcanzaron la máxima producción, los medios propuestos rindieron 100 veces más que el medio MB y 10 veces más que el medio Jackson. La diferencia más notable se observó entre el medio BQ y el medio MB, donde el primero produjo 1000 veces más que el segundo.

Palabras clave: micoparásitos, blastosporas, fermentación líquida, *Simplicillium*

1. Introducción

La factibilidad de utilizar hongos entomopatógenos (HE) para el control de organismos dañinos depende de muchos factores; uno de ellos es la producción de propágulos en altas concentraciones de manera económica (Jaronski *et al.* 2007; Latifian *et al.* 2013). La formulación de medios de cultivo para la producción masiva de hongos entomopatógenos debe contener el balance de nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de estos (Jackson *et al.* 1997). Actualmente, la producción de HE se realiza de manera artesanal, utilizando arroz como sustrato el cual es inoculado con una suspensión de conidios de la cepa del hongo a producir. Este método por lo general lo utiliza el productor en su finca y pequeños comercializadores de insumos biológicos para el manejo de problemas fitosanitarios en los cultivos. También hay producción de manera semiindustrial e industrial con métodos más sofisticados utilizados por compañías desarrolladoras de bioplaguicidas. Cualquiera que sea el método utilizado puede obtener un producto final de buena calidad; la diferencia principal entre sistemas de producción radica en los volúmenes de producción (Monzón 2001). Los sistemas de producción de HE son por medio de fermentación líquida para la obtención de blastosporas o por fermentación sólida para la producción de conidios; sin embargo, las técnicas de producción masiva más viables incluyen la producción bifásica, donde inicialmente la propagación es en medio líquido y después el inóculo obtenido se siembra sobre sustratos sólidos para la obtención de conidios (Sahayaraj y Raja 2008).

L. lecanii y *B. bassiana* son organismos facultativos, lo cual permite producirlos masivamente en diferentes sustratos (Prasad y Pal 2014). *L. lecanii* puede ser fácilmente reproducido en la mayoría de medios sólidos agarizados que contienen papa-dextrosa, extracto de malta más peptona micológica, harina de avena, quitina o leche descremada. De esta forma se pueden obtener rendimientos de 1.4×10^7 conidios/cm² ($0.5-2 \times 10^9$ conidios/caja Petri). Dentro de los sustratos sólidos mayormente usados para la producción de estos y otros HE se encuentra el arroz (Elosegui 2006; Córtez 2007), aunque se pueden utilizar otros granos como avena, maíz y sorgo. Al respecto, Sahayaraj y Raja (2008) evaluaron seis cereales como medios sólidos y cuatro medios líquidos en la producción de *B. bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *V. lecanii*. El cereal que produjo la mayor cantidad de conidios de *B. bassiana* fue el trigo mientras que para *P. fumosoroseus* y *V. lecanii* los mejores resultados se obtuvieron con granos de sorgo. En cuanto a los medios líquidos, el agua de coco fue el que presentó una mayor producción de blastosporas para los tres entomopatógenos. Por otra parte, Reyes *et al.* (2014) evaluaron 13 medios de cultivo líquidos en la producción de conidios en dos cepas de *L. lecanii*, el mejor resultado se obtuvo con el medio SDA suplementado con polvo de camarón, con un rendimiento superior a 5×10^9 conidios/mL.

Considerando la ausencia de información en la literatura sobre el comportamiento reproductivo del micoparásito del género *Simplicillium* encontrado creciendo sobre pústulas de *H. vastatrix* en Costa Rica, el objetivo de este trabajo fue evaluar su crecimiento en diferentes medios líquidos de cultivo y determinar su capacidad para producir blastosporas bajo estas condiciones de crecimiento, y generar curvas de concentración en el tiempo para determinar el momento en el que alcanza su pico de producción.

2. Materiales y métodos

2.1. Cepa y obtención de inóculo inicial

La cepa de *Simplicillium* sp. utilizada en este experimento fue aislada de pústulas de roya del café (*Hemileia vastatrix*) en la zona cafetalera de Turrialba, Costa Rica y codificado con las siglas EC. Esta cepa mostró un alto grado de virulencia hacia *H. vastatrix* (Capítulo IV) en pruebas realizadas sobre discos de hoja. La cepa se conserva en el Laboratorio de Control Microbial del Centro Agronómico Tropical de investigación y Enseñanza (CATIE), utilizando el método de papel filtro (Morales 2008).

Para la prueba de crecimiento en medios líquidos, la cepa EC fue reaislada de la colección en papel filtro y sembrada en medio Papa Dextrosa Agar (PDA); posteriormente se obtuvieron colonias monospóricas de 10 días de edad de las cuales se generó el inóculo inicial para ser utilizado en los medios de cultivo evaluados.

2.2. Composición de medios y criterios de selección de nutrientes

Se utilizó un total de cuatro medios líquidos para esta prueba: medio Jackson (MJ), medio base (MB), medio bayfolan-Soya (BS) y medio Bayfolan-Quitina (BQ).

MJ: el medio de cultivo propuesto por Jackson *et al.* (1997) fue utilizado como control ya que en trabajos publicados por el autor, se indican altas concentraciones de blastosporas de *Pacecillomyces fumosoroseus*. Este medio fue utilizado con las modificaciones hechas por Reyes *et al.* (2014) para la producción de *L. lecanii*.

MB: este es un medio comúnmente usado para la producción bifásica de hongos filamentosos, como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el Laboratorio de Control Microbial del CATIE. Contiene neopeptona, dextrosa y extracto de levadura a razón de 20, 40 y 10 g/l respectivamente.

BS: el medio fue desarrollado por Hidalgo *et al.* (2005) en una investigación para desarrollar medios líquidos de bajo costo para la inducción de blastosporas en cultivos sumergidos de hongos filamentosos. La combinación de harina de soya (SOYASAN®), sacarosa y Bayfolan ® como fuente de nitrógeno dieron los mejores resultados en este estudio alcanzando concentraciones de 1.5×10^8 blastosporas/mL.

BQ: el cuarto tratamiento (BQ) fue una modificación del medio BS. La modificación consistió en la adición de 5 g/L de quitina coloidal. La relación carbono nitrógeno para los dos medios alternativos propuestos fue de 1:2. El criterio de selección de fuentes de carbono y nitrógeno fue hecho con base en estudios previos realizados por Hidalgo *et al.* (2005) sobre *Trichoderma*, *Cylindrocarpon* y *Clonostachys*. Con dichas fuentes se obtuvo la mejor producción de blastosporas de estos hongos.

La composición de los medios evaluados se observa en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Composición de los medios líquidos evaluados en la producción de blastosporas de *Simlicillium* sp.

Componentes g/L	Medio			
	Jackson	MB	BS	BQ
KH ₂ PO ₄	2.0			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3			
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.05			
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.016			
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.014			
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.036			
CaCl ₂	0.4			
Dextrosa	80	40		

Caseína hidrolizada	13.2			
Vitaminas ¹	3.15			
Neopeptona		10		
Extracto de levadura		2.0		
Sacarosa			7.5	7.5
Bayfolán ^{MR}			54.6	54.6
Soya (SOYASAN ^{MR})			10	10
Quitina coloidal				5
Vitaminas	*			

*Palmitato de vitamina A 2,500 IU/mL, colecalciferol 667 IU/mL y ácido ascórbico 50 mg/mL

2.3. Preparación e inoculación de medios

Los medios fueron preparados en agua destilada estéril de acuerdo a las concentraciones descritas en la sección 2.2; posteriormente fueron autoclavados a 120°C durante 15 minutos. Una vez autoclavados se vertieron 50 mL en Erlenmeyer con capacidad de 125 mL. Posteriormente se hizo un raspado de micelio de *Simplicillium* de 10 días de crecimiento sobre PDA, se preparó una suspensión filtrada de esporas y se estimó la concentración de conidios en cámara Neubauer. Los frascos que contenían los diferentes medios fueron inoculados para una concentración inicial de 1×10^6 conidios/50 mL de medio. Una vez inoculados, los frascos fueron sellados con papel aluminio estéril y sobre este papel celofán.

2.4. Condiciones de cultivo y toma de datos

Los frascos que contenían los medios de cultivo fueron colocados sobre un agitador orbital (VWR Scientific Products – USA) a 150 rpm a una temperatura que fluctuó de 25 a 28°C. Cada 24 h después de la inoculación se tomaron muestras de cada uno de los medios utilizando una pipeta Pasteur previamente esterilizada para cargar la cámara Neubauer y determinar la concentración de blastosporas.

2.5. Diseño y análisis estadístico

El experimento se llevó a cabo con un diseño completamente al azar con cinco repeticiones; cada repetición consistió de un Erlenmeyer los cuales fueron puestos aleatoriamente en el agitador orbital. El análisis fue hecho mediante Modelos Lineales Generales y Mixtos con el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.* 2016). La variable respuesta (no. de blastosporas) se transformó al logaritmo natural. Finalmente se hicieron análisis de conglomerados para ajustar el mejor modelo.

3. Resultados

La producción de blastosporas de *Simplicillium* fue afectada por los diferentes medios evaluados a través del tiempo ($p < 0.0001$). En general, los medios BQ y BS registraron una mayor producción de blastosporas. Los valores más bajos se observaron en el medio MB durante todas las mediciones, aunque este fue el único tratamiento que presentó producción de blastosporas 24 h después de la inoculación. La mayor cantidad de blastosporas en el medio MB se registró al día cinco, la cual fue una producción baja (7.8×10^5) en comparación con los otros medios estudiados.

El valor más alto en el MJ fue registrado durante los días ocho y nueve después de la inoculación. La producción en estos días fue de 5.5×10^6 y 5.8×10^6 , respectivamente, dichos valores no difirieron estadísticamente (DGC=0.05). Este medio fue superior al medio MB pero inferior a BS y BQ.

La curva de producción de blastosporas en los medios BS y BQ tuvo un comportamiento similar, durante los primeros cinco días de observaciones hubo diferencias únicamente a los tres y cuatro días después de la inoculación; posteriormente mantuvieron valores iguales hasta el día 13. El valor máximo de producción de blastosporas para ambos medios fue el día 14, donde BQ fue superior alcanzando 1.2×10^8 esporas/mL, mientras que el valor máximo para BS fue de 4.8×10^7 . Dichos valores fueron estadísticamente diferentes (DGC $p=0.05$). A partir de este punto, la producción de blastosporas no difirió dentro de cada uno de estos medios respecto al tiempo, aunque la diferencia permaneció entre medios durante las últimas observaciones (Figura 7).

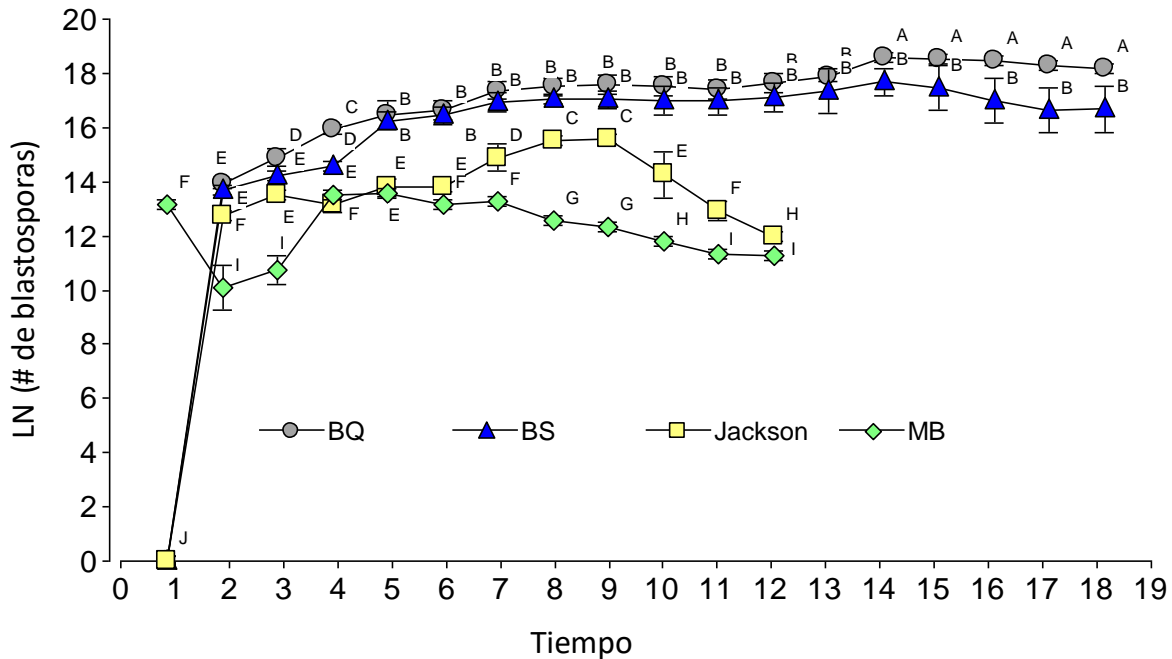


Figura 7. Producción de blastosporas (variable transformada a logaritmo natural) de *Simplicillium* en diferentes medios de cultivo. Medias con distinta letra son estadísticamente diferentes (DGC=0.05).

(**BQ**: bayfolan quitina; **BS**: bayfolan soya; **Jackson**; Jackson **MB**: Medio base)

4. Discusión

Los medios alternativos propuestos (BS y BQ) fueron los que registraron mayor producción de blastosporas. Si bien el pico de producción en estos medios se alcanzó seis días después en MJ y nueve días en MB, en el periodo en el que MJ y MB alcanzaron la máxima producción, los medios BS y BQ rindieron 100 veces más que el medio MB y 10 veces más que el MJ.

La diferencia más notable se dio entre los medios BQ y MB, donde el primero produjo 1000 veces más que el segundo. El medio MB indujo un rápido inicio en la producción de blastosporas, 24 horas después de la inoculación, pero después disminuyó significativamente su concentración para iniciar un nuevo ciclo de producción. Este comportamiento irregular de este medio durante las primeras tres fechas de observación puede ser debido al tiempo que las blastosporas tardaron en separarse de los cuerpos hifales formados al segundo día de producción y a su rápida germinación en este medio. La curva de producción de los tres tratamientos restantes inició el crecimiento exponencial a partir de las 48 horas después de la inoculación. La caída de producción de blastosporas fue en menor tiempo para MB (6 días después de la inoculación) y para MJ (10 días después de la inoculación), teniendo estos una fase estacionaria corta. Dicha fase fue más prolongada en los medios BS y BQ, de manera que 19 días después de la inoculación la producción

de blastosporas siguió mostrando valores estadísticamente iguales al mayor pico de producción para ambos medios (Figura 7).

La adición de quitina coloidal al medio BQ mejoró la producción de blastosporas. Al respecto, Reyes *et al.* (2014) evaluaron 13 medios de cultivos y aquel al que se añadió residuos de camarón (usado comúnmente para extracción de quitina) favoreció la esporulación de *L. lecanii*, taxón relacionado con el género *Simplicillium* (Zare y Gams 2001). Lo anterior indica que la quitina, al ser un compuesto que está presente en la pared celular de hongos y exoesqueletos de insectos (Barboza *et al.* 2008), puede servir como un estimulante en la producción de HE como *L. lecanii* o micoparásitos como *Simplicillium*. Hegedus *et al.* (1990) mencionan que debido a la lisis de la quitina se forma el monómero N-acetil-glucosamina, el cual es usado como fuente de nitrógeno y carbono. Adicionalmente, los medios propuestos contienen minerales que pudieron haber favorecido su desempeño respecto a los otros.

Es importante mencionar que se carece de reportes previos referentes a la fermentación de *Simplicillium* en medios líquidos, por lo que estos primeros resultados contribuyen con conocimiento base para futuros trabajos de investigación enfocados a la producción masiva y uso de este hongo como una opción para el manejo de la roya del café.

5. Literatura citada

- Barboza, C. J. E; Reyes R D. M; Salcedo H. R; Bautista M; Jiménez B. Bideshi K. D. 2008. Molecular and biochemical characterization of an endochitinase (ChiA-HD73) from *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki HD-73. *Mol. Biotechnol.* 39(1):29–37.
- Córtez, M. H. 2007. Producción de *Lecanicillium (=Verticillium) lecanii* en diferentes sustratos y patogenicidad. *Agricultura Técnica en México* 33(1):83–87.
- Di Rienzo J.A; Casanoves, F; Balzarini M.G; González L; Tablada M; Robledo, C.W. InfoStat versión 2016. Córdoba, Argentina, Universidad Nacional de Córdoba. Disponible en URL <http://www.infostat.com.ar>
- Elósegui, O. C. 2006. Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. La Habana, Cuba, INISAV. 61 p.
- Hegedus, D. D; Bidochka M. J; Kachaturians G. G 1990. *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing Chitin, Two hexosamines or glucose. *App. Microbiol. Biotechnol.* 33(6):641-647.
- Hidalgo, J. E; García J; Martínez A; Stirrup T; Krauss U; Steuten C. 2005. Inexpensive media for liquid fermentation of antagonist fungi *Trichoderma ovalisporum*, *Clonostachys* spp. and *Cylindrocarpon victoriae*. Informe de investigación. CABI.

- Jackson, M. A.; McGuire, M. R., Lacey, L. A; Wraight S. P. 1997. Liquid Culture Production of Desiccation Tolerant Blastospores of the Bioinsecticidal Fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. Mycol. Res. 101(1):35–41.
- Jackson, M. A; Cliquet S; Iten. B. L. 2003. Media and fermentation processes for the rapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. Biocontrol Sci. Technol. 13(1):23–33.
- Jaronski, S. T; Schaeffer C. F; Jung K; Boetel M; Majumdar A. 2007. Challenges in using *Metarhizium anisopliae* for biocontrol of sugarbeet root maggot, *Tetanops myopaeformis*. Bulletin IOBC/wprs 30(7):119–124.
- Latifian, M; Rad B; Amani M; Rahkhodaei E. 2013. Mass production of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) by using agricultural products based on liquid – solid diphasic method for date palm pest control. Intl. J. Agric. Crop Sci. 5(19):2337–2341.
- Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas no. 63:95–103.
- Morales, A. 2008. A simple way to preserve fungal cultures (sitio web). Cornell University. Disponible en <https://blog.mycology.cornell.edu/2008/01/10/a-simple-way-to-preserve-fungal-cultures/>
- Prasad, C. S; Pal R. 2014. Mass production and economics of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Verticillium lecanii* on agricultural and industrial waste. Sch. J. Agric. Vet. Sci. 1(1):28–32.
- Reyes, H. J. E; Alatorre R. R; Shirai M. K; Vaquera H. H; Virgen C. G; Medina U. V; Loera C. O. 2014. Components of liquid media on the production of high spore concentrations of *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Gams and Zare. J. of Agr. Sci. and Technol. 4:767–779.
- Sahayaraj, K; Raja N. 2008. Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. African Journal of Biotechnology 7(12):1907–1910.
- Zare, R; Gams, W. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. Nova Hedwigia 73:1-50.

Capítulo IV. Eficacia de cepas locales y comerciales de *Simplicillium* spp. en el control de la roya del caféto *Hemileia vastatrix* Berkeley y Broome

Resumen

La roya (*Hemileia vastatrix*) es la enfermedad del café de mayor importancia económica al punto que puede ocasionar pérdidas de producción superiores a 50%. La información sobre prácticas de control biológico aplicado para controlar la roya del café en Costa Rica es limitada. El estudio tuvo por objetivo seleccionar una cepa local de *Simplicillium* con alto grado de virulencia, así como evaluar la eficiencia de cepas comerciales de micoparásitos destinados al control de *H. vastatrix* en Costa Rica y determinar el efecto de esporas aéreas y sumergidas de la cepa seleccionada. El estudio comprendió ocho cepas de hongos, cinco de ellas fueron aisladas de la zona cafetalera de Turrialba, dos biofungicidas comerciales y un artesanal recomendados para combatir la roya en cafetales de Costa Rica. La cepa EC mostró ser la más efectiva, al colonizar en menor tiempo las pústulas de roya. Esta cepa fue comparada con formulados comerciales después de dos pases sucesivos en PDA y de haberla almacenado en papel filtro. Los aislamientos locales presentaron un mayor grado de especificidad al resto de las cepas. La cepa artesanal a base de *Simplicillium* (mismo género que cepas locales) fue más efectiva que las comerciales. Esporas aéreas y sumergidas de *Simplicillium* tuvieron el mismo grado de control en pústulas de roya. Los resultados obtenidos en campo no aumentaron significativamente el porcentaje de parasitismo respecto al control natural. Durante el 2017, la incidencia de roya en la parcela donde se llevó a cabo el ensayo fue baja. El número de lesiones de roya por hoja no fue perceptible y por ende el efecto del parasitismo de *Simplicillium* sobre estas se vio “diluido”. Estos son los primeros resultados que anteponen a *Simplicillium* como el principal enemigo natural de *H. vastatrix* en Costa Rica.

Palabras clave: Aislamientos locales, porcentaje de colonización, micoparásitos

1. Introducción

Dentro del complejo de enfermedades que atacan al cultivo de café, la roya (*Hemileia vastatrix*) es de las de mayor importancia económica, puede ocasionar pérdidas de producción superiores a 50% (Haddad *et al.* 2009; Suresh *et al.* 2012). El brote más perjudicial de roya en Centroamérica ocurrió en el ciclo 2012–2013, cuando las pérdidas estimadas fueron superiores a US\$499 millones, razón por la cual varios países consideraron el hecho como una emergencia nacional (Promecafe e IICA 2013).

Cuando un organismo micoparásito se encuentra regulando a un fitopatógeno de manera natural, debe ser aislado y evaluado como agente de control (Campbell 1990). Tal es el caso del hongo, con apariencia algodonosa, que frecuentemente aparece parasitando a la roya del café y el cual se conoce como *L. lecanii* (Monzón 1992; Canjura *et al.* 2002; Vandermeer *et al.* 2009; Rivillas 2015; Pérez 2015). Los datos obtenidos en el estudio del Capítulo II, demuestran que en cafetales de la

región de Turrialba, Cartago, Costa Rica, el principal enemigo natural de *H. vastatrix* es el hongo *Simplicillium*, taxón relacionado con *Lecanicillium* (Zare y Gams 2001). Así pues, una vez realizada la correcta identificación es necesario la evaluación *in vitro* para seleccionar cepas de mayor virulencia hacia *H. vastatrix*.

Estudios previos han demostrado que el control biológico de *H. vastatrix* puede ser una técnica factible y ambientalmente segura para el control de la enfermedad; Monzón (1992) al evaluar *Verticillium* para el control de la roya a nivel de laboratorio demostró que la germinación de uredosporas se reduce hasta un 80%. Vélez y Rosillo (1995), también con aplicaciones de una cepa de *V. lecanii* registraron un retraso en el periodo de incubación de *H. vastatrix* y en la reducción de la incidencia total de la enfermedad por planta. Por su parte, Haddad *et al.* (2009) documentaron el uso de bacterias como una técnica promisorio para el control biológico de *H. vastatrix*.

Actualmente, el manejo de la roya en Costa Rica está enfocado en el uso de fungicidas protectantes (a base de cobre) y fungicidas sistémicos pertenecientes a la familia de los triazoles principalmente (los efectos indeseables de estas acciones de manejo son bien conocidos), además de prácticas culturales como la poda, el manejo de la sombra y el uso de variedades resistentes (Avelino *et al.* 2004; Barquero 2013). Si bien el uso de variedades resistentes es una práctica promisorio para mitigar la enfermedad, la variedad genética de la roya disminuye el tiempo de resistencia inicial (Gouveia *et al.* 2005). Como contraparte, existen enemigos naturales de *H. vastatrix* que regulan su incidencia y severidad (Guharay *et al.* 2001); como por ejemplo, los hongos *Lecanicillium lecanii* y *Cladosporium hemileia*. También es común encontrar larvas de *Mycodiplosis* sp. alimentándose de pústulas de roya (Virginio Filho 2017). Desafortunadamente la información sobre prácticas de control biológico aplicado para controlar la roya del café en Costa Rica es limitada.

Por otra parte, se ha demostrado que en algunos casos las esporas sumergidas (blastosporas) de algunos hifomicetos producidas en medios líquidos son más virulentas que esporas aéreas (Lacey *et al.* 1999). También, los medios de cultivo líquidos poseen muchas ventajas comparados con medios de cultivo sólidos (Jackson 2000). Se carece de información sobre el efecto de aplicaciones de esporas aéreas o sumergidas controladoras de la roya del café.

El estudio tuvo por objetivo seleccionar una cepa local de *Simplicillium* con alto grado de virulencia, evaluar la eficiencia de cepas comerciales de micoparásitos destinados al control de *H. vastatrix* en Costa Rica y comparar el efecto de esporas aéreas frente a esporas sumergidas en el control de roya.

2. Materiales y métodos

El trabajo comprendió dos experimentos. El primero buscó seleccionar la mejor de cinco cepas locales aisladas de pústulas de roya en la región de Turrialba, Cartago, Costa Rica y comparar el grado de control que ejerce esta cepa frente a bioplaguicidas destinados al control de roya en este país. Además de las cepas comerciales, cepa artesanal y la mejor cepa local, se incluyó una variante

de esta última después de haber sido conservada durante un mes por el método de papel filtro (Morales 2008), con la finalidad de observar pérdida de virulencia debida al sometimiento de deshidratación al final del proceso (codificada como EC1). Un segundo experimento consistió en medir el efecto de conidios y blastosporas de la mejor cepa local seleccionada sobre la colonización de lesiones de *H. vastatrix*. Ambos experimentos se llevaron a cabo sobre discos de hoja de café infectados con roya. En los siguientes apartados se detallan los procesos metodológicos.

2.1. Bioensayos de cepas locales y comerciales

2.1.1. Aislamiento e identificación de cepas locales y comerciales

Los aislamientos se hicieron durante los meses de octubre y noviembre del 2015, para lo cual se colectaron hojas de plantas de café con lesiones de roya en estado avanzado y con presencia de hongos parásitos. El estudio comprendió ocho cepas de hongos, cinco fueron aisladas de la zona cafetalera de Turrialba, Cartago, Costa Rica en las localidades de San Juan Norte (SJ), Jabillos (JV), Aquiares (AQ), Santa Rosa (SR) y CATIE (EC); las parcelas donde se hicieron las colectas se encuentran entre los 600 a 950 msnm. Las tres cepas restantes (INA, C1 y C2) corresponden a productos recomendados para combatir la roya en cafetales de Costa Rica.

Inicialmente se hicieron aislamientos directos de las diferentes cepas mediante un ligero toque continuo con una aguja entre las pústulas de roya parasitadas y cajas Petri que contenían el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). Una vez que hubo crecimiento del hongo, se seleccionaron cultivos puros libres de contaminantes. Después de 10 días de crecimiento, se hicieron aislamientos monospóricos mediante diluciones seriadas; primeramente se hizo una dilución inicial de inóculo en agua destilada estéril mas Tween 80 a una concentración de 0.1%; después se hicieron diluciones hasta 10^{-6} ; de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} se tomaron 0.1mL que fueron sembrados en PDA e incubados a 25–28°C. Los medios fueron examinados constantemente hasta detectar las primeras colonias y se seleccionaron aquellos con menor número de ufc las cuales se consideraron provenientes de una sola espora. Seguidamente se re-aislaron colonias individuales en cajas Petri con PDA. Cultivos monospóricos fueron enviados al laboratorio de biología molecular de la Corporación Bananera Nacional (Corbana) en Guápiles, Limón, Costa Rica. El producto de la amplificación se envió a la empresa MacroGen Inc. para su purificación y secuenciación; una vez generadas las secuencias se editaron con el programa BioEdit y se compararon en la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information).

2.1.2. Colecta de pústulas de roya y preparación de discos de hoja

Inicialmente se hicieron colectas de hojas completamente desarrolladas y con presencia de pústulas de roya en sus diferentes estados de desarrollo y sin presencia de hongos micoparásitos; posteriormente las hojas fueron llevadas a laboratorio en donde con la ayuda de un sacabocado de 1.8 cm de diámetro se extrajeron discos de hoja conteniendo pústulas de roya con lesiones recién esporuladas de color naranja intenso (estado intermedio) y lesiones completamente desarrolladas con apariencia naranja pálido (estado avanzado). Una vez hechos los discos de hoja se colocaron en placas multipozos CELLSTAR^(R) de seis cavidades donde previamente a cada cavidad se le

agregaron 5 mL de agua destilada estéril (ADE) y sobre esta un disco de Foam de 2.5 cm de diámetro. Finalmente, los discos de hoja quedaron sobre los discos de Foam flotando en ADE. Previamente se inocularon con una suspensión de esporas de las diferentes cepas como se describe en el siguiente apartado.

2.1.3. Método y dosis de aplicación

Cajas Petri con colonias monospóricas de 15 días de edad de las diferentes cepas fueron inundadas con ADE, seguido de un raspado con una espátula Drigalsky hasta separar completamente el micelio del medio de cultivo; el supernatante obtenido fue recuperado en viales de vidrio, los cuales se colocaron en baño ultrasonido por tres minutos y luego se agitó en un vortex durante un minuto. Posteriormente se hizo un filtrado para separar conidios de micelio, y después se hicieron diluciones seriadas hasta obtener concentraciones que permitieran un conteo de esporas con la cámara Neubauer. Una vez determinado el número de esporas contenido en la suspensión inicial, se ajustó a una concentración final de 1×10^7 conidios/mL (dosis empleada).

La cepa C2 venía en una presentación de polvo humectable, mientras que INA y C1 fueron producidas en arroz, de modo que para la estimación de la concentración de esporas primero se tomó un gramo de producto que fue suspendido en 10 mL de ADE, después se hizo una filtración para eliminar inertes de mayor tamaño; posteriormente se hicieron diluciones seriadas, conteo en cámara Neubauer y por último se ajustó a la misma dosis de las cepas locales en base al porcentaje de viabilidad de cada producto (Capítulo I).

La inoculación de esporas sobre los discos de hoja con roya fue realizada con la ayuda de un atomizador Devilviss Modelo 15-RD. Una vez hecha la aplicación, se dejó pasar el tiempo necesario para que estos perdieran la humedad obtenida durante la inoculación para luego ser puestos en las placas multipozos como se describe en el apartado anterior.

2.1.4. Medición de la variable respuesta

La variable medida fue el porcentaje de colonización de las cepas sobre las pústulas de *H. vastatrix*. Las mediciones se hicieron cada 24 horas hasta siete días después de la inoculación. Para la estimación del porcentaje diario de colonización fue necesario tomar fotografías diarias individuales (a cada disco de hoja) para después hacer un procesamiento con el cambio de colores con la ayuda del programa ImageJ 1.47v (Rasband 2016).

2.1.5. Diseño y análisis estadístico

El experimento tuvo 10 repeticiones cada una de las cuales consistió de dos placas multipozos. Cada placa contenía seis discos de un mismo estado de desarrollo de la roya (intermedio o avanzado); cinco de estos discos fueron inoculados, cada uno con una cepa diferente, de manera tal que un sexto disco fue usado como testigo sin inoculación. El análisis fue hecho mediante Modelos Lineales Generales y Mixtos con el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.* 2016). Se ajustaron curvas de crecimiento sujeto específicas exponenciales y logísticas, utilizando

modelos no lineales mixtos; el modelo que describió mejor las curvas de crecimiento fue elegido utilizando los criterios AIC y BIC. Para observar diferencias en porcentaje de colonización de las diferentes cepas se utilizaron Modelos Lineales Mixtos donde la variable respuesta fueron los valores de los parámetros de los modelos logísticos específicos para ambos experimentos; después de ajustados los modelos se realizó un ANOVA para los coeficientes.

2.2. Eficacia de conidios y blastosporas de *Simplicillium* colonizando pústulas de roya - Bioensayos

Se evaluaron dos tratamientos: blastosporas y esporas aéreas (conidios); ambos tipos de esporas fueron aplicadas a pústulas de roya en estado de desarrollo intermedio y avanzado. Un tercer tratamiento fue un testigo absoluto en donde únicamente se aplicó agua destilada estéril a ambos estados de desarrollo de roya. La cepa de *Simplicillium* utilizada en este experimento fue la que presentó mejores resultados en el experimento de colonización de pústulas de *H. vastatrix*; actualmente se encuentra en el Laboratorio de Control Microbial del Centro Agronómico Tropical de investigación y Enseñanza (CATIE) conservada por el método de papel filtro (Morales 2008).

2.2.1. Producción de conidios

La cepa seleccionada previamente fue reaislada del papel filtro y sembrada en medio PDA; posteriormente se obtuvieron colonias monospóricas de 15 días de edad, de las colonias se obtuvieron los conidios a utilizar y además fueron la fuente de inóculo para el medio de cultivo utilizado para producir blastosporas, cuyo proceso se detalla en el siguiente apartado.

2.2.2. Producción de blastosporas

El medio utilizado contenía como fuentes alternas de carbono y nitrógeno sacarosa comercial y el fertilizante foliar Bayfolán^R (Bayer), a concentraciones de 7.5 g y 54.6 mL/L, respectivamente; 10 g/L de soya (SOYASAN^R) y 5 g/L de quitina coloidal, para obtener una relación carbono:nitrógeno 1:2. Frascos Erlenmeyer con capacidad de 125 mL que contenían el medio de cultivo fueron colocados sobre un agitador orbital (VWR Scientific Products – USA) a 150 rpm a temperatura entre 25 y 28°C. El tiempo total de fermentación bajo estas condiciones fue de 10 días.

2.2.3. Método y dosis de aplicación

Una vez que el medio tenía 10 días de fermentación, se preparó un filtrado del mismo. Seguidamente fueron hechas diluciones seriadas hasta obtener concentraciones que permitieran el conteo de blastosporas. Después y con la ayuda de una cámara Neubauer se determinó el número de esporas contenido por mililitro de medio de cultivo y, finalmente, se ajustó a una concentración de 1×10^7 blastosporas/mL (dosis empleada). La aplicación de esporas fue realizada bajo la misma metodología descrita en el experimento anterior.

2.2.4. Medición de la variable respuesta

La variable y metodología usada para esta medición fue la misma que se realizó en el primer experimento.

2.2.5. Diseño y análisis estadístico

El experimento constó de 10 repeticiones, cada una de las cuales constaba de dos placas multipozos (seis cavidades) de tal manera que en cada placa se colocaron seis discos de hoja, tres con pústulas de *H. vastatrix* en estado de desarrollo intermedio y tres en estado avanzado. A cada estado de desarrollo se le aplicó el tratamiento correspondiente (conidios, blastosporas o ADE). El análisis de datos se realizó mediante Modelos Lineales Generales y Mixtos con el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.* 2016).

2.3. Eficacia de conidios y blastosporas de *Simplicillium* en el control de roya – fase de campo

La evaluación se hizo durante los años 2016 y 2017. En el primer año se evaluaron tres tratamientos: aplicación de conidios de *Simplicillium* sp., aplicación de blastosporas de *Simplicillium* sp., aplicación de un biol. Un cuarto tratamiento consistió de un testigo sin aplicación. En el segundo año solo se midió el efecto de conidios y blastosporas.

2.3.1. Ubicación

El estudio se llevó a cabo en una plantación de café de la variedad Caturra ubicado en el CATIE con una densidad de 5000 plantas/ha distanciadas dos metros entre hileras y un metro entre plantas. La plantación está bajo sombra proporcionada por árboles de cashá (*Abarema idiopoda*). La temperatura promedio registrada en el área de estudio durante los últimos años ha sido de 22.4°C y 90.6% de humedad relativa.

2.3.2. Método y dosis de aplicación

La aplicación fue hecha con una aspersora manual con una capacidad de 20 L y boquilla tipo D-1. La aspersión se hizo cubriendo el total del follaje de las plantas de café. La dosis de aplicación de conidios y blastosporas de *Simplicillium* fue de 1×10^7 ; en todos los casos se adicionó Tween 80 a 0.1% como dispersante y Nufilm^{MR} a razón de 1 mL/L. Previamente fueron hechas pruebas de germinación de esporas. La dosis del biol evaluado fue de 1 L/20 L de agua, dosis usada por los productores. La aspersora se calibró para una aplicación de un volumen total de agua de 80 mL/planta.

2.3.3. Diseño y análisis estadístico

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar. Cada tratamiento constó de cinco repeticiones, cada una conformada por nueve plantas que fueron asperjadas completamente de acuerdo al tratamiento y bajo la metodología expuesta en el apartado anterior. Las observaciones se realizaron en el 2016 directamente en la planta del centro de cada repetición, tomando tres bandolas de la parte baja, centro y alta de la planta. En el 2017 se tomaron fotografías en el total de hojas de cada bandola. Seguidamente las imágenes fueron procesadas con el Software ImageJ 1.47v (Rasband 2016) para registrar el porcentaje de parasitismo de *Simplicillium* sobre pústulas de roya.

3. Resultados

3.1. Bioensayos de cepas locales contra *H. vastatrix*

El análisis estadístico muestra una diferencia altamente significativa entre las cepas evaluadas ($p < 0.0001$). El avance de la colonización de cepas tuvo un comportamiento similar en ambas etapas evaluadas; es decir, no se observó diferencia estadística para estado de desarrollo ($p=0.1025$). La cepa EC mostró ser la más efectiva, al colonizar en menor tiempo las pústulas de roya, seguida de la cepa SJ; en tercer lugar en grado de efectividad estuvieron las cepas SR y JV, cuyos valores no difirieron estadísticamente ($LSD=0.05$). La cepa AQ mostró un menor desempeño respecto a las demás (Figura 8). Con base en los resultados obtenidos se seleccionó la cepa EC para ser comparada con el resto de las cepas (ver siguiente apartado).

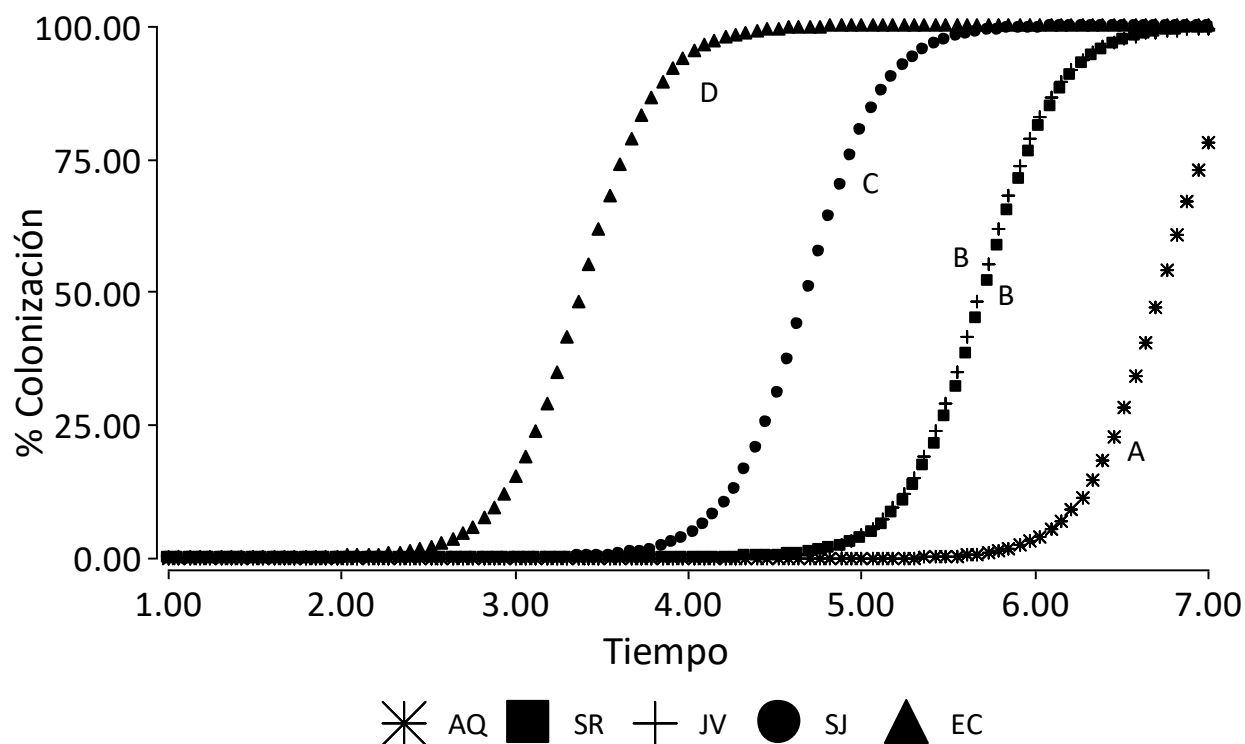


Figura 8. Eficacia de cepas locales de *Simplicillium* spp. colonizando pústulas de *H. vastatrix* (AQ: AQUIARES; SR: Santa Rosa; JV: Jabillos; SJ: San Juan Norte; EC: CATIE)

3.2. Bioensayos de cepas comerciales contra *H. vastatrix*

Al hacer la comparación de cepas comerciales, artesanal y la mejor cepa local seleccionada en el ensayo anterior, se observó una diferencia estadística altamente significativa ($p < 0.0001$). Al igual que en el experimento anterior, la variable evaluada no difirió estadísticamente en los estados de desarrollo intermedio y avanzado ($p=0.9902$). Los porcentajes más altos de colonización en menor tiempo se dieron en la cepa EC, esta misma cepa (EC1), después de ser almacenada mediante el método de papel filtro, no sufrió pérdida de virulencia. En segundo lugar de eficacia estuvo la artesanal INA y, finalmente, y con un desempeño muy pobre las cepas comerciales C2 y C1 (Figura 9).

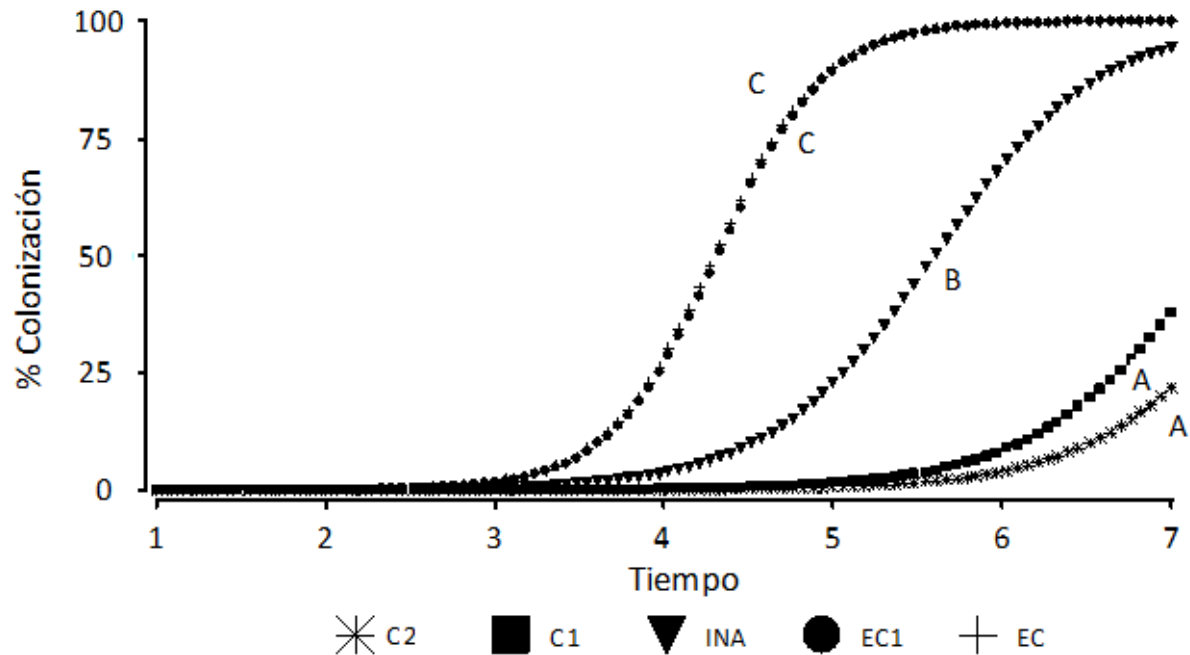


Figura 9. Eficacia de cepas comerciales en la colonización de pústulas de *H. vastatrix* (C2: comercial; C1: comercial; INA: artesanal; EC1: CATIE almacenada; EC: CATIE)

3.3. Eficacia de conidios y blastosporas de *Simplicillium* colonizando pústulas de roya

Los resultados obtenidos de la colonización por blastosporas y conidios sobre los diferentes estados de desarrollo de *H. vastatrix* no difirió de manera significativa entre los tratamientos. Por el contrario y en contraposición de los resultados de los experimentos anteriores, en este bioensayo si se detectó diferencia estadísticamente significativa en la colonización de discos de hojas de café infectados de *H. vastatrix* en estados de desarrollo intermedio y avanzado ($p < 0.0012$). En la Figura 10 se muestran las curvas de crecimiento de la colonización de *Simplicillium* spp. sobre ambos estados de desarrollo con sus respectivos intervalos de confianza.

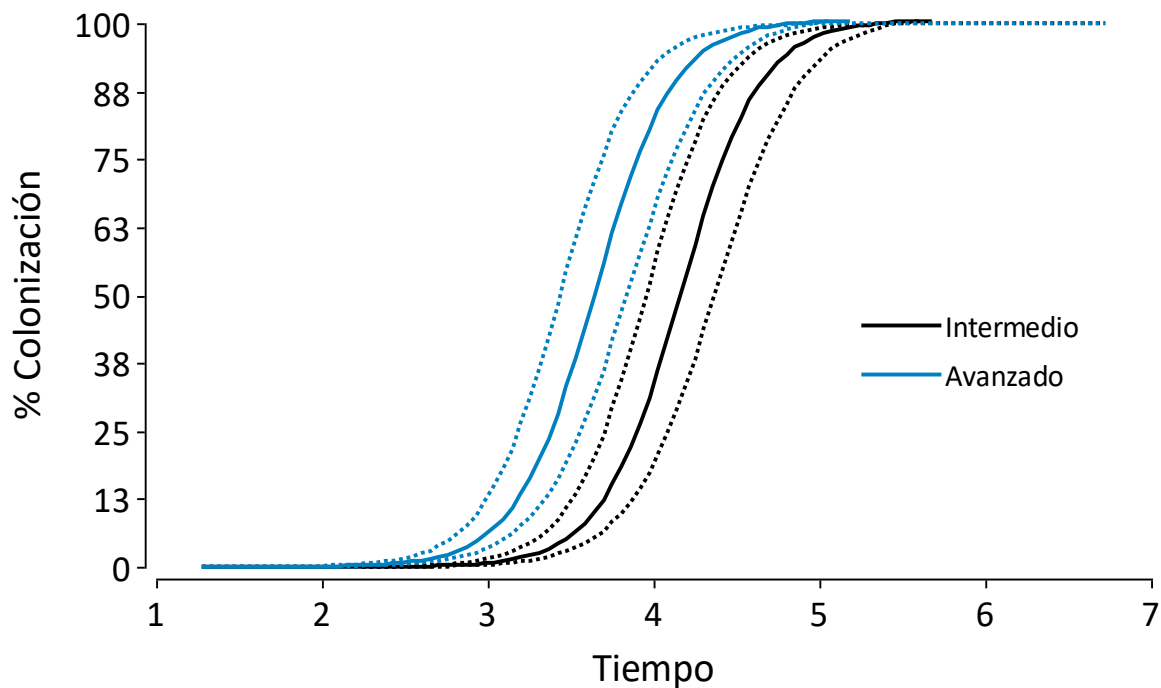


Figura 10. Eficacia de conidios y blastosporas de *Simplicillium* en la colonización de pústulas de *H. vastatrix*

3.4. Eficacia de conidios y blastosporas de *Simplicillium* en el control de roya –fase de campo 2016 – 2017

El porcentaje de parasitismo sobre pústulas de roya en el ensayo del 2016 fue bajo en todos los tratamientos. En el tratamiento testigo sin aplicación, el control natural (CN) ofrecido por *Simplicillium* apenas alcanzó un 1,84 %. La diferencia más notable pero no significativa, fue de cuatro puntos porcentuales entre el tratamiento donde se aplicó blastosporas y el testigo. La aplicación de conidios y el biol produjo un parasitismo del 4,2 y 3%, respectivamente (Figura 11).

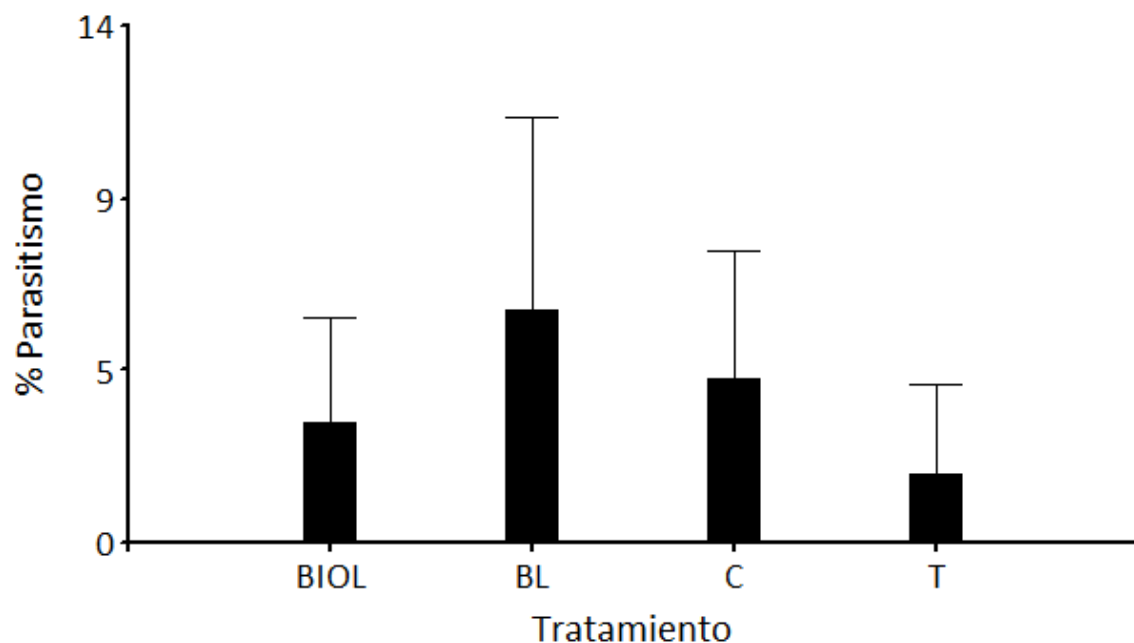


Figura 11. Parasitismo (%) en pústulas de roya producido por dos tipos de esporas de *Simplicillium* y parasitismo natural al aplicar un biol

(**BIOL**: biol; **BL**: blastosporas; **C**: conidios; **T**: testigo)

Durante el año 2017, la incidencia de roya en la parcela donde se llevó a cabo el ensayo fue baja; el número de lesiones por hoja no fue perceptible. El número de observaciones realizadas durante el experimento varió de 1000 a 1076 debido al bajo nivel de infección por roya; con tal número de observaciones, el área de lesión de pústulas de roya y por ende el efecto del parasitismo de *Simplicillium* se vio “diluido” (Cuadro 6).

Cuadro 6. Número de observaciones y variables medidas en campo durante 2017

Tratamiento	No. de observaciones	No. de lesiones/hoja	Área de lesión (cm ²)	Parasitismo (%)
Blastosporas	1076.00	0.03	6.8E-05	5.2E-05
Conidios	1000.00	0.09	1.6E-04	9.4E-05
Testigo	1041.00	0.22	9.8E-04	1.3E-04

4. Discusión

El grado de virulencia mostrado por la cepa EC. Esta cepa empezó e incrementó la colonización sobre pústulas de roya a partir del tercer día de inoculación, alcanzando niveles superiores al 90% al cuarto día y el 100% al quinto día de la inoculación.

Los resultados de virulencia de esta cepa indican un mayor grado de especificidad de los aislamientos locales en comparación de las cepas comerciales evaluadas. Una observación relevante es que la cepa INA, según los análisis de identificación realizados corresponde al género *Simplicillium*, al igual que las cepas locales; esta cepa alcanzó el segundo lugar de eficiencia después de EC y EC1, lo cual sugiere que este género presenta un grado alto de especificidad hacia *H. vastatrix*. Lo anterior se respalda por el hecho de que las cepas C1 (*L. attenuatum*) y la C2 (*Lecanicillium* sp.) no fueron capaces de colonizar completamente, incluso no alcanzaron un 50%.

Nuestros resultados coinciden con estudios similares realizados en México por Gómez *et al.* (2017), quienes después de aislar y evaluar el efecto de control de diferentes cepas de hongos micoparásitos en pústulas de roya, determinaron que el hongo *Simplicillium* alcanzó un 88.86 % de parasitismo, mientras que *Lecanicillium* un 68.1 % 120 h después de la inoculación

Al igual que en el principal objetivo del estudio, se demuestra que el método de conservación de papel filtro no demerita la patogenicidad de *Simplicillium* hacia *H. vastatrix*. El uso de este método ha demostrado ser eficiente en conservar hongos entomopatógenos y fitopatógenos por más de cinco años sin afectar su capacidad patogénica (Morales 2008). Aun y cuando la cepa EC tenía solo un mes de almacenada, su evaluación destacó su capacidad de soportar la desecación final del proceso sin ser afectada y se recupera fácilmente del papel filtro para ser utilizada nuevamente. Eficacia de conidios y blastosporas de *Simplicillium* en la colonización de pústulas de *H. vastatrix*

Los resultados del uso de ambos tipos de esporas son contrastantes. Vega *et al.* (2000) sugieren que el uso de blastosporas podría ser mejor que el uso de conidios porque las primeras germinan más rápido y poseen reservas adquiridas del medio líquido en el cual fueron producidas. Fargues *et al.* (1994) reportaron mayor grado de virulencia de blastosporas que conidios de *Paecilomyces fumosoroseus* al ser aplicadas sobre el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* Smith. Vandenberg *et al.* (1998) no encontraron diferencias entre ambos tipos de esporas de *P. fumosoroseus* en el control del áfido *Diuraphis noxia* Kurdjumov. Osuna *et al.* (2003) obtuvieron el mismo grado de virulencia al usar propágulos de cultivo sumergido y conidios de *P. fumosoroseus* contra ninfas de la mosquita blanca *Bemisia* spp.

Los resultados presentados por este estudio son los primeros que anteponen y miden el efecto de *Simplicillium* como el principal enemigo natural de *H. vastatrix* en Costa Rica. La mayoría de publicaciones referidas al control biológico de roya del cafeto son enfocadas al uso de *Lecanicillium* como controlador biológico (Esques *et al.* 1991; Monzón 1992; Rivas *et al.* 1996; Canjura *et al.* 2002; Vandermeer *et al.* 2009; Jackson *et al.* 2012; Rivillas 2015; Pérez 2015).

A pesar de la especificidad que demuestra *Simplicillium* hacia *H. vastatrix*, los resultados obtenidos en campo no aumentaron significativamente el porcentaje de parasitismo respecto al

CN; los resultados de CN observados fueron bajos. Al respecto, Pico (2014) reporta porcentajes de parasitismo natural dado por *L. lecanii* (posiblemente *Simplicillium*) de 3.8 a 8.3% en plantas de café bajo sombra media, condiciones similares a las nuestras. En estudios hechos por Monzón (1992) señala que el CN de *H. vastatrix* no supera el 14%, aún y con infestaciones altas de la enfermedad. En cuanto al control biológico inducido, Canjura *et al.* (2002) obtuvieron un 10.5 % de parasitismo al hacer aplicaciones de *Verticillium* (= *Lecanicillium*) en plantas de café establecidas en macetas y no encontraron diferencias significativas respecto al testigo.

5. Literatura citada

- Avelino, J; Willocquet, L; Savari, S. 2004. Effects of crop management patterns on coffee rust epidemics. *Plant. Pathol.* 53(5): 541–547.
- Barquero, M. M. 2013. Recomendaciones para el combate de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.). Instituto del Café en Costa Rica ICAFE. 63 p.
- Campbell, R. 1990. Biological control of microbial plant pathogens. New York, United States of America, Cambridge University Press. 94 p.
- Canjura, S. E. M; Sánchez G. V; Krauss U; Somarriba E. 2002. Reproducción masiva de *Verticillium* sp., hiperparásito de la roya del café, *Hemileia vastatrix*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 66:13-19.
- Di Rienzo J.A; Casanoves F; Balzarini M.G; Gonzalez L; Tablada M; Robledo, CW; InfoStat versión 2016. Córdoba, Argentina, Universidad Nacional de Córdoba. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>
- Esques, A; Mendes; M; Robbs C. 1991. Laboratory and field studies on parasitism of *Hemileia vastatrix* with *Verticillium lecanii* and *V. leptobactrum*. *Café, Cacao* 4(35): 275–282.
- Fargues, J; Maniania N; Delmas J. C. 1994. Infectivity of propagules of *Paecilomyces fumosoroseus* during in vitro development to *Spodoptera frugiperda*. *J. Invertebr. Pathol.* 64(3):173–178.
- Gómez, D. C. I; Pérez P. E; Escamilla P. E; Martínez B. M; Carrion V. G. L. L; Hernández L. T. I. 2017. Selección *in vitro* de miciparásitos con potencial de control biológico sobre roya del café (*Hemileia vastatrix*). *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1):172–183.
- Gouveia, M. M. C; Ribeiro A; Várzea V. M. P; Rodríguez C. J. 2005. Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* base don RAPD markers. *Mycologia* 97(2):396–404.
- Guharay, F; Monterroso D; Staver C. 2001 El diseño y manejo de la sombra para la supresión de plagas en cafetales de América Central. *Agroforestería en las Américas* 8(29):22-29.
- Haddad, F; Maffia L. A; Mizubuti E. S. G; Teixeira H. 2009. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. *Biol. Control* 49(2):114-119.

- Jackson, MA. 2000. Microbial biopesticides. *In* Encyclopedia of Microbiology. 2nd Edn. San Diego, United States of America, Academic Press. p. 541–555.
- Jackson, D; Zemenick K; Huerta G. 2012. Ocurrence in the soil and dispersal of *Lecanicillium lecanii* a fungal pathogen of the green coffee scale (*Coccus viridis*) and coffee rust (*Hemileia vastatrix*). *Trop. Subtrop. Agroec.* 15(2):389–401.
- Lacey, L. A; Kirk A; Millar L; Mercadier G; Vidal C. 1999. Ovicidal and larvicidal activity of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay system allowing prolonged survival of control insects. *Biocontrol Science and Tech.* 9(1):9–18.
- Monzón, J. A. 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.). Thesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 66 p.
- Morales, A. 2008. A simple way to preserve fungal cultures. Cornell University. URL Disponible en <https://blog.mycology.cornell.edu/2008/01/10/a-simple-way-to-preserve-fungal-cultures/>
- Osuna, P. A. G; Estrada R. F. J; Caro M. P. H; Galván P. B; Cárdenas C. H. M. 2003. Virulencia de conidios aéreos y de propágulos de cultivo sumergido de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) Brown and Smith contra ninfas de *Bemisia* (Gennadius) spp. en un cultivo de Berenjena (*Solanum melongena* L.). *Rev. Mex. De Fitopatol.* 21(3):292–299.
- Pérez, V. L. 2015. La roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*) en Cuba: Evolución al manejo alternativo de la enfermedad. *In* Memorias del Seminario Científico Internacional “Manejo Agroecológico de la Roya del Café”. FAO. Panamá, Panamá p. 17-19.
- Pico Rosado, J. T. 2014. Efecto de la sombra del café y el manejo sobre la incidencia, severidad, cantidad de inóculo y dispersión de *Hemileia vastatrix* en Turrialba, Costa Rica. Thesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 65 p.
- Promecafé (Programa Cooperativo Regional para el Desarrollo Tecnológico y la Modernización de la Caficultura); IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 2013. La crisis del café en Mesoamérica. Causas y respuestas apropiadas. Disponible en <http://legacy.iica.int/Esp/prensa/BoletinRoya/2013/N01/Roya-MA.pdf>
- Rasband, W.S. 2016. ImageJ, U. S. Maryland, United States of America, National Institutes of Health, Bethesda Disponible en <http://imagej.nih.gov/ij/>
- Rivas, S; Leguizamón. J; Ponce, C. 1996. Estudio histológico, anatómico y morfológico de *Verticillium lecanii* y *Talaromyces wortmannii* con *Hemileia vastatrix*. *Cenicafe* 47(1):16–31.

- Rivillas, O. C. A. 2015. Acciones emprendidas por Colombia en el manejo de la roya del cafeto. *In* Memorias del Seminario Científico Internacional “Manejo Agroecológico de la Roya del Café”. Panamá, Panamá. FAO. p. 11-16.
- Suresh, N; Ram A. S; Shivanna M. B. 2012. Coffee Leaf Rust and Disease Triangle: A Case Study. *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences* 2(2):50-55.
- Vandenberg, J. D; Jackson M. A; Lacey L. A. 1998. Relative efficacy of blastospores and aerial conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* against the russian wheat aphid. *J. Invertebr. Pathol.* 72(2):181–183.
- Vandermeer, J; Perfecto I; Liere H. 2009. Evidence for hyperparasitism of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) by entomogenous fungus, *Lecanicillium lecanii*, through a complex ecological web. *Plant Pathology* 58(4):636–641.
- Vega, F. E; Jackson A. M; McGuire R. M. 2000. Germination of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* on the cuticle of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Mycopathologia* 147(1):33–35.
- Vélez, A. P. E; Rosillo G. A. G. 1995. Evaluación del antagonismo del hongo *Verticillium lecanii*, sobre *Hemileia vastatrix*, en condiciones de invernadero y de campo. *Cenicafé* 46(1): 45-55.
- Virginio Filho, E de M. 2017. Cafetales sanos, productivos y ambientalmente amigables. Guía para trabajo con familias productoras. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 32 p.
- Zare, R; Gams, W. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. *Nova Hedwigia* 73:1-50.

Capítulo V. Composición microbiana y efecto de los bioles en el control de *Cercospora coffeicola*

Resumen

Se analizó la diversidad genética y se hizo una cuantificación general sobre la composición microbiana de MM y bioles. También se estudió el efecto antagónico individual de microorganismos aislados de biofermentos y el efecto de metabolitos secundarios de estos contra la mancha de hierro del café (*Cercospora coffeicola*). Tanto los MM como los bioles poseen una carga genética muy diversa tanto de hongos como de bacterias (índices de diversidad de Shannon superiores a 3 en las muestras analizadas). El proceso de fermentación de los bioles, que conlleva la inclusión de sales minerales, afecta negativamente la viabilidad de la población microbial que estos puedan contener. De manera particular, aquellas muestras a las que se añadió alguna fuente de cobre no tuvieron crecimiento en los medios en que fueron sembrados. De acuerdo a las pruebas de duales y evaluación de metabolitos secundarios, se determinó que el efecto antagónico de los bioles hacia *C. coffeicola* está determinado por el efecto individual de microorganismos presentes y no debido a metabolitos secundarios que estos contienen.

1. Introducción

Los métodos de producción de bioles varían fuertemente de una zona a otra; sin embargo, en Costa Rica se puede citar el siguiente procedimiento de modo general: El primer paso es hacer la colecta de tierra y hojarasca de mantos de bosque sin disturbar, los cuales se mezclan con melaza, cereales o leguminosas y con agua dentro de un recipiente hermético para que ocurra una fermentación anaeróbica. Este proceso puede durar de 30 a 35 días; pasado este tiempo se colecta el residuo líquido (a lo que se le conoce como microorganismos de montaña (MM)). El siguiente paso es mezclar los MM líquidos con estiércol fresco de vaca, harina de roca, ceniza, suero de leche, melaza y azúcar (Infoagro 2016). Otro método de producción puede consultarse en Álvarez (2010).

La dosis de aplicación recomendada del primer método es un poco confusa, pues la recomendación es generalizada a cualquier cultivo y, por ende, no se especifica el volumen por hectárea de biol; más bien, se recomienda un litro de biol aplicado de manera foliar con aspersora de mochila de 20 litros; las aplicaciones al suelo se recomiendan en 2 litros o más de biol por aspersora.

Algunos autores señalan que las enmiendas orgánicas pueden disminuir la severidad de algunas enfermedades de las plantas mediante la combinación de características fisicoquímicas y biológicas (Rou 2003; Kone 2010). Otros han obtenido resultados contrastantes en el control de algunas enfermedades. Por ejemplo, Hassan *et al.* (2013) al evaluar tés de composta en el control de antracnosis y *Cercospora* en plantas de chile, reportan haber disminuido la incidencia de antracnosis pero, en el caso de cercospora, el índice de severidad (en rango de 1 a 7) se incrementó 1,3 veces cuando se usaron tés de composta con respecto al testigo.

En otros estudios se han encontrado resultados espectaculares, pero sin la seguridad total de si el efecto fue debido a los tratamientos. Por ejemplo, en el cultivo de acelga se han evaluado “microorganismos eficientes” (ME) aislados del manto de bosque, potreros y plantaciones de café y fermentados junto con melaza para después ser aplicados al follaje y al suelo; al final del ciclo las parcelas donde se aplicaron los microorganismos de potreros y café tuvieron un 0% de incidencia de plagas; los autores lo atribuyen (especulan) a que pudo ser debido a que los sitios de donde fueron aislados los microorganismos podrían presentar una alta población de bacterias ácido lácticas (hecho no corroborado), las cuales según se ha reportado limitan organismos dañinos de las plantas (Campo *et al.* 2014).

Los objetivos de la investigación fueron: 1) Determinar la composición microbiana de diferentes bioles y 2) Medir el efecto de biofermentos en el control de *C. coffeicola*.

2. Materiales y métodos

2.1. Colecta de bioles

Se colectaron un total de 9 muestras de biofermentos que incluyeron tanto “microorganismos de montaña” (MM) y bioles terminados, a los cuales les fueron añadidos diferentes sales, práctica común realizada por los fabricantes de bioles para después recomendarlos como controladores de enfermedades o fuente de nutrientes. En el Cuadro 7 se enlistan las muestras de biofermentos utilizados y una breve descripción de estos.

Cuadro 7. Descripción de los biofermentos analizados

Biofermento	Descripción
MM Apoya	Microorganismos de montaña
MM JJ	Microorganismos de montaña (Zarcero)
B Apoya	Biol multiminerales (Mn, Cu, K, Ca y B)
B JJ	Biol (Zarcero)
B-SM	Biol sin minerales añadidos
B-D	Biol de dolomita
B-RF	Biol de roca fosfórica
B-MS	Biol Mn y CuSO ₄
B-SB	Biol con boro

2.2. Diversidad genética de MM y bioles

Cuatro muestras de biofermentos fueron enviadas al Laboratorio de Biología Molecular de Corbana S.A. para determinar índices de diversidad (Shannon) para bacterias y hongos. La técnica

utilizada fue electroforesis en gel en gradiente denaturante, amplificando marcadores moleculares mediante PCR (PCR-DGGE). Las cuatro muestras sometidas a este análisis fueron: MM Apoya, B Apoya, el cual fue inoculado con el primero previamente al proceso de fermentación; las dos muestras restantes fueron MM JJ y B JJ, que siguieron el mismo proceso de inoculación al anterior. La finalidad fue observar cambios en la comunidad microbiana a nivel de material genético de hongos y bacterias de los MM y al final del proceso de fermentación de los bioles.

2.3. Composición microbiana de biofermentos

El primer paso para determinar la composición microbiana de los biofermentos fue realizar diluciones seriadas de cada uno. Para esto se tomó 1 mL de cada muestra que fue mezclado en 9 mL de ADE más Tween 80 a 0.1%, (dilución 10^{-1}); después se tomó 1 mL de la solución anterior y se mezcló nuevamente con 9 mL de ADE para obtener una dilución 10^{-2} . Este procedimiento se hizo hasta obtener una muestra diluida hasta 10^{-6} . Posteriormente se sembraron 100 μ L de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} en los medios AN, PDA y Agar actino; los cultivos fueron almacenados a 25 – 26°C durante 48 horas. Pasado este tiempo se contabilizaron el número total de ufc por muestra.

2.4. Efecto de biofermentos en el control de enfermedades

La fase de laboratorio para esta actividad comprendió la aplicación de cultivos duales y pruebas de metabolitos secundarios para determinar el grado de antagonismo ejercido por efecto individual de microorganismos comunes en los biofermentos, así como el efecto de metabolitos difusibles al medio. Como organismo patógeno se utilizó un cultivo de *Cercospora coffeicola* previamente aislado de hojas de café.

2.5. Cultivos duales

Para los cultivos duales se utilizaron dos organismos encontrados constantemente en las diferentes muestras: *Kazachstania unispora* (tratamiento 1) y *Galactomyces* sp. (tratamiento 2). Estos organismos fueron previamente identificados en el laboratorio de biología molecular de Corbana S.A. Se utilizaron cultivos de 15 días de edad en el medio PDA. Para el caso de *K. unispora* se hizo primero una suspensión de esporas en ADE en donde se sumergieron discos de papel filtro de 1 cm de diámetro, los cuales fueron colocados a 3 cm del borde del plato Petri que contenía PDA y a 3 cm de distancia de un disco de cultivo de 1 cm de diámetro de PDA que contenía *C. coffeicola*. Para el caso de *Galactomyces* se usaron discos de cultivo de las mismas dimensiones. Después de siete días de incubación a 26°C se midió el crecimiento de las colonias aplicando la ecuación de Royse y Ries (1978):

$$\%I=100 \times [(r1-r2)/r1]$$

Donde:

%I = Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del patógeno

r1 = Crecimiento radial de la colonia del patógeno (*C. coffeicola*)

r2 = Crecimiento radial de la colonia del patógeno en orientación directa al antagonista (*K. unispora* o *Galactomyces*).

2.6. Efecto de metabolitos secundarios contra *C. coffeicola*

Se midió el efecto de metabolitos difusibles al medio de *Galactomyces* (tratamiento 3) y de metabolitos totales y de un biofermento comercial (tratamiento 4). Para el primer caso, primeramente se colocó un disco de papel celofán previamente esterilizado sobre el medio PDA que cubrió la totalidad del mismo; después, sobre el papel celofán se colocó 1 cm² de un cultivo de *Galactomyces* de 15 días de edad. Después de 48 horas se retiró el papel celofán conteniendo el cultivo de *Galactomyces* y se sembró un disco de 1 cm de diámetro de un cultivo puro de *C. coffeicola* sobre el medio que estuvo en contacto con el papel celofán. Paralelamente al procedimiento anterior se hicieron siembras de *Cercospora* en PDA sin contacto previo de papel celofán con *Galactomyces*, con el fin de utilizarlos como testigo.

La prueba de metabolitos totales del biol comercial, al tratarse de una muestra líquida, siguió el procedimiento siguiente: primeramente se hizo un centrifugado y el supernatante se pasó por un filtro Polydisc^R de 0.2 µm; posteriormente se hizo un rayado de 100 µL de filtrado sobre PDA. Después de 48 h se corroboró la ausencia de crecimiento de microorganismos y se procedió a poner un disco de 1 cm de diámetro en el centro de las cajas Petri donde previamente se rayó el filtrado. Paralelamente se colocaron discos de *C. coffeicola* sobre PDA sin contener el filtrado del biol, para ser utilizados como testigo.

El porcentaje de inhibición de crecimiento radial fue medido usando la misma fórmula indicada para el procedimiento de cultivos duales. En este caso se consideró “r1” como el crecimiento radial de las colonias de *C. coffeicola* usadas como testigo y “r2” como el crecimiento radial de las colonias de *C. coffeicola* en el medio que estuvo expuesto a los metabolitos, fuesen de los organismos individuales o del biol en sí.

2.7. Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.* 2016), como un diseño completamente al azar con 10 repeticiones para todos los casos, donde cada una correspondió a una caja Petri.

3. Resultados

3.1. Diversidad genética y composición microbiana de biofermentos

La diversidad genética entre biofermentos no varió de manera considerable (Cuadro 8 y Anexo 3). Los valores de H' indicaron que tanto los MM como los bioles que fueron inoculados con estos, poseen una carga genética muy diversa tanto para hongos como para bacterias (valores superiores a 3 en todos los casos). Contrariamente, cuando se hizo la cuantificación de microorganismos en medios de cultivo (Cuadro 9), la muestra B Apoya que contenía cinco minerales añadidos no mostró crecimiento de microorganismos, mientras que los MM utilizados para inocular este biol tuvieron 1.8×10^7 y 2.5×10^7 ufc en los medios PDA y agar nutriente (AN), respectivamente. Otro biol que registró cero crecimiento microbial fue B-MSC (que contenían Mn y CuSO_4 añadidos) La mayor cantidad de microorganismos presentes lo tuvo el biol sin minerales añadidos (B-SM) con una concentración de 1.8×10^8 ufc en el medio PDA, seguido del biol que contenía roca fosfórica (B-RF)

Cuadro 8. Índice de diversidad de Shannon (H') presentes en microorganismos de montaña (MM) y en bioles

Muestra	H'	
	Bacterias	Hongos
MM Apoya	3.44	3.56
B Apoya	3.33	3.29
MM JJ	3.07	3.38
B JJ	3.09	3.27

¹Valor de H: 1 a 2 baja; 2 a 3 mediana; 3 a 4 alta

Cuadro 9. Unidades formadoras de colonias (ufc) en MM y diferentes formulaciones de bioles producidos para el combate de enfermedades del cultivo del café

Muestra	Medio de cultivo/ufc		
	PDA	Agar actino	Agar nutriente
MM JJ	4.4×10^7	-	3.2×10^7
BJJ	5×10^6	-	1.5×10^7
MM Apoya	1.8×10^7	-	2.5×10^7
BApoya*	0	-	0
B-SM ¹	1.8×10^8	5.1×10^6	2.3×10^7
B-D ²	$8. \times 10^7$	3×10^6	5×10^6
B-RF ³	1.46×10^8	5.8×10^6	9.1×10^6
B-MSC ⁴	0	0	0
B-SB ⁵	1×10^8	1.4×10^6	7.5×10^6

*Biol Mn, Cu, K, Ca y B; ¹Biol sin minerales añadidos; ²Biol con dolomita; ³Biol con roca fosfórica; ⁴Biol con Mn y CuSO_4 ; ⁵Biol con B.

3.2. Efecto de biofermentos en el control de enfermedades

El grado de antagonismo hacia *C. coffeicola* varió significativamente entre tratamientos ($p < 0.0001$). En los cultivos duales (tratamientos 1 y 2) se registraron los mayores porcentajes de inhibición de crecimiento; el efecto de ambos tratamientos fue igual (LSD=0.05). Respecto a la evaluación de metabolitos, el tratamiento 3 (metabolitos de *Galactomyces*) superó el efecto de metabolitos totales del biol comercial (Figura 12).

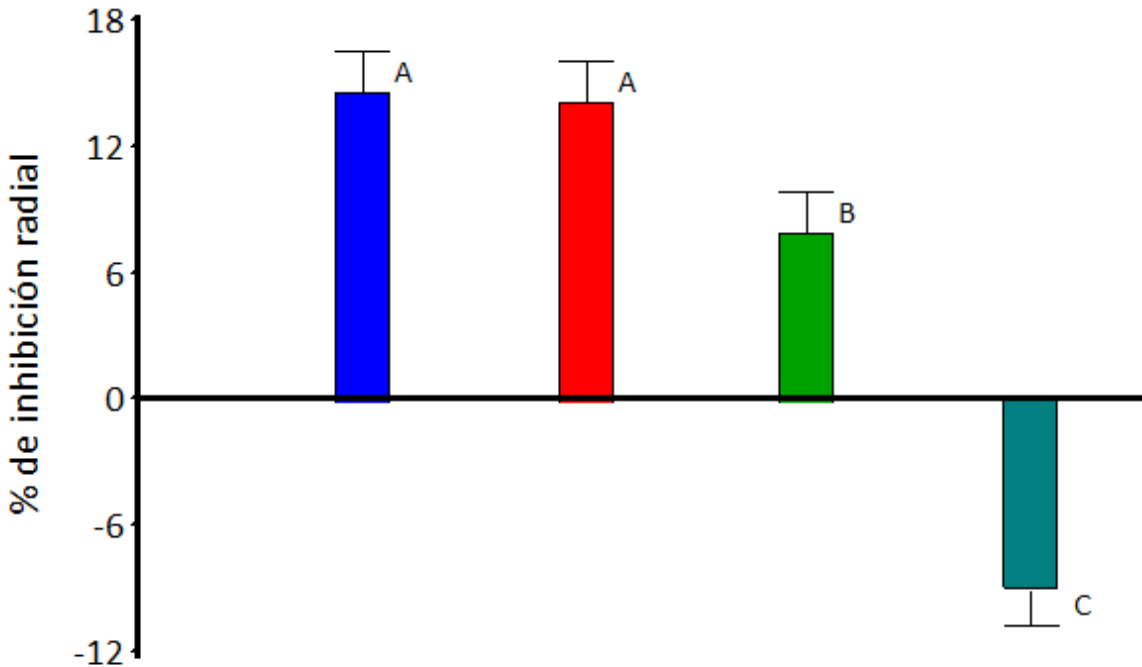


Figura 12. Inhibición del crecimiento radial de *Cercospora coffeicola* debido al efecto individual de microorganismos y metabolitos difusibles al medio

■ Cultivo dual *K. unispora* ■ Cultivo dual *Galactomyces* ■ Metabolitos de *Galactomyces*
■ Metabolitos de biol

4. Discusión

Los índices de diversidad de Shannon que arrojaron los análisis moleculares indican que la diversidad de microorganismos en los bioles es alta, pero al cuantificar el crecimiento de microorganismos en medios de cultivo se pudo apreciar que su viabilidad puede ser afectada de manera severa debido al proceso de fermentación, como fue el caso del biol B Apoya cuya diversidad genética fue alta y tuvo cero ufc en los medios evaluados. Es importante señalar que los MM utilizados para inocular este biol sí presentaron crecimiento de microorganismos, pero el proceso de fermentación que conlleva la inclusión de sales minerales afectó negativamente la población microbiana en los biofermentos. De manera particular, aquellas muestras a las que se

añadió alguna fuente de cobre (B Apoya, B-MSc) no presentaron crecimiento de microorganismos. Dicho elemento tiene efecto fungicida y bactericida, y es posible que los encargados de elaborar bioles agreguen este elemento con la finalidad de que al momento de ser usados en los cultivos, ejerzan un control de enfermedades a nivel de campo pero, inconscientemente están eliminando la población microbiana por la que supuestamente son atractivos los biofermentos para la sanidad de los cultivos. Recientemente, Xiu (2018) reportó una disminución en la diversidad genética de bioles en comparación con los MM utilizados para su inoculación. El autor menciona que dicha disminución pudo ser debida a la adición de sales minerales durante el proceso de fermentación. Si la cantidad de microorganismos es tomada como indicador de calidad de un biol (García 2006), la adición de fertilizantes sintéticos no debería ser contemplada durante el proceso de fermentación.

El efecto antagónico de los bioles hacia *C. coffeicola* está determinado por el efecto individual de microorganismos presentes y no debido a metabolitos secundarios que estos contienen, tal y como se muestra en la Figura 12. Los cultivos duales donde se enfrentó a *K. unispora* y *Galactomyces* con el patógeno demeritaron en mayor medida el crecimiento de este, mientras que cuando se midió el efecto de metabolitos totales que contenía el biol, no solo no hubo inhibición de crecimiento si no que la colonia del patógeno en contacto con estos tuvieron un mayor crecimiento.

5. Literatura citada

Álvarez, F. 2010. Preparación y uso de biol. Lima, Perú, ITDG. 29 p.

Campo, M. A. P; Acosta S. R. L; Morales V. S; Alonso P. F. 2014. Evaluación de microorganismos de montaña (MM) en la producción de acelga en la meseta de Popayán. *Biocología en el sector agropecuario y agroindustrial* 12(1):79–87.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2016. Córdoba, Argentina, Universidad Nacional de Córdoba. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>

Infoagro 2016. Elaboración de MM, bioles y biopesticidas en Costa Rica (en línea). Disponible en www.infoagro.go.cr/.../elaboracion%20Abonos%20y%20bioles%20nov%202012.pdf.

García, M. J. F. 2006. Principios generales de agricultura orgánica. Tunja, Colombia, Fundación Universitaria Juan Castellanos.. 180 p.

Hassan, M. R; Hossain I; Islam M. R; Khokon M. A. R. 2013. Comparative efficacy of compost, compost tea, poultry litter and bavistin in controlling diseases of chili. *Progress. Agric.* 24(1 & 2):39–44.

Koné, S. B; Dionne A; Tweddell R. J; Antoun H; Avis T. J. 2010. Suppressive effect of non-aerated compost teas on foliar fungal pathogens of tomato. *Biol. Control* 52(2):167–173.

- Rou, P. V. 2003. Suppression of tomato early blight by spraying of animal manure based compost water extracts. Ann. of the Sri Lanka Dept. of Agric. 5:175-191.
- Royse, D. J; Ries S. M. 1978. Influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. Phytopathol. 68(4): 603 – 607.
- Xiu, C. P. A. 2018. Efecto de bioles en brócoli (*Brassica oleracea*) y lechuga (*Lactuca sativa*) en la zona hortícola de Cartago, Costa Rica, Thesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 85 p.

DISCUSIÓN GENERAL

El análisis de productos biológicos destinados al control de *H. vastatrix* en Costa Rica, el aislamiento y selección de cepas locales, el estudio de métodos de producción y la evaluación de cepas y productos disponibles para el control de roya, son parte fundamental para su implementación en los programas de manejo integrado de enfermedades en el cultivo de café. Es importante señalar que los productos comerciales analizados no son a base del género *Simplicillium*, el cual fue identificado como principal enemigo natural de la roya del café. La cepa que el INA distribuye para el manejo de este hongo es el mismo género identificado en las cepas aisladas localmente. Por lo anterior, no es arriesgado suponer que las cepas de productos comerciales fueron introducidas y no aisladas de la región.

Aún y cuando *Lecanicillium* y *Simplicillium* son taxones relacionados, los resultados de este estudio indican que el primero posee una alta especificidad hacia *H. vastatrix*; en los bioensayos, mientras que las cepas locales de *Lecanicillium* colonizaron completamente las pústulas de roya, las cepas comerciales no alcanzaron el 50% de colonización. Otro factor por el cual la correcta identificación de cepas se vuelve crucial es el momento de iniciar un método de reproducción, pues podríamos tomar como base métodos establecidos para el organismo que suponemos que se encuentra atacando de manera natural la roya, cuando se requiere generar una metodología propia para el microorganismo que realmente se encuentra atacando a *H. vastatrix* de manera natural.

Al respecto se señala que *Lecanicillium* solo produce conidios en medios líquidos; en nuestro estudio hemos corroborado que aún y con la semejanza entre ambos géneros, es posible obtener blastosporas de *Simplicillium* en medios líquidos. En cuanto a reproducción en medio sólido, ambos géneros son fácilmente reproducidos en arroz, método de producción artesanal que puede ser empleado por el productor. Con el fin de mantener la virulencia de la cepa seleccionada, esta podría ser almacenada mediante el método papel filtro, el cual hemos evaluado para conservar cepas de *Simplicillium* y cuyas esporas han mostrado resistencia al proceso de desecación durante el proceso sin perder virulencia.

Por otra parte, los bioles usados para combatir enfermedades en el cultivo de café, cuya calidad puede ser medida en términos de la cantidad de microorganismos que contengan, son afectados por la adición de sales minerales durante el proceso de fermentación. Esto conlleva a que el efecto directo que los bioles tienen en el control de enfermedades se vea desfavorecido. Esta condición

se logró evidenciar al hacer pruebas de enfrentamiento contra *Cercospora coffeicola*. Los productos evaluados pueden mantener una diversidad genética alta, lo cual no significa sean efectivos en el control de enfermedades, pues, según se evidenció en este estudio, una vez que se eliminan los microorganismos del biol y se evalúan metabolitos difusibles al medio, no se ejerció grado alguno de control.

CONCLUSIONES GENERALES

1. Los productos comerciales analizados, recomendados para el control de roya del café, son de menor calidad que los productos elaborados artesanalmente.
2. El producto más procesado y con mejor presentación, presentó menor calidad que los demás.
3. *Simplicillium*, microorganismo que contienen las cepas artesanales, coincide con las cepas aisladas localmente; por el contrario, las cepas comerciales contienen un organismo diferente.
4. Conidios de *Simplicillium* muestran tolerancia a desecación y pueden almacenarse en papel filtro sin perder virulencia.
5. El principal enemigo natural (micoparásito) de *H. vastatrix* en Costa Rica es *Simplicillium*. Este género coincide en aislamientos locales y en cepas usadas para elaborar productos artesanales.
6. La caracterización cultural y fisiológica de cepas de *Simplicillium* supone una amplia variabilidad genética dentro de este género.
7. Es posible producir blastosporas de *Simplicillium* en medios líquidos.
8. Los medios con fuentes alternativas de carbono y nitrógeno fueron los que dieron mejores resultados en la producción de blastosporas de *Simplicillium*.
9. Dentro de las cepas locales aisladas de pústulas de roya, existen algunas con mayor grado de virulencia. En nuestro estudio corresponde a la cepa denominada EC.
10. Además de la baja calidad de productos comerciales, la baja eficiencia de estos en el control de pústulas de roya indica una baja virulencia de las cepas empleadas o pérdida de virulencia durante el proceso de formulación.
11. Esporas aéreas y sumergidas de *Simplicillium* tienen el mismo grado de control hacia *H. vastatrix*.
12. La aplicación de blastosporas y conidios en campo no mejoró de manera significativa el porcentaje de parasitismo con respecto al control natural.
13. MM y bioles poseen una diversidad genética alta (H'); sin embargo, la cantidad de ufc en bioles se ve desfavorecida cuando se mezclan sales minerales.

14. El efecto antagónico de bioles hacia *C. coffeicola* es debido al efecto individual de microorganismos y no a los metabolitos que estos difunden al medio.

RECOMENDACIONES

A productores

1. Acudir a técnicos especialistas para analizar los parámetros mínimos de calidad del bioplaguicida a utilizar.
2. Hacer las aplicaciones de hongos micoparásitos para el control de la roya cuando las lesiones de esta enfermedad presenten esporulación, no antes.
3. No mezclar sales minerales (fertilizantes) cuando se aplican microorganismos para el control de enfermedades.
4. De ser posible, producir por si mismos hongos micoparásitos de la roya. Es factible y se puede obtener un producto de buena calidad (por ej., el producto artesanal elaborado por el productor en la finca Cristina, Paraíso, Cartago).

A compañías formuladoras

1. Se recomienda que previamente a introducir cepas de micoparásitos destinados al control de la roya, se hagan aislamientos locales y se compare la eficacia con las cepas introducidas.
2. Iniciar el proceso de producción con la identificación correcta del microorganismo que se va a producir; de esta manera se podrá, con mayor certeza, aplicar y ajustar el método de producción.
3. Iniciar el proceso de producción con cepas monospóricas, para de esta manera favorecer la estabilidad del producto final.
4. Es importante la detección de contaminantes durante todos los pasos de producción de bioplaguicidas. Se debe tener especial cuidado en las cepas y matrices utilizadas para inocular los medios de producción, las cuales deben estar libres de contaminantes.
5. Además de las pruebas de pureza, concentración y viabilidad, los formuladores de bioplaguicidas deben contar con pruebas rutinarias de efectividad hacia el organismo objetivo, sobre todo al final del proceso de formulación.


A investigaciones futuras

1. Incluir insecticidas microbiales a base de hongos y bacterias antagonistas, tanto en pruebas de control de calidad, como en pruebas de efectividad contra la roya.
2. Estudiar el aporte de otros enemigos naturales en la regulación de la roya, por ejemplo *Mycodiplosis*, cuyas larvas es común observarlas consumiendo pústulas de roya.

3. Evaluar mezclas de diferentes cepas de *Simplicillium* en el control de la roya.
4. Hacer estudios específicos sobre la fermentación líquida de *Simplicillium* a mayor escala y evaluación de aplicaciones inundativas.
5. Estudiar el efecto antagónico de metabolitos secundarios de diferentes cepas de *Simplicillium* contra la roya.
6. Evaluar fungicidas que puedan presentar cierto grado de selectividad hacia *Simplicillium*, o evaluar la resistencia de diferentes cepas a fungicidas comúnmente usados para control de la roya.

Anexos

Anexo 1. Identificación molecular de cepas locales y un microorganismo frecuentemente encontrado en bioles

	Dirección de investigaciones Sección de Fitopatología Laboratorio Biología Molecular	Consecutivo: DI-SF-BMS-074-2016
		Fecha: 5 de diciembre 2016

Servicio solicitado: Amplificación y secuenciación de hongos.

Solicitante: Gerardo García Nevarez.

Fecha de solicitud: 16 de noviembre de 2016.

Tipo de producto (s) evaluado (s): Cultivo puro en placa petri.

Aislamientos realizados por: CATIE.

Cuadro 1 Identificación de las muestras.

#	ID BM	ID Usuario	Organismo (s) coincidentes RDP/UNITE	% conf	Organismo (s) coincidentes NCBI	% ident
1	11-201	AQ	<i>Simplicillium spp.</i>	95	<i>Simplicillium spp.</i>	99
2	11-202	SR	<i>Simplicillium spp.</i>	95	<i>Simplicillium spp.</i>	99
3	11-203	SJN	<i>Simplicillium spp.</i>	95	<i>Simplicillium spp.</i>	99
4	11-204	JV	<i>Simplicillium spp.</i>	95	<i>Simplicillium spp.</i>	99
5	11-205	ACT	Dipodascaceae	95	<i>Galactomyces spp.</i>	99

Técnica utilizada: PCR convencional/secuenciación.

Instrumento, equipo o entidad utilizado: Applied Biosystems® Veriti® Thermal Cycler /Macrogen Inc.

Nota 2: El Laboratorio queda eximido de toda responsabilidad, en interpretaciones de resultados por parte de terceras personas ajenas al proceso de análisis y a CORBANA S.A.



Responsable: M.Sc. Ana María Conejo Barboza
Tel: 2713-1685
Email: anconejo@corbana.co.cr

Anexo 2. Identificación molecular de la cepa local EC proveniente de diferentes propágulos (conidios, blastosporas y microesclerocios), del producto artesanal INA, del comercial OB y un microorganismo encontrado constantemente en las diferentes muestras de bioles

Aislamientos de los cultivos realizados por: Gerardo García, estudiante CATIE.

Cuadro 2 Identificación de la muestra.

#	ID BM	ID Usuario	Organismo (s) coincidentes RDP/UNITE	% conf	Organismo (s) coincidentes NCBI	% ident
1	8-142	BCA Bact	*	*	*	*
2	8-137	EC-LL	<i>Simplicillium spp.</i>	95	<i>Simplicillium spp.</i>	98
3	8-138	EC-LL-Blast	<i>Simplicillium spp.</i>	95	<i>Simplicillium spp.</i>	98
4	8-139	INA-LL	<i>Simplicillium spp.</i>	95	<i>Simplicillium spp.</i>	98
5	8-140	EC-LL-MICR	<i>Simplicillium spp.</i>	95	<i>Simplicillium spp.</i>	98
6	8-141	OB-LL	<i>Lecanicillium spp.</i>	95	<i>Lecanicillium attenuatum</i>	99
7	8-143	JJ-LEV	<i>Kazachstania unispora</i>	95	<i>Kazachstania unispora</i>	99

*Secuencia contaminada, no es confiable para la identificación.

Técnica utilizada: PCR convencional/ DGGE/ secuenciación.


Instrumento o equipo utilizado: Applied Biosystems® Veriti® Thermal Cycler/ C.B.S. Scientific DGGE electrophoresis system/Macrogen Inc.

Nota: El Laboratorio queda eximido de toda responsabilidad, en interpretaciones de resultados por parte de terceras personas ajenas al proceso de análisis y a CORBANA S.A.



Responsable: M.Sc. Ana María Conejo Barboza
 Tel: 2713-1685
 Email: anconejo@corbana.co.cr
 CC.

Anexo 3. Identificación molecular e índices de diversidad de Shannon en muestras de microorganismos de montaña y bioles

	Dirección de investigaciones Sección de Fitopatología Laboratorio Biología Molecular	Consecutivo: DI-SF-BMS-055-2016
		Fecha: 21 setiembre de 2016

<p>Servicios solicitados: (1) Diversidad y (2) secuenciación de hongos y bacterias.</p> <p>Solicitante: Gerardo García, estudiante CATIE.</p> <p>Fecha de solicitud: 29 de agosto de 2016.</p> <p>Tipo de producto (s) evaluado (s): Abono líquido y cultivos puros en placa petri.</p>

Muestreo realizado por: Gerardo García, estudiante CATIE.

Cuadro 1 Identificación de las muestras e índice de diversidad de Shannon.

ID usuario	ID BM	Tipo de muestra	Finca	H'	
				Bacterias	Hongos
MM Apoya	8-144	Biol	CATIE	3.44	3.56
Biol Apoya	8-146	Biol	CATIE	3.33	3.29
MM JJ	8-148	Biol	CATIE	3.07	3.38
Biol JJ	8-151	Biol	CATIE	3.09	3.27

Cuadro 2. Interpretación del índice.

Valor del índice	Diversidad
1 a 2	Baja
2 a 3	Mediana
3 a 4	Alta