

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).

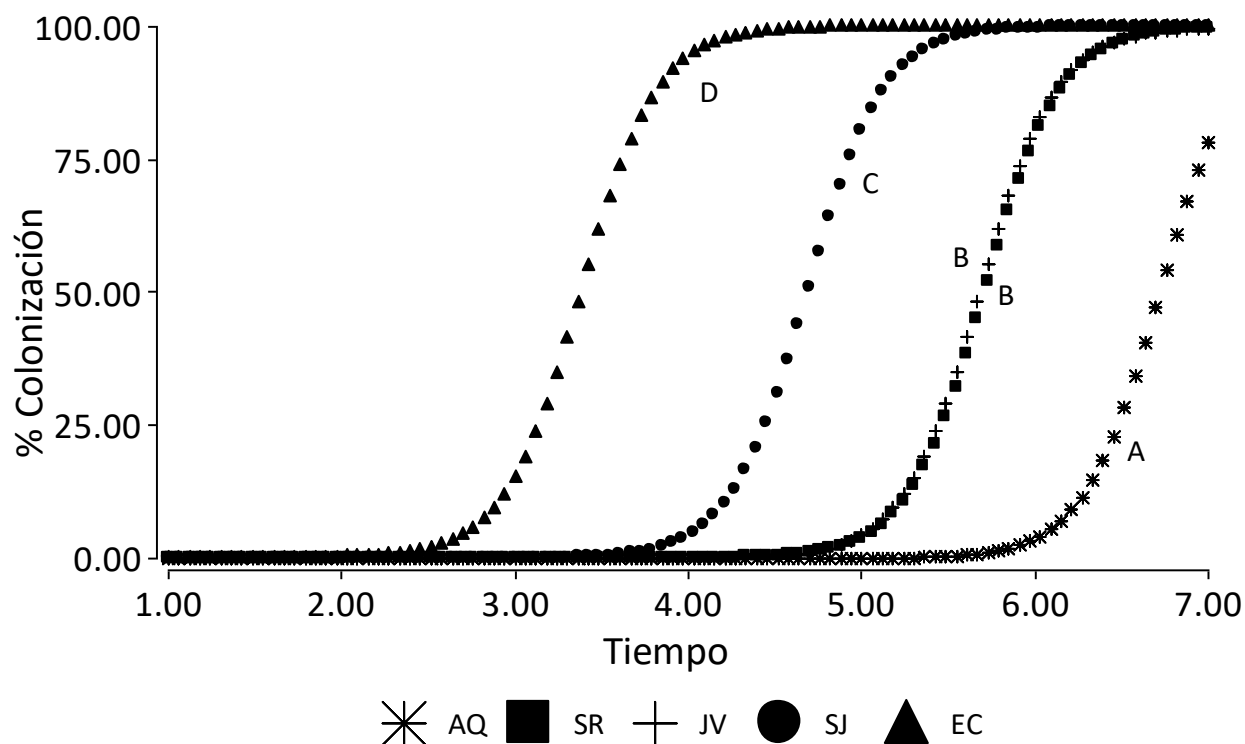


Figura 8. Eficacia de cepas locales de *Simplicillium* spp. colonizando pústulas de *H. vastatrix* (AQ: AQUIARES; SR: SANTA ROSA; JV: JABILLOS; SJ: SAN JUAN NORTE; EC: CATIE)

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).

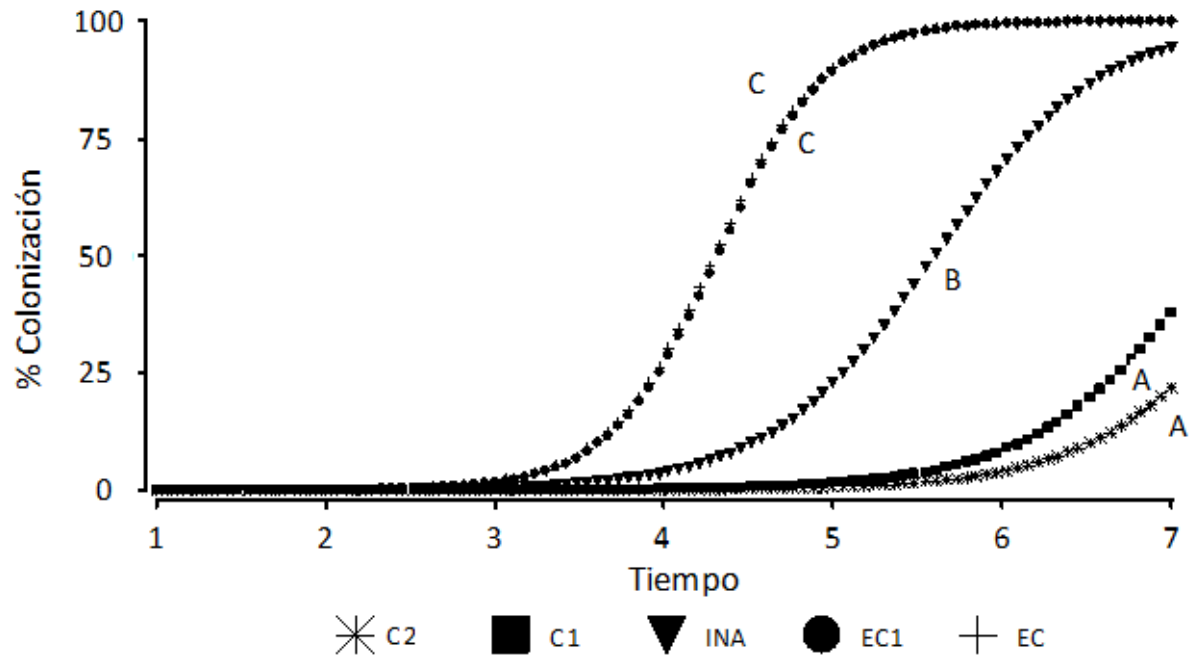


Figura 9. Eficacia de cepas comerciales en la colonización de pústulas de *H. vastatrix* (C2: comercial; C1: comercial; INA: artesanal; EC1: CATIE almacenada; EC: CATIE)

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.

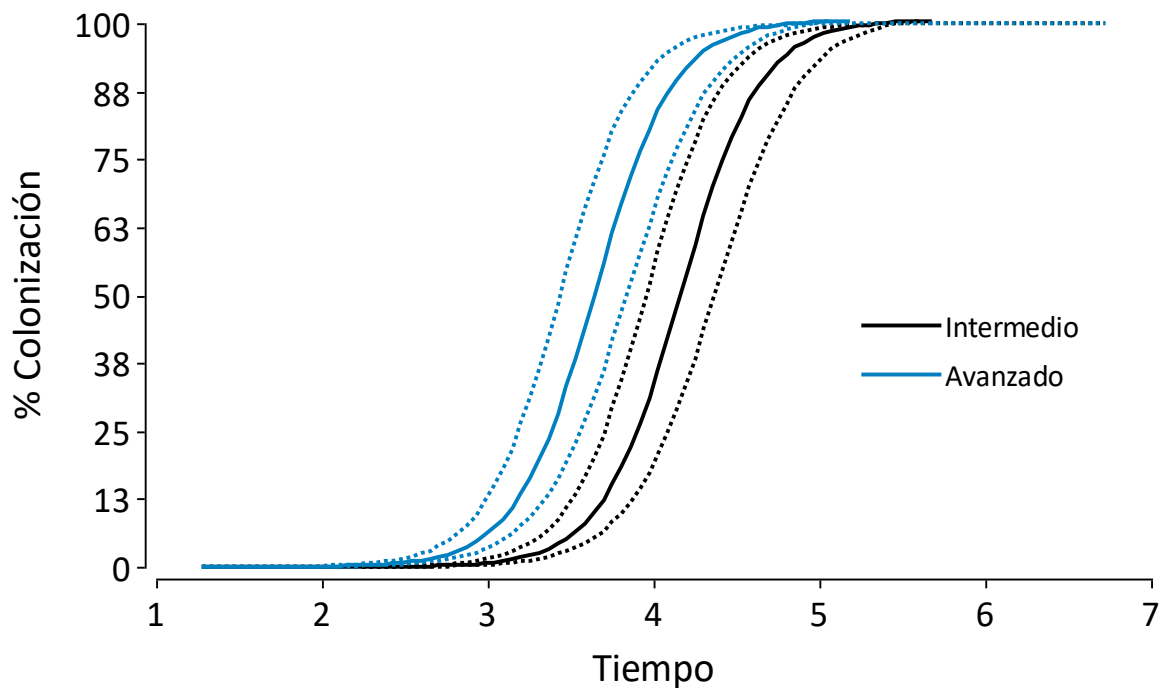


Figura 10. Eficacia de conidios y blastosporas de *Simplicillium* en la colonización de pústulas de *H. vastatrix*

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).

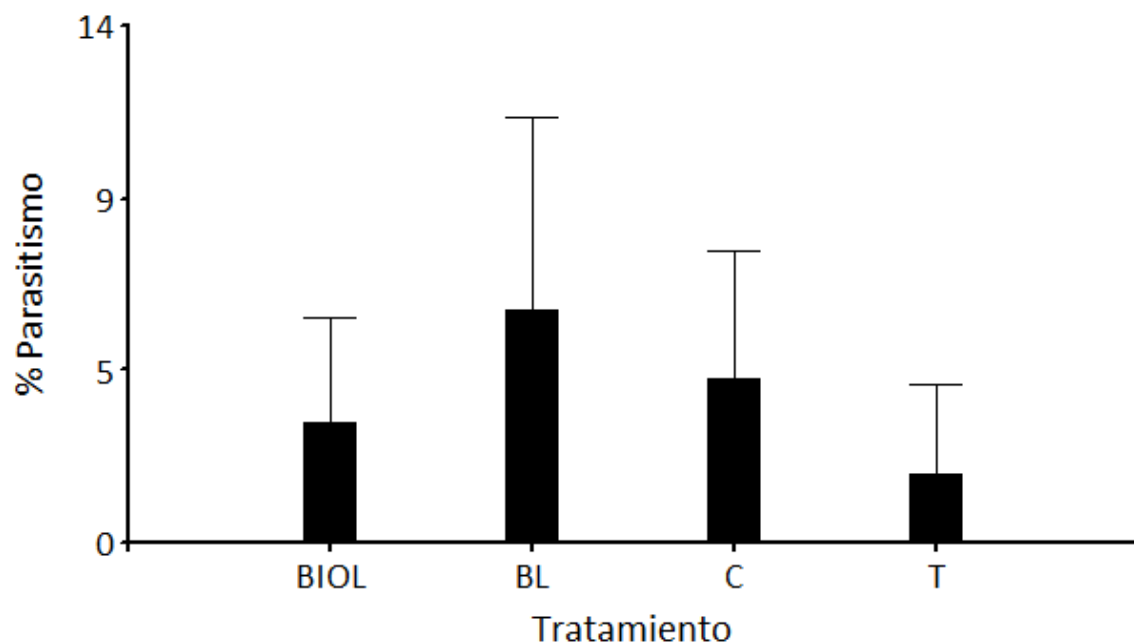


Figura 11. Parasitismo (%) en pústulas de roya producido por dos tipos de esporas de *Simplicillium* y parasitismo natural al aplicar un biol

(**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.