

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA DE OCCIDENTE  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**



**AISLAMIENTO, REPRODUCCIÓN Y EVALUACIÓN DEL  
HIPERPARASITISMO DEL HONGO *Verticillum sp* COMO  
CONTROLADOR BIOLÓGICO DE LA ROYA DEL CAFETO  
(*Hemileia vastatrix*).**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:  
ANGELINA VICTORIA CUELLAR PÉREZ.**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

**DOCENTES DIRECTORES:  
Dr. ADÁN HERNÁNDEZ  
Lic. JUAN AMAYA.**

**NOVIEMBRE DE 2006**

**Santa Ana**

**El Salvador**

**Centro América**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA DE OCCIDENTE  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**



**AISLAMIENTO, REPRODUCCIÓN Y EVALUACIÓN DEL  
HIPERPARASITISMO DEL HONGO *Verticillum sp* COMO  
CONTROLADOR BIOLÓGICO DE LA ROYA DEL CAFETO  
(*Hemileia vastatrix*).**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:  
ANGELINA VICTORIA CUELLAR PÉREZ.**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

**DOCENTES DIRECTORES:  
Dr. ADÁN HERNÁNDEZ  
Lic. JUAN AMAYA.**

**NOVIEMBRE DE 2006**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA DE OCCIDENTE**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

**AISLAMIENTO, REPRODUCCIÓN Y EVALUACIÓN DEL  
HIPERPARASITISMO DEL HONGO *Verticillum sp* COMO  
CONTROLADOR BIOLÓGICO DE LA ROYA DEL CAFETO (*Hemileia  
vastatrix*).**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:**

**Angelina Victoria Cuellar Pérez.**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:**

**LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

**COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADO:**

**M. Sc. Ricardo Figueroa Cerna:**

---

**DOCENTES DIRECTORES:**

**Dr. Adán Hernández:**

**Lic. Juan Amaya:**

---

**Santa Ana**

**El Salvador**

**Centro América**

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTORA**

Dra. Maria Isabel Rodríguez

**SECRETARIA GENERAL**

Licda. Lidia Margarita Muñoz

**FISCAL**

Lic. Pedro Rosalio Escobar

**AUTORIDADES DE LA FACULTAD MULTIDISCIPLINARA DE**

**OCCIDENTE**

**DECANO**

Lic. Jorge Mauricio Rivera

**VICEDECANO**

M Sc. Roberto Gutiérrez Ayala

**SECRETARIO**

Lic. Víctor Hugo Merino

**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

M Sc. Ricardo Figueroa Cerna

**Santa Ana**

**El Salvador**

**Centro América**

## **DEDICATORIA**

### **A Dios Todopoderoso:**

Porque me permitió culminar esta meta y sobre todo por haberme dado la sabiduría necesaria para descubrir cosas nuevas y poderlas compartir con los demás.

### **A mis padres:**

Porque ellos me dieron el apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios todo poderoso por la sabiduría y entendimiento que me ha dado para culminar esta meta de mi vida y a Maria Santísima por su sana intercesión.

A la Fundación Salvadoreña para la Investigación del Café (PROCAFE), por haberme permitido realizar esta investigación dentro de sus instalaciones.

A mis asesores: Dr. Adán Hernández, por haberme guiado durante el desarrollo de esta investigación. Al Lic. Juan Amaya por su apoyo técnico microbiológico en la elaboración de este trabajo.

Al Ing. Salvador Flores por todas sus sugerencias y comentarios para el desarrollo de esta investigación.

A mis padres por el apoyo brindado siempre para mi formación académico profesional y permitirme cumplir esta meta.

A mis hermanos por compartir la alegría de mis triunfos.

A mi abuela Victoria Pérez por el apoyo y comprensión que me ha brindado.

A mi esposo Carlos Jaime Linares por su apoyo, comprensión y su amor incondicional.

A todo el personal docente del Departamento de Biología de la Facultad Multidisciplinaria de Occidente, quienes durante el trayecto de la carrera me orientaron por medio de sus conocimientos.

A mis compañeras y amigas: Ana Eugenia, Vanesa Maria e Iris Marlene por su amistad y apoyo incondicional.

## INDICE

	Pagina
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE CUADROS.....	XI
LISTA DE ANEXOS.....	XII
RESUMEN.....	X III
1. INTRODUCCION.....	14
2. REVISION DE LITERATURA.....	16
2.1.1- Origen y distribución geográfica del cafeto.....	16
2.1.2- Cultivo del Cafeto .....	17
2.1.3 Cultivo del cafeto en El Salvador.....	17
2.2 La roya del cafeto.....	19
2.2.1- Control de la roya del cafeto.....	21
2.2.2- Resistencia Genética.....	22
2.2.3-Control biológico.....	23
2.3- <i>Verticillum</i> .....	24
2.3.1- Modo de acción.....	26
2.3.2 – Efectividad bajo condiciones de campo.....	28
3- METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION.....	30
3.1- Tipo de estudio.....	30
3.2- Ubicación geográfica de la investigación.....	30
3.3- Características de la finca.....	30
3.4.- Técnica de recolección de muestra.....	31
3.5- Técnica de aislamiento.....	32



<b>3.5.1- Inoculación de <i>Verticillum</i> sp.....</b>	<b>32</b>
<b>3.5.2- Prueba de Reproducción de cepas de <i>Verticillum</i> sp en sustratos sólido y líquido.....</b>	<b>33</b>
<b>3.6- Evaluación del hiperparasitismo sobre pústulas de roya por medio de la aspersión de la suspensión de esporas de <i>Verticillum</i> sp.....</b>	<b>34</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>5. DISCUSION.....</b>	<b>40</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>42</b>
<b>7. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>43</b>
<b>8. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>44</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>50</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Pagina
<b>FIGURA 1. EPIDEMIOLOGIA DE LA ROYA DEL CAFETO.....</b>	<b>20</b>
<b>FIGURA 2. <i>Verticillum sp</i> EN MEDIO DE CULTIVO PDAA.....</b>	<b>24</b>
<b>FIGURA 3. HOJAS DE CAFE CON PUSTULAS DE ROYA HIPERPARASITADAS POR <i>Verticillum sp</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>FIGURA 4: ESQUEMA DE LA APLICACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DEL HIPERPARASITO A ARBUSTOS EN EL JARDÍN DE VARIEDADES DE PROCAFE.....</b>	<b>35</b>

## LISTA DE CUADROS

	Pagina
<b>CUADRO: 1 CARACTERÍSTICAS GEOGRÁFICAS Y CLIMÁTICAS DE LAS CUATRO FINCAS MUESTREADAS.....</b>	<b>31</b>
<b>CUADRO: 2 PROMEDIOS DE CONCENTRACIONES DE CONIDIAS DE VERTICILLUM SP OBTENIDAS A LOS 15 DÍAS DE INOCULACIÓN.....</b>	<b>36</b>
<b>CUADRO: 3 PARÁMETROS EVALUADOS ANTES DE LA APLICACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ESPORAS.....</b>	<b>37</b>
<b>CUADRO: 4 TOTAL DE HOJAS Y PÚSTULAS HIPERPARASITADAS A LOS QUINCE DÍAS DESPUÉS DE LA APLICACIÓN, DE LA SUSPENSIÓN AL 75 %.....</b>	<b>38</b>
<b>CUADRO: 5 COMPARACIÓN DE PORCENTAJES DEL TOTAL DE PÚSTULAS DE ROYA POR SURCO EN EL JARDÍN DE VARIETADES DE PROCAFÉ.....</b>	<b>39</b>

## LISTA DE ANEXOS

página

<b>ANEXO 1 HOJAS DE CAFETO CON PÚSTULAS Y ESPORAS DE ROYA.....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO 2 MICROGRAFÍAS DE HIFAS Y ESPORAS DE <i>VERTICILLUM SP</i>.....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO 3 RECOLECCIÓN, SELECCIÓN Y AISLAMIENTO DE <i>VERTICILLUM SP</i>.....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXO 4 PREPARACIÓN DE MEDIOS.....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXO 5 PREPARACIÓN DE SUSPENSIÓN DE <i>VERTICILLUM SP</i> Y ASPERSIÓN EN EL CAMPO.....</b>	<b>54</b>

## RESUMEN

El control biológico es una alternativa que va en aumento en nuestro país por lo que esta investigación que se realizó en las instalaciones del laboratorio de Sanidad Vegetal de la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFE) Santa tecla departamento de La Libertad, tuvo como objetivo aislar, reproducir y evaluar la capacidad hiperparasitaria del hongo *Verticillum sp* sobre la roya del cafeto. Se desarrollo en un periodo de 10 meses (septiembre 2005 – Junio de 2006) y en dos fases, la primera fase fue de campo donde se colectaron hojas con pústulas de roya hiperparasitadas por *Verticillum sp*. en cuatro fincas: finca Calistemo, finca la Esmeralda, finca El Espino del departamento de La Libertad y la finca San José del departamento de Usulután.

La segunda fase consistió en aislar el hiperparasito utilizando un medio de cultivo acidificado PDAA (papa, dextrosa agar con acido láctico).

Luego de obtener las cepas puras de las cuatro fincas se continuó con la segunda fase que consistió en la reproducción de *Verticillum sp*. en medio de cultivo líquido melaza, (que dentro de esta investigación se determino a nivel de laboratorio que es el medio de cultivo mas adecuado para la reproducción del hiperparasito). Además se determino que la propagación natural del hiperparasito es lenta por lo que debe aplicarse una inoculación manual para que haya una propagación mas rápida. Además se determinaron las concentraciones de conidias por mililitro, siendo la finca calistemo donde se obtuvo un mayor desarrollo de conidias. Esto hace concluir que cepas nativas de *Verticillum sp*. si se pueden utilizar como controlador biológico de la roya del cafeto.

## INTRODUCCION:

El Salvador por largas décadas se caracterizo por ser un país agrícola, siendo el café, el principal cultivo de exportación.

Durante los últimos años, el cultivo del café ha venido declinando debido a factores externos.

En nuestro país el control químico ha sido una herramienta eficaz para combatir dicha enfermedad, pero para los productores presenta un problema, el cual es el alto costo, lo cual tiene gran repercusión en los ingresos del caficultor.

Por lo anterior, el uso de agentes de control biológico se presenta hoy en día, como una opción para aprovechar al máximo los organismos que se desarrollan de manera natural en el ambiente, como es el caso del hiperparasito *Verticillum sp*, el cual es el mas común que se manifiesta de forma natural en los cafetales y por tanto, podría ser de mucho valor si se complementa con otras practicas que se realizan dentro de la agricultura para el control de diversas enfermedades.

Esta investigación se realizo en el periodo comprendido entre el mes de Septiembre de 2005 al mes de Junio de 2006.

Se desarrollo en dos fases una de campo llevada a cabo en las fincas Calistemo, Esmeralda, El Espino y la finca San José, de donde se extrajo el hiperparasito y una fase de laboratorio realizada en PROCAFE (Santa Tecla).

Diferentes trabajos de investigación en otros países, han demostrado la capacidad hiperparasitica de *Verticillum sp* sobre la Roya del cafeto. Sin embargo no se ha logrado una reproducción masiva del hongo. Por tanto el objetivo principal de este estudio fue aislar, reproducir y evaluar la capacidad parasitaria de las cepas nativas del hongo *Verticillum sp* como controlador biológico de la roya del cafeto.

El desarrollo de este tipo de investigaciones se hace necesaria para perfeccionar una metodología que permita producir de manera eficiente a este hiperparasito para lo cual se utilizó una técnica de aislamiento que se ha usado en otras investigaciones con otros hongos por lo que también se evaluó el medio de cultivo mas adecuado usándose uno sólido y uno líquido, además, se determino a nivel de laboratorio, el tiempo en que las cepas de *Verticillum sp* alcanzo su mayor producción de conidias. Posterior a todo esto se determinó el porcentaje de hiperparasitismo.

Flores *et al* (2002), proponen como alternativa a muchos pequeños caficultores organizados, enfrentar un mercado deprimido mediante el cultivo orgánico y una de sus variantes, el ecológico; ya que obtiene en promedio precios sensiblemente superiores al mismo tipo de café cultivado de manera tradicional con uso intensivo de agroquímicos. Por lo que a El Salvador le conviene cambiar las prácticas de cultivo tradicional a las prácticas de cultivos orgánicos que resultan más rentables, de bajo costo y amigables con el ambiente; pero para esto es necesario invertir en investigaciones sobre control biológico y prácticas orgánicas.

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1.1 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL “CAFÉTO”

Albarrán (1999), reporta que el género *Coffea* pertenece al Orden Rubiales, Familia Rubiaceae, que incluye más de 500 géneros y cerca de 8,000 especies. Así como también que el género *Coffea* fue propuesto por Linneo en 1735, quien más tarde en 1753 describió la especie nominándola *arabica*, siendo esta, según el Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (1988), la especie económica principal.

El mismo autor comenta que los árboles de café silvestre son componentes naturales de los bosques tropicales de África. En el sur de Etiopía, Sudán y Norte de Kenia, coincide la observación de que son el centro de diversidad de *C. arabica* y se considera a Yemen(al sur de la península arábica) como el centro secundario de origen; ya que a finales del siglo VI la especie *arabica* paso a ese lugar y donde seis siglos después comenzó a usarse como bebida luego de tostado y molido.

Ospina-Machado (1995), Rememora que el cultivo se comercializo en el siglo XV, posteriormente, el café fue llevado a la India y Java. En 1714 los holandeses lo trasladaron a Surinam, de este lugar paso a Cayena, Brasil, Colombia y Venezuela. En 1720 los franceses, de las mismas plantas de Java, transportaron semillas a Martinica, de donde llegó a Guadalupe, Las Antillas y América Central; en el siglo XVIII, el cultivo de café se propagó en América Tropical y parte de la Subtropical en donde comenzó a ser un renglón comercial importante desde principios del siglo XIX.



### **2.1.2 CULTIVO DEL CAFETO**

El Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (1988) destaca que el 80% de la producción mundial, corresponde a la especie *C. arabica* la cual se cultiva en Centroamérica Colombia, Brasil, India, y en África. A nivel mundial, el cultivo del café fue elevando poco a poco su importancia lo que se reflejó en un continuo incremento en la producción. En los años 60/70 fue de 65 millones de sacos, en 1980 la producción aumentó a 85 millones y para 1997/98 alcanzó una cifra récord de 107 millones de sacos.

Bertrand & Rapidel, (1999), aseguran que en la actualidad, el café sigue siendo uno de los principales productos de exportación en América Central, lo cual la convierte en la tercera región cafetalera en el mundo. Esto es por que Centroamérica posee grandes extensiones de tierras aptas para dicho cultivo, sin embargo hay zonas tropicales que también poseen condiciones favorables y compiten con un café más barato, como es el caso de Asia, o de calidad alta, como Colombia y Kenia. Dicha competencia se ve reflejada en las variaciones cíclicas y bruscas de los precios internacionales.

### **2.1.3 - Cultivo del Cafeto en El Salvador**

De acuerdo a Flores *et al.*, (2002), en El Salvador se destinan 160,700 Hectáreas para el cultivo del cafeto, tradicionalmente bajo sombra, la principal región productora es la occidental (departamentos de Ahuachapán, Sonsonate y Santa Ana), con 52% del área cultivada y 64% de la producción; la región Central (desde Chalatenango hasta San Vicente), cubre 29% del área cafetalera y aporta el 24% de la cosecha registrada en beneficios. La región Oriental (sobre todo los departamentos de Usulután y San Miguel), representa 19% del área y 16 % de la producción.

Los mismos autores refieren que el sector ha sido golpeado por la crisis de los años ochenta, la caída de los precios internacionales y por fenómenos naturales, principalmente, El Niño en 1997 y los terremotos de Enero y Febrero de 2001. Sin embargo, a pesar de la crisis en la que se encuentra la caficultura; para el nuevo milenio sigue teniendo importancia estratégica como generadora de empleos rurales en El Salvador. En la cosecha 1999/2000, se contrataron 39.6 millones de jornales los cuales equivalen a 158 400 empleos permanentes sólo en el sector agrícola.

Tanto la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café, (2001) como Flores *et al.*, (2002) establecen que desde el punto de vista ambiental, contribuye a la protección de los ecosistemas, ya que la mayor parte de la poca cobertura vegetal del país se debe al sistema de cultivo bajo sombra del cafeto, participa con 2.5% del PIB y aporta casi 20% al PIB agrícola. Por lo cual, cualquier factor o agente que ponga en peligro a la caficultura, reviste gran importancia para el país.

Arias (1988) afirma que las plagas de insectos son factores que ponen en peligro a la caficultura, ya que son causantes de grandes pérdidas en las producciones cafetaleras. Entre las plagas más conocidas se tienen; palomillas (*Pseudococcus citri*), escamas ovals (*Coccus vinidí green*), pulgones o piojos (*Toxoptera aurantii B defons*), minador de las hojas (*Leucoptera coffeella Guerin- Meneville*), hormiga (*Atta sp.*), perforador o broca de las cerezas del café (*Stephanoides hypotenemus hampei ferrari*).

Berkeley & Broome (1988), mencionan que entre las enfermedades, las más comunes son la gotera o mancha de las hojas (*Mycena citnicolor*), mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*), antracnosis (*Colletotrichum coffeanum*) y sin lugar a dudas la enfermedad más seria del cafeto es “la roya del cafeto” (*Hemileia vastatrix*).

## **2.2 - LA ROYA DEL CAFETO (*Hemileia vastatrix*)**

Rivas *et al.* (1996), reporta que *Hemileia vastatrix* es un basidiomiceto que pertenece al Orden Uredinales, Clase Teliomycetes, que contiene más de 5 000 especies, la mayor parte de ellas de gran importancia económica y con patógenos reconocidos en más de 200 familias de plantas vasculares.

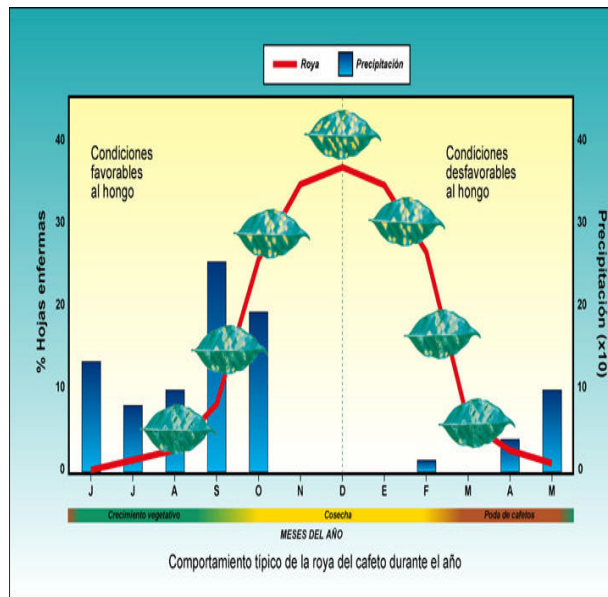
Avelino *et al* (1999), citados por Canjura (2000), establecen que *Hemileia vastatrix*, se detectó por primera vez a principios de 1869 en una plantación de la isla asiática de Ceilán, hoy Sri Lanka. A partir de ahí, se fue dispersando rápidamente a toda Asia y al mismo tiempo fue reportada en países de África oriental y más tarde llegó a África occidental.

Ruiz (1994), menciona que la roya apareció por primera vez en América en 1970, sugirió además que las uredosporas fueron transportadas por los vientos Alisios desde África del Este hasta Brasil. Javed (1987), estableció que en Centro América, se reportó por primera vez en Nicaragua, en la región de Carazo en 1976. Luego se detectó en 1979 en la zona oriental de El Salvador y a finales de 1980 la enfermedad se había diseminado a las regiones central y occidental de El Salvador.

López (1994), describe que los síntomas iniciales de la enfermedad son: manchas redondas muy pequeñas, color amarillo claro, en el envés de la hoja. Luego las manchas crecen rápidamente hasta alcanzar un centímetro de diámetro y se cubren de un polvo amarillo o anaranjado, formado por las esporas del hongo; en el haz, la posición de cada pústula se manifiesta como manchas cloróticas de igual tamaño, que pueden llegar a unirse y provocar ataques severos.

El hongo subsiste durante la época seca en lesiones necróticas en hojas vivas y en hojas secas producidas en la infección del año anterior. Las primeras lluvias

reactivan al hongo formando el inoculo primario. La fase de crecimiento acelerado del hongo se presenta desde el mes de julio hasta octubre (Época lluviosa); la de máxima infección desde noviembre hasta enero (Época seca); la decadencia de los niveles de infección desde febrero hasta abril (época seca). Posteriormente la incidencia disminuye en forma natural debido a condiciones ambientales adversas y a la poda de cafetos y árboles de sombra; hay una fase de crecimiento lento en los meses de mayo y junio (época lluviosa). Ver Fig. 1



**Fig. 1. EPIDEMIOLOGIA DE LA ROYA DEL CAFETO**  
Tomado de López (1994)

El mismo autor sigue describiendo que la roya se disemina mediante la liberación de las esporas por acción del agua lluvia y luego son dispersadas y posicionadas sobre otras hojas siempre por acción del agua, del viento y por el hombre. El agua que se acumula en la parte superior de las hojas arrastra las esporas hasta la parte inferior, donde germinan desarrollando hifas que penetran por los

estomas. La germinación de las esporas marca el inicio de la infección, y ocurre de noche, pero en cafetales altamente sombreados ocurre durante el día. La penetración en las hojas ocurre cuando hay condiciones de alta humedad en los cafetales (Agua líquida sobre las hojas durante 24 horas).

### **2.2.1- Control de la roya del cafeto**

Bertrand y Rapidel, (1999), expresan que el control de la roya del cafeto, ha sido principalmente dirigido al uso de fungicidas, el cual ha sido exitoso cuando se ha hecho en forma adecuada, aunque aumenta los costos de producción.

La Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (1997) y Avelino *et al.*, (1999) citado por Canjura, (2000), coinciden en que en El Salvador se han empleado satisfactoriamente fungicidas a base de cobre (protectivos), fungicidas sistémicos (terapéuticos) y mezclas de fungicidas cúpricos y sistémicos, pero su alto costo los ha hecho difíciles de adquirir para la mayoría de los productores.

Rivillas *et al*, (1999), expresan que además, se ha observado que algunos agricultores no realizan el control químico en forma apropiada, pues no lo hacen en presencia de altos niveles de infección, lo cual ha impedido que se aproveche su acción protectora o curativa; así el control ha resultado ineficiente y ha comprometido seriamente la cantidad y calidad de la cosecha.

Asimismo, González *et al.*, (1995), sostiene que la contaminación del ambiente es inevitable, particularmente el daño a la fauna benéfica ya que se han creado problemas no solo con la selección de poblaciones resistentes del patógeno sino al favorecer la aparición de plagas secundarias. Esto lo confirman Vélez y Rosillo (1995), cuando mencionan que aplicaciones repetitivas de fungicidas a base de cobre han provocado un aumento en severidad del ataque del minador de la hoja

del café *Penileucoptena coffeella* y de la araña roja *Oligonychus ilicis*.

Flores *et al* (2002), proponen como alternativa a muchos pequeños caficultores organizados, enfrentar un mercado deprimido mediante el cultivo orgánico y una de sus variantes, el ecológico; ya que obtiene en promedio precios sensiblemente superiores al mismo tipo de café cultivado de manera tradicional con uso intensivo de agroquímicos. Por lo que a El Salvador le conviene cambiar las prácticas de cultivo tradicional a las prácticas de cultivos orgánicos que resultan más rentables, de bajo costo y amigables con el ambiente; pero para esto es necesario invertir en investigaciones sobre control biológico y prácticas orgánicas.

### **2.2.2- Resistencia genética**

Avelino *et al.*, (1999), citado por Canjura (2000), plantean que una de las alternativas para el control de la roya es el mejoramiento genético. Al menos nueve genes están implicados en la resistencia específica del cafeto a la roya, dichos genes corresponden a la resistencia “gen a gen” según la teoría de Flor. De los nueve genes conocidos, cuatro han sido identificados en el *Coffea arabica*.

Ruiz (1994), cita que en América los cultivares tradicionales poseen una estrecha base genética, por lo cual el problema de la roya adquiere mayor trascendencia y se hace más difícil encontrar alguna variación importante en resistencia.

Beker (1978), y Echeverri (1980), comentan que en El Salvador el mejoramiento genético comenzó en los años 70s. Estas investigaciones estuvieron a cargo del Instituto Salvadoreño de Investigaciones del Café, ISIC, ahora Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café PROCAFE, el cual se dedicó al mejoramiento por hibridación con la meta de crear variedades resistentes a la roya.

Schieber (1977), estableció que tomaría 10 años reponer una variedad susceptible, con otra que fuera resistente, creada por métodos genéticos, en una región específica. Beker (1978), lo ratifica al mencionar que el proceso de obtener variedades resistentes es muy lento y costoso en esta forma tradicional.

Echeverri, (1980), agrega que para las investigaciones en mejoramiento genético el Instituto Salvadoreño de Investigaciones del Café, ISIC, usó material procedente del Centro de Investigaciones sobre la Roya en Oeiras, Portugal, en visitas que técnicos del ISIC realizaron a dicho Centro. Las evaluaciones de este material introducido demostraron que el híbrido de Timor, el cuál tiene resistencia frente a todas las razas de la roya, mostró una adaptación negativa a las condiciones de El Salvador, mientras ya su cruzamiento con Caturra, el Catimor ha presentado una buena adaptación principalmente en alturas mayores a 1000 msnm.

Sin embargo, Beker, (1978), y Echeverri, (1980), mencionan que esta variedad hasta 1978 se encontraba a nivel experimental.

Ya en la década de los 90 Rodríguez (1990), reportó que algunas progenies de Catimor, bajo ciertas condiciones ambientales como son climas cálidos y de poca humedad, presentan pérdida de vigor que conduce a un agotamiento, casi irreversible en la planta. Ante esta situación se han realizado esfuerzos por mejorar el comportamiento del Catimor, especialmente su adaptación y vigor en las zonas no favorables.

### **2.2.3 Control Biológico**

El control biológico es otra opción para el control de la roya, De Bach (1992), definió el control biológico como: “La acción de parásitos, predadores, o patógenos para mantener la densidad de poblaciones de otro organismo a un promedio más bajo

que el que existiría en su ausencia”. Baker (1987), considera que el control biológico de las enfermedades de las plantas permite reducir la cantidad de inóculo o la actividad del patógeno, a través de mecanismos producidos por una serie de organismos incluyendo a la planta misma.

### 2.3 -Verticillium sp



Figura 2. Verticillium sp en medio de cultivo PDAA.  
Tomada de la página [www.tamagawa.ac.jp/.../tama\\_kin/slide21.htm](http://www.tamagawa.ac.jp/.../tama_kin/slide21.htm).

Bigre *et al*, (1990), describe al hongo como un hongo imperfecto que pertenece al orden de los Moniliales, poseen conidias libres, ovoides, hialinas y unicelulares, actualmente se conoce como *Verticillium lecanii*. pero que a través del tiempo, se le ha conocido con los nombres de: *Cephalosporium lecanii* Zimmermann (1898), *Oospora necans* Saccardo & Trotter (1906), *Cephalosporium coccorum* Petch (1925), *Cephalosporium longisporum* Petch (1925), *Cephalosporium aphidicola* Petch (1931), *Cephalosporium dipterigenum* Petch (1931), *Cephalosporium muscarium* Petch (1931), *Cephalosporium thripidum* Petch (1931), *Cephalosporium nodulosum* Petch (1939), *Verticillium hemileiae* Bouriquet (1939), *Cephalosporium lanoso-niveum* van Beyma



(1942), *Cephalosporium subclavatum* Petch (1942) (Commonwealth Mycological Institute, 1979);

Hall (1981), en trabajos realizados plantea que *Verticillium lecanii* crece bien en un medio de cultivo a base de agar malta, harina de avena o papa dextrosa agar, en los cuales se desarrolla un micelio delgado blanco o crema, con menos color o de color amarillo en el inverso del cultivo. La germinación de esporas así como el crecimiento de los aislamientos requiere de temperaturas de 20 a 25°C, declina poco a poco a temperaturas mayores de 25°C, y se detiene a temperaturas mayores de 30°C; la esporulación cesa a los 30°C.

El Commonwealth Mycological Institute (1979), da medidas de las hifas, reportando que son de una a dos micras de ancho.

Rivas *et al*, (1996), reportan que el hongo *Verticillium sp* se ha encontrado en áreas tropicales y subtropicales, parasitando insectos, royas y otros hongos superiores; es un habitante común del suelo, donde sobrevive saprofiticamente en restos de plantas y otros tipos de materia en descomposición. No obstante, Monzón (1992), ha lo ha señalado principalmente como un hongo entomopatógeno muy importante para controlar plagas fundamentales de cultivos, tales como áfidos y escamas y se han observado epizootias en las regiones tropicales y subtropicales, así también Romero & Camón, (1995), Lo reportan como parasito de las moscas blancas *Trialeurodes vaporariorwn* Westwood y *Bemisia tabaci* Gennadius. Shaw, (1988) lo encontró En Nueva Guinea en escamas (cóccidos) del café y en una palomilla.

Vélez-Arango (1991), menciona que *Verticillium sp* se ha reportado en varios países como hiperparásito de royas en diferentes cultivos. En cafeto se ha encontrado hiperparasitando en forma natural pústulas esponjadas de roya, donde se

observa un crecimiento blanco del hiperparásito sobre las uredosporas que avanza hacia los bordes y deja en el centro solo tejido necrótico, (Ver Figura 3). Sin embargo, Shaw (1988) y González & Martínez (1996), establecen que el porcentaje de parasitismo natural ha sido bajo para ejercer un buen control. El mismo Shaw (1988), refiere que en el mercado se encuentran productos comerciales con cepas de este hongo, entre estas preparaciones se menciona Vertelec (contra áfidos) y Mycotal (contra mosca blanca).



Figura 3. Hojas de café con pústulas de roya hiperparasitadas por *Verticillum* sp. Se observa las pústulas cubiertas por micelio blanco típico de *Verticillum* sp. (Foto tomada por Angelina Cuellar 2005).

### 2.3.1 Modo de acción.

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

Así mismo, Rivas *et al.* (1996), observaron bajo el microscopio electrónico de barrido, que la mayoría de las uredosporas fueron invadidas por hifas de *Verticillum*

*sp.* y en algunos casos, una sola uredospora fue invadida por más de una hifa del hiperparásito, destruyendo su contenido, especialmente de uredosporas maduras. El grado de infección de la hoja se vio reducido, por lo que los autores concluyeron que *Verticillium sp* tiene potencial como controlador biológico de *H. vastatrix*.

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

Vélez-Arango (1991), observó que al asperjar extracto metabólico de *Verticillium* sobre uredosporas de *H. vastatrix*, éstas presentaron cambios morfológicos tales como la desintegración, pérdida del contenido, anomalías en las paredes como pérdida de las estructuras equinuladas, pérdida de la turgencia y cambios relacionados con tinción al ser coloreadas con azul de lactó fenol. Además, también observó que al asperjar las hojas de cafeto con cultivo licuado del hiperparasito, se formó micelio alrededor de las uredosporas en el punto de entrada del estoma.

Vélez-Arango (1991), al igual que Rivas *et al* (1996), observaron que el cultivo licuado y el extracto metabólico del antagonista afectaron la evolución de las lesiones y la germinación de uredosporas. Dicho efecto fue provocado por la inhibición total de la germinación y algunos cambios morfológicos en las uredosporas.

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

En trabajos más recientes, Romero y Camón (1995), lograron reproducir el hiperparasito en papa dextrosa agar, inocularon 2 ml de una suspensión conidial en agua destilada y al medio de cultivo que se incubó a temperatura ambiente. Al cabo de cuatro a siete días lograron una concentración de  $1 \times 10^5$  conidias/ml

### **2.3.2 - Efectividad bajo condiciones de campo.**

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

Velez y Rosillo (1995), al estudiar una cepa de *Verticillium* en Colombia, concluyeron que al ser aplicado en el campo el hongo a una concentración de  $3 \times 10^6$  conidias/ml, no se evitó la aparición de la enfermedad, pero se redujo el número de lesiones en el árbol y la caída de las hojas fue menos acelerada.

Esto coincide con Monzón (1997), quién observó la mayor incidencia de *Verticillium* a los primeros 10 días después de la aplicación de dicho hongo ( $1 \times 10^5$

conidias/ml) en un invernadero, donde se alcanzaron niveles hasta del 80%, y posteriormente decreció.

Además, observó que el mayor número de pústulas hiperparasitadas fue a los 15 y 20 días después de la aplicación. Esto se debió a que el número de pústulas en las hojas parasitadas aumentó, en cambio el número total de pústulas disminuyó al caer las hojas afectadas de la planta.

### **3- METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION**

#### **3.1 Tipo de estudio**

Tomando como base lo establecido por Tamayo y Tamayo (1994), la investigación que se realizó fue de carácter exploratorio descriptivo, ya que según él este es un estudio que cumple con las siguientes etapas:

Descripción del problema, Definición de formulación de hipótesis, marco teórico, selección de técnicas de recolección de datos, verificación de valides de instrumentos, descripción, análisis e interpretación de datos.

#### **3.2 Ubicación geográfica de la investigación**

La investigación se desarrolló en dos fases. La primera fase se llevó a cabo en el campo, muestreando las fincas: Esmeralda, Calistemo, y Cooperativa el Espino, ubicadas en el municipio de antiguo Cuscatlán departamento de San Salvador, y una cuarta muestra se colectó en la finca San José Cantón el Pozón California departamento de Usulután (ver cuadro 1).

Y la segunda fase se realizó en el laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales de la Fundación Salvadoreña para la Investigación del Café (PROCAFE), ubicada en Santa Tecla, departamento de la Libertad.

### 3.3 Características de cada finca de donde provenían las cepas.

**Cuadro 1: Características geográficas y climáticas de las cuatro fincas muestreadas.**

<b>Finca</b>	<b>Altitud (msnm)</b>	<b>T °</b>	<b>Tipo de Cultivo</b>
<b>Calistemo</b>	<b>950</b>	<b>20 - 25</b>	<b>Convencional</b>
<b>Esmeralda</b>	<b>950</b>	<b>20 - 55</b>	<b>Convencional</b>
<b>El Espino</b>	<b>900 - 1200</b>	<b>20 - 27</b>	<b>Orgánico Certificado</b>
<b>San José</b>	<b>1000 - 1200</b>	<b>23 - 28</b>	<b>Convencional</b>

### 3.4) TECNICA DE RECOLECCION DE MUESTRA

Para la recolección de las muestras de hojas con pústulas de roya hiperparasitadas con *Verticillium sp* se visitó una vez cada una de las fincas Esmeralda, Calistemo, San José y El Espino.

Antes de tomar las muestras se roció la ropa de los colectores con alcohol al 70% así como también se hizo un enjuague de manos con la misma sustancia, dado que las hojas fueron cortadas con las manos. Posteriormente las muestras fueron llevadas al laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de PROCAFE en bolsas plásticas de 5 libras previamente desinfectadas con alcohol al 70%.

Se colocaron en cámaras húmedas, las cuales consistieron de una caja plástica con tapadera, esta se lavó bien con jabón se desinfectaron con alcohol al 70%, después se enjuagaron con agua destilada para quitar el olor a alcohol y para evitar que el hongo se muriera, al fondo de la caja se le colocó papel toalla humedecido con agua destilada para mantener el medio húmedo y así el hongo siguiera desarrollándose.

Se colocaron las hojas con postulas de *Verticillum* de donde se obtuvieron las esporas para el proceso de aislamiento y evaluación de las cepas de hongos *Verticillum* sp.

### **3.5) TECNICA DE AISLAMIENTO**

Se preparó un litro de medio de cultivo PDAA (papa dextrosa agar acido). Antes de verter el medio en las cajas de petri se colocó en la cámara de flujo laminar donde se le agregaron 50 gotas de ac. láctico al 50 % posteriormente se colocaron 50 ml del medio en cada una de 20 cajas petri previamente esterilizadas. Se esperaron quince minutos para que el medio solidificara y poderlas utilizar para inocular el hongo.

#### **3.5.1) INOCULACION DE *Verticillum* sp.**

Con ayuda del estereo microscopio se revisaron las hojas que se tenían en cámara húmeda, con ayuda de un bisturí N° 10 se les contaron las pústulas que tenían un mayor de desarrollo de *Verticillum* sp. y con ayuda de un asa estéril se tomó una muestra del micelio el cual se colocó en un portaobjeto para observarla al microscopio compuesto. Dado que este hongo es hialino para su identificación no se utilizo ningún colorante para su identificación.

Para su identificación se utilizó la clave taxonómica propuesta por Barnett y Hunter (1972). Una vez identificado el micelio del hongo *Verticillum* se procedió a trabajar bajo condiciones de la cámara de flujo laminar. Siempre con la ayuda de un asa estéril se tomó una muestra de micelio y se colocó en cada una de las cajas petri las cuales se sellaron con papel parrafil para evitar contaminación y se dejaron dentro del laboratorio a una temperatura ambiente (25° C).

Al observar por medio del microscopio el desarrollo del hongo y al encontrarse contaminado con otros microorganismos se eliminaba la caja y con las que se tenía



con hongo puro se prosiguió a un repique en otras cajas petri aislando así al hiperparasito y obtener “cepas puras”.

### **3.5.2) Prueba de Reproducción de cepas de *Verticillum sp* en sustrato sólido y líquido.**

#### **Sustrato sólido**

Este medio se colocó en diez botellas de vidrio (botellas aplanadas de licor de un cuarto de litro conocidas como pachas de guaro), previamente esterilizadas.

El sustrato sólido que se utilizó fue arroz precosido, el cual se lavó con agua desmineralizada y con ayuda de un embudo se colocaron 40 gr de arroz y 30 ml de agua destilada en cada botella, se taparon con algodón y se colocaron al autoclave a 120° C y una presión de quince lb. Por 20 minutos.

Luego se llevaron las botellas a la cámara de flujo laminar, se desinfectó el área y los materiales a utilizar y de una cepa pura de *Verticillum* se tomo una porción pequeña y se inoculó dentro de la botella que contenía el arroz, se flameó la boca de la botella y se volvió a tapar y se dejó en observación por un tiempo de quince días.

#### **Sustrato líquido:**

Este otro medio se colocó en fermentadores artesanales (KITAZATO) el sustrato líquido que se utilizó fue melaza y se preparó de la siguiente manera:

Se utilizaron 500 ml de agua destilada, 40 gr de melaza, 25 gr de levadura de panificador.

Se mezcló y se taparon con tapones de hule envueltos en papel aluminio, se esterilizaron en una autoclave por dos veces a 120 ° C durante 25 minutos, después de cada esterilización se esperó 24 horas. Luego se continuó con la inoculación del hongo.

Para esto se elaboró una suspensión al 75 % de esporas del hongo aislado utilizando agua destilada estéril.

Para obtener las esporas se preparó un litro de solución de jabón tween al 80 %, se tomo 0.5 gr de este jabón y se disolvió en un litro de agua y luego se esterilizó por 25 minutos. De esta solución se adicionaron 25 ml a cada caja petri que contenía el hongo crecido y se realizó un suave raspado de micelio para obtener esporas. Esto se verificó por medio del microscopio antes de adicionar las esporas.

Los 25 ml de la solución de esporas se le adicionaron 75 ml de agua estéril para obtener la suspensión que se adiciono al fermentador que contenía la melaza.

### **3.6) Evaluación del hiperparasitismo sobre pústulas de roya, por medio de la aspersión de la suspensión de esporas de *Verticillium sp***

Esta parte se realizó en el jardín de variedades de PROCAFE. Se instaló un ensayo mediante el diseño estadístico completamente al azar con cuatro aplicaciones y cuatro repeticiones de cada uno más el testigo. Se eligió una parcela de 8 surcos de los cuales a 4 se les aplicó la suspensión del hiperparásito dejando un surco por en medio que sería el testigo (Ver Fig. 4). Las aplicaciones fueron las cepas aisladas, de cada una de las fincas muestreadas (VC1- Cepa Calistemo, VE2. Cepa Esmeralda, VEs3- Cepa El Espino, VSJ4 - Cepa San José) de las cuales se prepararon suspensiones de esporas al 75 % en agua destilada y luego fueron asperjadas con un rociador manual plástico.

En esta fase antes y después de la aspersión fueron evaluados los parámetros siguientes:

#### **Antes:**

\* El número de hojas totales pon surco

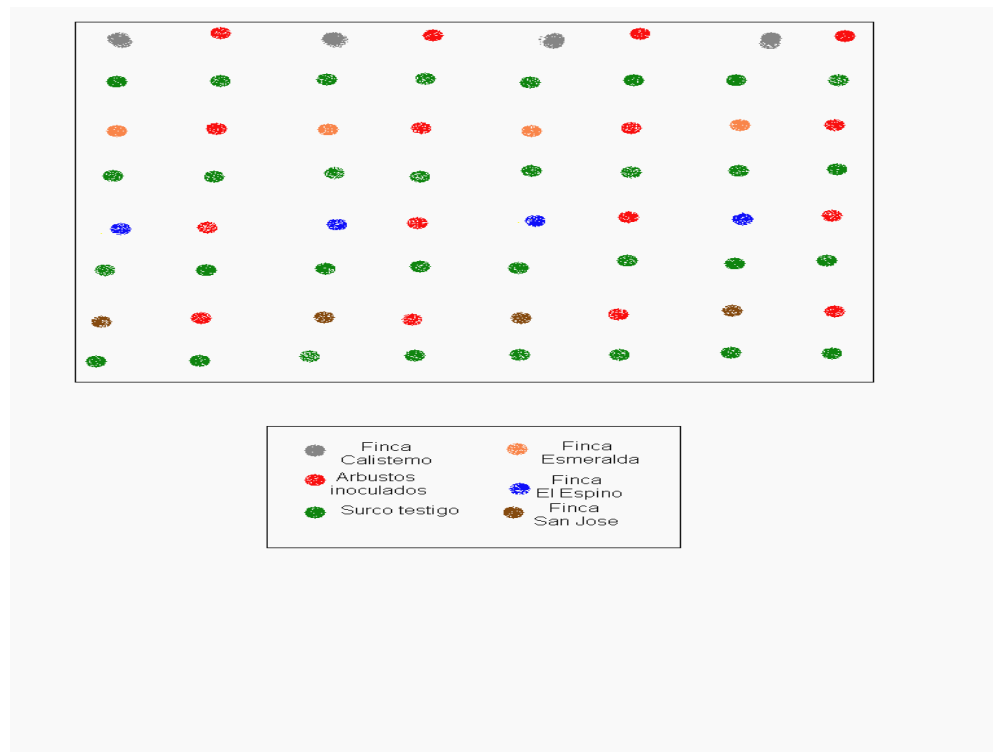
\* El número de hojas con roya por surco

\* El número de pústulas con roya por surco

**Después de la aplicación:**

\*El numero de pústulas hiperparasitadas.

Para este paso se esperaron diez días después de la aplicación para realizar la primera evaluación (conteo de pústulas de roya hiperparasitadas) y la segunda evaluación se llevo acabo a los quince días después. Todos estos datos se fueron anotando para luego elaborar un cuadro comparativo de promedios del hiperparasitismo con los datos iniciales y los datos obtenidos a los quince días después de la aplicación.



**Figura 4: esquema de la aplicación de la suspensión del hiperparasito a arbustos en el jardín de variedades de PROCAFE.**

#### 4 –RESULTADOS

Dentro de esta investigación se evaluaron dos tipos de medio de cultivo para la reproducción de conidias de *Verticillum*, siendo el más eficiente el medio líquido.

El cuadro 2, presenta los promedios de concentraciones de conidias/ml encontradas a los 15 días después de la inoculación de cada una de las cepas de las fincas muestreadas. De donde es notable que la finca Calistemo tuvo una concentración de  $11.2 \times 10^3$  conidias /ml siendo la mayor concentración y la finca San José con una concentración  $1.8 \times 10^2$  conidias /ml siendo la menor concentración.

Cuadro: 2 Promedios de concentraciones de conidias de *Verticillum sp* obtenidas a los 15 días de inoculación.

APLICACIONES ( fincas )	Promedios de concentraciones de conidias/ml de <i>Verticillum sp</i>
VC1 (finca Calistemo)	$11.2 \times 10^3$ conidias /ml
VE2 (finca Esmeralda)	$3.4 \times 10^3$ conidias /ml
VEs3 (finca El Espino)	$2.5 \times 10^3$ conidias /ml
TSJ4 (finca San José)	$1.8 \times 10^2$ conidias /ml

En el cuadro 3 se presentan los parámetros evaluados antes de la aplicación de la solución de esporas de *Verticillium sp* en el Jardín de Variedades de Procafé.

CUADRO: 3 Parámetros evaluados antes de la aplicación de la solución de esporas.

Aplicaciones (cepas por finca)	Nº de hojas totales por surco.	Nº de hojas totales con roya por surco	Total de pústulas con roya por surco	Total de hojas hiperparasitadas por <i>Verticillum</i>	Total de pústulas de Roya hiperparasitadas
VC1 (cepa finca Calistemo)	40	27	116	0	0
VE2 (cepa finca Esmeralda)	57	33	165	0	0
VEs3 (cepa finca El Espino)	60	34	50	0	0
V SJ4 (cepa finca San José)	59	28	59	0	0
Testigo	69	32	80	0	0

En el cuadro 4 se presenta lo obtenido después de quince días de la aplicación de la solución de esporas, tomando en consideración la cantidad de hojas hiperparasitadas por *Verticillum sp* por surco, la cantidad de pústulas de roya hiperparasitadas por surco y el total final de hojas parasitadas por roya.

CUADRO: 4 Total de hojas y pústulas hiperparasitadas a los quince días después de la aplicación, de la suspensión al 75 %.

Aplicaciones (cepas por finca)	Nº de hojas totales por surco.	Nº de hojas totales con roya por surco	Total de pústulas de roya por surco después de la aplicación	Total de hojas hiperparasitadas por <i>Verticillum</i> después de la aplicación	Total de pústulas de roya hiperparasitadas por surco
VC1 (cepa finca Calistemo)	40	0	47	30	69
VE2 (cepa finca Esmeralda)	57	7	120	33	45
VEs3 (cepa finca El Espino)	60	2	2	34	48
V SJ4 (cepa finca San José)	59	0	5	28	54
Testigo	69	32	80	0	0

En el cuadro 5 se presenta una comparación en porcentajes del total de pústulas de roya antes y después de los quince días de la aplicación. Puede notarse claramente la reducción del número de pústulas de roya y tomando en cuenta los porcentajes, puede verse que se redujo a un 44.63 % el parasitismo de la roya.

CUADRO: 5 Comparación de porcentajes del total de pústulas de roya por surco en el Jardín de Variedades de Procafé.

Aplicaciones (cepas por finca)	Total de pústulas de roya por surco al inicio	%	Total de pústulas de roya por surco después de los 15 días de la aplicación	%
VC1	116	29.74	49	12.05
VE2	165	42.30	120	30.80
VEs3	50	12.82	2	0.50
VSJ4	59	15.13	5	1.28
	S 390	100 %	S 174	44.63 %

## 5- DISCUSION DE RESULTADOS

Como se estableció en los resultados en cuanto a la comparación de medios sólido y líquido, se decidió trabajar con el medio líquido debido a que con este se obtuvo además del desarrollo de micelio una abundante producción de conidias. En cambio en el medio sólido solo se obtuvo desarrollo de micelio.

Como se puede observar en el cuadro 2 hay una notable diferencia en los promedios de concentraciones de conidias obtenidas. Esta divergencia obtenida permite comprobar lo que Leguizamón (1989), establece que factores como temperatura, humedad, sombreado, podas, etc. puedan variar la reproducción de este tipo de hiperparásito.

En el cuadro 3 se observa que en los parámetros evaluados existe una diferencia debido a que dicha investigación fue aplicada al azar en el Jardín de Variedades de Procafé, por lo que no todas las ramas de cada árbol del surco, presentaban el mismo número de hojas totales, ni el mismo número de hojas con roya, por lo tanto también el número total de pústulas con roya por surco era a variable.

Los resultados del cuadro 4 permitan suponer que el hiperparásito *Verticillium sp* tiene una lenta propagación natural, esto puede observarse al comparar los datos del testigo con los tratamientos aplicados ya que después de los 15 días no se obtuvo ni una pústula de roya hiperparasitada por *Verticillium sp*. En cambio para los diferentes aplicaciones hubo una reproducción de pústulas de roya y por su puesto hubo un aumento de pústulas del hiperparásito. En forma general se podría plantear que para que el hiperparásito, parasite con mayor rapidez a la roya, debe de hacerse una inoculación de carácter manual.



Al hacer una comparación porcentual tal como se ha hecho en el cuadro 5 puede apreciarse el efecto positivo de la inoculación manual del hiperparasito ya que en el inicio se tuvo un total de 390 pústulas de roya que constituyen el 100 y después de los 15 días de la aplicación se redujo a 174 pústulas de roya que equivales a un 44.63 %. Planteado de otra manera El total de pústulas de roya hiperparasitadas antes de la aplicación era de 0, después de los 15 días de la aplicación se llevo a obtener un total de 216 pústulas hiperparasitadas.

## 6. CONCLUSIONES

1-Deacuerdo a los resultados se puede concluir que la técnica de aislamiento utilizada en esta investigación fue efectiva y además innovadora y puede utilizarse para seguir reproduciendo a este tipo de hiperparasito.

2- El mejor medio de cultivo resultó ser el medio de cultivo líquido preparado con melaza en fermentadores artesanales.

3- Resultados obtenidos, permiten establecer que el tiempo en días en que *Verticillum* alcanza un nivel de desarrollo bajo condiciones de laboratorio es de 15 días.

4- Tomando en consideración la hipótesis de esta investigación se concluye además que cepas nativas de *Verticillum sp* que ocurre de manera natural en el campo, pueden utilizarse como controlador biológico de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*)”.

5- Los datos finales de esta investigación determinan la eficacia del hiperparasitismo de *Verticillum sp.* en un corto tiempo como fueron 15 días.

6- Resultados obtenidos en el laboratorio, determinaron que las concentraciones de conidias obtenidas no esta sujeta ni a bajas ni altas concentraciones, basta la presencia de conidias.

## 7. RECOMENDACIONES

1- Monitorear cepas nativas de *Verticillum* sp como controlador biológico de la roya del café, para así poder establecer el tiempo en que este hiperparasito se dispersa de manera natural.

2- La colecta y posterior reproducción de *Verticillum* sp se recomienda hacer en época lluviosa, dado que en época seca por las condiciones de humedad son adversas al hiperparasito.

3- Identificar la o las especies de *Verticillum* sp. presentes en el país.

4 - Evaluar otras sp de hiperparasito existentes como *Trichoderma*, *Fusarium* etc. para el control biológico de la roya.

## **8. LITERATURA CITADA.**

Alarcón, R; Camón, G. 1994. Uso de *Verticillium lecanii* en cafetales como control biológico de la roya del cafeto. *Fitopatología* 29 (1): 82-85.

Albarran R, JG. 1999. Influencia de los factores químicos y físicos sobre la regeneración de embriones somáticos de *Coffea Arabica* en Bioreactor simplificado. Tesis de maestría Costarúa. Centro Agronómico Tropical de investigación y Enseñanza. 100pp.

Andrews, JH. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology* 30: 603-635.

Arias, S. 1988. Los subsistemas de agro exportación en El Salvador. El café, el algodón y El azúcar. Talleres Gráficos UCA. 416 pp.

Avelino, J; Muller, R; Eskes, A; Santacreo, R; Holguín, F. 1999. La Roya anaranjada del cafeto mito y realidad. In. *Desafíos de la caficultura en Centroamérica*. Ed. B Bertrand; B Rapidel. San José, CR, IICA. PROMECAFE. GIRAD.IRD.CCR.FRANCIA. 496 p.

Baker, KF. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 25: 67-85.

Beaker S, M. 1978. Lucha contra la Roya del cafeto en Centro América. IN Agroconocimiento Revista de Informacion Agropecuaria, 26: 30 – 34 Santo Domingo Dom.

Becker R, S. 1991. El sistema *Coffea* spp. y *Hemileia vastatrix*. IN La Roya de Cafeto Conocimiento y Control. 1991. GTZ, Eschborn, DE. 281 p.

Bertrand, B; Rapidel, B. 1999. Desafíos de la caficultura en Centroamérica. Ed.B San José, CR. ÜCA. PROMECAFE. CIRAD. IRD. CCR.FRANCIA. 496 p.

Bigre, JP; Morand, JC; Tharaud, M. 1990. Patología de los cultivos florales y ornamentales. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, Es. 233 p.

Canjura , S, EM, 2000. Reproducción masiva de *Verticillium* sp. Hiperparasito de la roya del café, *Hemileia vastatrix*. Tesis de Maestría. Turrialba, CR. CATIE: 62 pp.

Commonwealth Mycological Institute. 1979. CMI Descriptions of pathogenic fungí and bacteria. CAB. Kew, Surrey, GB. Set 61.

De Bach, P. 1992. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. Compañía Editorial Continental. Decimocuarta reimpresión. MX. 929 p.

Echeverri, JH. 1980. Fitomejoramiento Genético del Cfe Con énfasis en resistencia a la roya en México y Centro América y Panamá (PROMECAFE), San José, CR. 93 pp.

Esques, AB; Mendes, MD; Robbs, CF. GAMS, W. (EMBRAPA/CNPDA, CEP 13820-Jaguariuna, SP). 1987. Studies on the hiperparasitism of *Hemileia vastatrix* by *Verticillium* spp. In Congreso Paulista de Fitopatología, 10 Piracicaba S.P. Resúmenes. Grupo Paulista de Fitopatología.

Flores, M; Bratescu, A; Martínez, JO; Oviedo, J; Acosta, A 2002. Centro América: El impacto de la caída de los precios del café. Unidad de desarrollo agrícola. Unidad de desarrollo económico. Naciones Unidas (CEPAL) México DF. 60 pp.

FONAIAP (Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias). 1988. Paquete tecnológico para la producción de café. Maracay, VE. 192 p. (Serie Paquetes Tecnológicos no. 6).

González, E; Martínez, MA; Martínez, B. 1995. Efectividad *in vitro* de *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas frente a *Planococcus* sp. Revista de Protección Vegetal 10: 265-268.

González, E; Martínez, B. 1996. Efectividad *in vitro* de dos cepas de *Verticillium lecanii* (Zimm) Viegas frente a *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. Revista de Protección Vegetal 11(3): 173-177.

Javed Z, J. 1987. Epidemiología y control de la roya del cafeto en Centroamérica. Plagas y enfermedades de carácter epidémico en cultivos frutales de la región centroamericana. CATIE, CR. p. 17-26 (Serie técnica. Informe técnico no. 110).

Hall, RA. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. IN Microbial Control of Pests and Plant Diseases. Ed. HD Burguer. Academic Press Inc. London, GB. p. 483-498.

Leguizamón C, J; Vélez A, P; González C, A. 1989. Efecto de extractos metabólicos de *Verticillium lecanii* sobre *Hemileia vastatrix*. Cenicafé 40 (2): 31-39.

Lewis, JA; Papavizas, GC. 1983. Production of chlamydospores and conidia by *Trichoderma* spp. in liquid and solid growth media. Soil Biology & Biochemistry 15(3): 351-357.

López, L. 1994. Uso de entomopatógenos y parasitoides como control biológico de plagas y enfermedades en el cultivo del café. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, CR. 54 – 56 pp.

López A., R; Chamorro T.,G; Gallo C., A. 1990. Aspectos económicos de la roya del cafeto. 50 años de CENICAFÉ 1938-1988. Conferencias conmemorativas. Chinchiná, CO. p. 91-96.

Mario Tamayo y Tamayo 1994, El proceso de la Investigación Científica. 3ª edición paginas consultadas 54 -55.

Monzón C, A. 1997. Evaluación de dos aislamientos de *Verticillium* sp. como agente de control biológico de la roya (*H. vastatrix*) del cafeto (*Coffea arábica* L.) en condiciones de invernadero. XVIII Simposio latinoamericano de caficultura.

Monzón, JA. 1992. Distribución de *Verticillium* sp. en tres zonas cafetaleras de Nicaragua y evaluación de dos aislamientos del hongo como agente de control biológico de la roya (*Hemileia vastatrix*) del cafeto (*Coffea arábica* L.). Tesis Mag. Se. Turrialba, CR. CATIE. 66

Ospina – Machado, JE; Adana, A. 1995. Producción Agrícola, Editorial Terranova, Bogota, CO. (2): 552 pp.

Rivas Z, S; Leguizamón C, J; Ponce D, C. 1996. Estudio histológico, anatómico y morfológico de *Verticillium lecanii* y *Talaromyces wortmannii* con *Hemileia vastatrix*. Cenicafé. 47 (1): 16-31.

Rivillas O, CA; Leguizamón C, JE; Gil V, LF. 1999. Recomendaciones para el manejo de la roya del cafeto en Colombia. Cenicafe. Boletín Técnico no. 19. 36 p.



Rodriguez, CJ. 1990. La resistencia genética a la roya del cafeto. 50 Años de Cenicafe 1938-1988. Conferencias conmemorativas. Centro nacional de investigaciones de café "Pedro Uribe Mejía". Chinchiná, CO. p. 207-212.

Romero, A; Camón, G. 1995. Patogenicidad de *Verticillium lecanii* sobre la roya del frijol en condiciones de invernadero. Fitopatología 30 (1): 30-34.

Ruiz, GM. 1994. Contribución del mejoramiento genético al desarrollo de la caficultura colombiana. Innovación y Ciencia. 3 (2): 1-6.

Shaw, DE. 1988. *Verticillium lecanii*: un hiperparásito del patógeno de la roya del café en Papua Nueva Guinea. Australasian Plant Pathology (Australia) 17 (1): 23.

Schieber, E. 1977. Impacto Económico de la Roya del cafeto en Latino América en contribuciones del IICA al conocimiento de la roya del cafeto. San José, CR. Pp. 17 – 20.

Vélez-Arango, PE. 1991. Estudio macro y microscópico del efecto de *Verticillium lecanii* sobre el desarrollo de lesiones de la roya del cafeto. Cenicafe 42 (1): 13-20.

Vélez A, PE; Rosillo G, AG. 1995. Evaluación del antagonismo del hongo *Verticillium lecanii*, sobre *Hemileia vastatrix*, en condiciones de invernadero y de campo. Cenicafe 46 (1): 45-55.

## 9-ANEXOS

### ANEXO 1 Hojas de cafeto con pústulas y esporas de Roya.

1-A



Bandola con hojas con roya

1-B



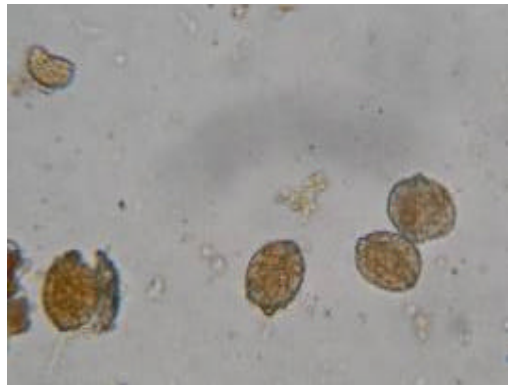
Envés de la hoja con pústulas de roya

1-C



Esporas de roya

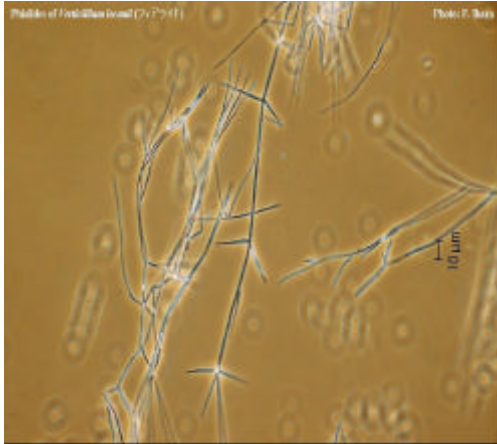
1-D



Esporas de roya vistas en el microscopio

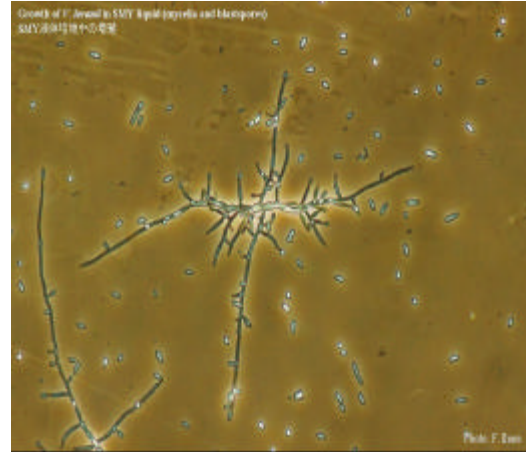
**ANEXO 2 Micrografías de hifas y esporas de *Verticillium sp.***

**2-A**



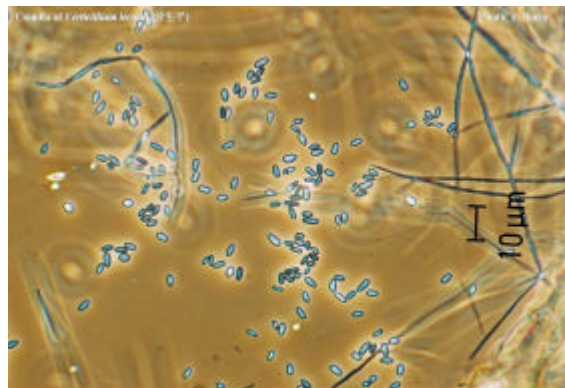
Hifas de *Verticillium sp*

**2-B**



Hifas de *Verticillium sp* con mayor desarrollo

**2-C**



Esporas de *Verticillium sp*

**ANEXO 3 Recolección, selección y aislamiento de *Verticillium* sp.**

**3-A**



**3-B**



Recolección de muestras para el aislamiento de *Verticillium*

**3-C**



Selección de la muestra

**3-D**



Aislamiento de *Verticillium* sp

## ANEXO 4 Preparación de medios

4-A



Preparación de medio de cultivo líquido

4-B



Fermentadores artesanales con medio líquido y botes con medio sólido

4-C



Fermentadores artesanales

## ANEXO 5 Preparación de suspensión de *Verticillium* sp y aspersión en el campo

5-A



Frascos con Suspensiones de esporas y Cajas petri con cepas puras de *Verticillium* sp.

5-B



Preparación suspensión de esporas de *Verticillium* sp en rociadores manuales.

5- C



Anotaciones antes de la aplicación hiperparasito

5-D



Aplicación de la suspensión de esporas de *Verticillium* sp.

