

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



“Aislamiento y aplicación de *Simplicillium lanosoniveum* Zare y Gams 2001 para el control biológico de *Hemileia vastatrix* Berkeley y Broome 1869 (roya del cafeto) en Concepción de Ataco, El Salvador”

Trabajo de graduación presentado por:

Bianca Guadalupe Rosales Portillo

Otto René Amaya Meléndez

Para optar al grado de:

Licenciado en Biología.

Ciudad Universitaria, San Salvador, Febrero 2019.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



“Aislamiento y aplicación de *Simplicillium lanosoniveum* Zare y Gams 2001 para el control biológico de *Hemileia vastatrix* Berkeley y Broome 1869 (roya del cafeto) en Concepción de Ataco, El Salvador”

Trabajo de graduación presentado por:

Bianca Guadalupe Rosales Portillo

Otto René Amaya Meléndez

Para optar al grado de:

Licenciado en Biología.

Docente Asesora

M.Sc. Zoila Virginia Guerrero Mendoza

Ciudad Universitaria, San Salvador, Febrero 2019.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



“Aislamiento y aplicación de *Simplicillium lanosoniveum* Zare y Gams 2001 para el control biológico de *Hemileia vastatrix* Berkeley y Broome 1869 (roya del cafeto) en Concepción de Ataco, El Salvador”

Trabajo de graduación presentado por:

Bianca Guadalupe Rosales Portillo
Otto René Amaya Meléndez

Para optar al grado de:

Licenciado en Biología.

Tribunal Calificador

M.Sc. Zoila Virginia Guerrero Mendoza
Docente Asesora

Ms.D. María Herminia Merino Escobar

Ing. José Jesús Córdova Miranda

Ciudad Universitaria, San Salvador, Febrero 2019.

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

RECTOR

M.Sc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO.

VICERRECTOR ACADÉMICO

DR. MANUEL DE JESÚS JOYA.

SECRETARIO GENERAL

LIC. CRISTÓBAL HERNÁN RÍOS BENÍTEZ.

FISCAL GENERAL

LIC. RAFAEL HUMBERTO PEÑA MARÍA.

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA.

DECANO

LIC. MAURICIO HERNÁN LOVO CÓRDOVA.

VICE DECANO

LIC. CARLOS ANTONIO QUINTANILLA APARICIO.

DIRECTORA ESCUELA DE BIOLOGÍA

M.Sc. ANA MARTHA ZETINO CALDERÓN.

AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso, por guiarme e iluminarme en cada momento de este proceso y permitirme culminar esta gran meta y cumplir uno más de mis sueños.

A mis padres, por siempre apoyarme pero especialmente agradezco infinitamente a mi madre Rosa Portillo por su amor, confianza y apoyo incondicional en cada etapa de este logro.

A la memoria de mi tía, Martha Portillo, que más que una tía fue una abuela a la cual le agradezco infinitamente por siempre apoyarme y confiar en que lograría esta meta.

Bianca Rosales

A Dios porque todas las cosas proceden de él, y existen por él y para él. ¡A él sea la gloria por siempre!

A mis padres, por brindarme su apoyo económico y moral para que cumpliera esta meta.

Otto Amaya

Un agradecimiento especial a nuestra estimada profesora y asesora M.Sc. Zoila Virginia Guerrero Mendoza, por la paciencia, confianza, orientación y sobre todo por los conocimientos transmitidos para la elaboración de este trabajo de graduación.

A FUNDESYRAM, especialmente al ingeniero Jesús Córdova, por su apoyo logístico en la realización de esta investigación.

A todos los Docentes de la Escuela de Biología, por ser parte fundamental en nuestra formación profesional al transmitirnos en cada cátedra parte de sus conocimientos.

Al Licenciado Alfredo Aguilar Aguilar González, Docente de la Escuela de Matemática, por su asesoría en los estadísticos utilizados en este trabajo de graduación.

Bianca Rosales y Otto Amaya.

INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	i
INDICE DE CONTENIDO	ii
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS.....	ix
INDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo general.....	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
III. ANÁLISIS TEÓRICO	5
3.1 Antecedentes.....	5
3.2 Origen y distribución geográfica del café.....	6
3.3 Introducción e historia del café en El Salvador.....	8
3.4 Clasificación taxonómica del café.....	10
3.5 Morfología del café.....	10
3.6 Fisiología del café.....	13
3.7 Factores ecológicos que influyen en el cultivo del café.....	15
3.8 Variedades de café en El Salvador.....	17
3.9 Enfermedades que afectan el cultivo de café.....	18
3.10 Origen de la roya del cafeto.....	20
3.11 Introducción e historia de la roya en América.....	23
3.12 Clasificación taxonómica de la roya del cafeto.....	22
3.13 Morfología de la roya del cafeto.....	23
3.14 Ciclo de vida de la roya del café.....	24
3.15 Sintomatología de la roya.....	26

3.16 Patogénesis de la roya.....	28
3.17 Aspectos epidemiológicos de la roya.....	29
3.18 Mecanismos de diseminación de la roya.	29
3.19 Factores que afectan al desarrollo de <i>Hemileia vastatrix</i>	31
3.20 Control de la roya del cafeto.....	32
3.21 Impacto económico de la roya.	39
3.22 Microhongos con capacidad antagonista contra <i>Hemileia vastatrix</i>	42
3.23 Clasificación taxonómica de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> (Zare y Gams 2001). 43	
3.24 Morfología de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> (Zare y Gams 2001).....	44
3.25 Modo de acción de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> (Zare y Gams 2001).....	45
IV. METODOLOGÍA.....	47
4.1 Ubicación del área de estudio: Finca Altamira.....	47
4.1.1 Características físicas de Concepción de Ataco.....	48
4.2 Ubicación del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD). ...	50
4.3 Ubicación del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova”.	51
4.4 Fase de campo.....	52
4.4.1 Recolección de muestras foliares con <i>Simplicillium lanosoniveum</i>	52
4.4.2 Inoculación de plantas de café con <i>Simplicillium lanosoniveum</i>	53
4.4.3 Toma de datos en campo.	55
4.5 Fase de laboratorio.....	57
4.5.1 Aislamiento y purificación de la cepa <i>Simplicillium lanosoniveum</i>	57
4.5.2 Identificación del hongo <i>Simplicillium lanosoniveum</i>	58
4.5.3 Efecto de la luz en el desarrollo y producción de conidios de <i>Simplicillium lanosoniveum</i>	59
4.5.4 Reproducción de esporas de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> en medio sólido (arroz precocido).	60
4.5.5 Medición y conteo de esporas de <i>Simplicillium lanosoniveum</i>	62

4.6 Medición de las variables.	63
4.6.1 Variable 1: Incidencia de roya.	64
4.6.2 Variable 2: Severidad de la roya.	64
4.7 Análisis estadístico.	65
4.7.1 Análisis de varianza de un factor (ANOVA).	65
V. RESULTADOS	66
5.1 Descripción morfológica del hongo aislado <i>Simplicillium lanosoniveum</i>	66
5.1.1 Medición de esporas de <i>Simplicillium lanosoniveum</i>	68
5.2 Identificación molecular del hiperparásito aislado.	69
5.3 Producción de esporas de <i>S. lanosoniveum</i>	70
5.4 Período de colonización de pústulas de roya de café por <i>S. lanosoniveum</i>	71
5.5 Resultados estadísticos de incidencia de roya.	72
5.5.1 Incidencia de roya a los 0 días (antes de la aplicación).	74
5.5.2 Incidencia de roya a los 15 días (después de la aplicación).	75
5.5.3 Incidencia de roya a los 30 días (después de la aplicación).	77
5.5.4 Incidencia de roya a los 45 días (después de la aplicación).	78
5.6 Resultados estadísticos de severidad de roya.	80
5.6.1 Severidad de la roya en el estrato bajo a los 0 días (antes de la aplicación). .	82
5.6.2 Severidad de la roya en el estrato medio a los 0 días (antes de la aplicación).	83
5.6.3 Severidad de la roya en el estrato alto a los 0 días (antes de la aplicación)...	85
5.6.4 Severidad de la roya en el estrato bajo a los 15 días (después de la aplicación).	87
5.6.5 Severidad de la roya en el estrato medio a los 15 días (después de la aplicación).	88
5.6.6 Severidad de la roya en el estrato alto a los 15 días (después de la aplicación).	90

5.6.7 Severidad de la roya en el estrato bajo a los 30 días (después de la aplicación).	91
5.6.8 Severidad de la roya en el estrato medio a los 30 días (después de la aplicación).	93
5.6.9 Severidad de la roya en el estrato alto a los 30 días (después de la aplicación).	95
5.6.10 Severidad de la roya en el estrato bajo a los 45 días (después de la aplicación).	97
5.6.11 Severidad de la roya en el estrato medio a los 45 días (después de la aplicación).	98
5.6.12 Severidad de la roya en el estrato alto a los 45 días (después de la aplicación).	100.
5.6.13 Porcentaje de severidad la roya.	101
5.7 Perfil climatológico de Concepción de Ataco en el período de muestreo.	102
VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	108
VII. CONCLUSIONES	110.
VII. RECOMENDACIONES	113.
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115.
X. ANEXOS	132

ÍNDICE DE TABLAS

Nº	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica del café (<i>Coffea arabica</i>). Fuente: Flora de Nicaragua 2017.	10
Tabla 2. Enfermedades causadas por hongos reportadas para el cafeto. Fuente: Orozco 2003; López 2010.	19
Tabla 3. Clasificación taxonómica de la roya de café (<i>Hemileia vastatrix</i>). Fuente: SENASICA 2016.	22
Tabla 4. Fungicidas protectores recomendados para el combate preventivo de la roya del cafeto. Fuente: CICAFFÉ 2013.	34
Tabla 5. Fungicidas sistémicos recomendados para el combate de la roya del cafeto. Fuente: CICAFFÉ 2013.	35
Tabla 6. Pérdidas causadas por la roya anaranjada en la producción del 2012-2013. Fuente: Avelino y Rivas 2013.	41
Tabla 7. Clasificación taxonómica de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> . Fuente: Sung <i>et al.</i> 2007.	43
Tabla 8. Diseño experimental de la investigación.	54
Tabla 9. Medidas adecuadas para la reproducción de <i>S. lanosoniveum</i> en ocho bolsas de polipropileno.	61
Tabla 10. Dosis y promedios de concentraciones de esporas de <i>S. lanosoniveum</i> aplicadas en las plantas de café.	70
Tabla 11. Análisis de varianza de incidencia de roya en los tratamientos y el grupo control.	72
Tabla 12. Diferencias significativas de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control a través del tiempo muestreado.	73
Tabla 13. Análisis de varianza de incidencia de roya a los 0 días.	74
Tabla 14. Diferencias significativas de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 0 días.	74
Tabla 15. Análisis de varianza de incidencia de roya a los 15 días.	75

Tabla 16. Diferencias significativas de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 15 días.....	76
Tabla 17. Análisis de varianza de incidencia de roya a los 30 días.....	77
Tabla 18. Diferencias significativas de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 30 días.....	77
Tabla 19. Análisis de varianza de incidencia de roya a los 45 días.....	78
Tabla 20. Diferencias significativas de incidencia de roya entre los tratamientos a los 45 días.....	79
Tabla 21. Análisis de varianza de la severidad de la roya en los tratamientos y el grupo control.....	80
Tabla 22. Diferencias significativas de la severidad de la roya entre los tratamientos y el grupo control a través del tiempo muestreado.....	81
Tabla 23. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato bajo a los 0 días.....	82
Tabla 24. Diferencias significativas de la severidad de la roya, en el estrato bajo, entre los tratamientos y el grupo control a los 0 días.....	82
Tabla 25. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato medio a los 0 días.....	84
Tabla 26. Diferencias significativas de la severidad de la roya, en el estrato medio, entre los tratamientos y el grupo control a los 0 días.....	84
Tabla 27. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato alto a los 0 días.....	85
Tabla 28. Diferencias significativas de la severidad de la roya, en el estrato alto, entre los tratamientos a los 0 días.....	86
Tabla 29. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato bajo a los 15 días.....	87
Tabla 30. Diferencias significativas de la severidad de la roya, en el estrato bajo, entre los tratamientos y el grupo control a los 15 días.....	87
Tabla 31. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato medio a los 15 días.....	89

Tabla 32. Diferencias significativas de la severidad de la roya, en el estrato medio, entre los tratamientos y el grupo control a los 15 días.....	89
Tabla 33. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato alto a los 15 días.....	90
Tabla 34. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato bajo a los 30 días.....	92
Tabla 35. Diferencias significativas de la severidad de la roya, en el estrato bajo, entre los tratamientos y el grupo control a los 30 días.....	92
Tabla 36. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato medio a los 30 días.....	93
Tabla 37. Diferencias significativas de la severidad de la roya, en el estrato medio, entre los tratamientos y el grupo control a los 30 días.....	94
Tabla 38. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato alto a los 30 días.....	95
Tabla 39. Diferencias significativas de la severidad de la roya, en el estrato alto, entre los tratamientos y el grupo control a los 30 días.....	95
Tabla 40. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato bajo a los 45 días.....	97
Tabla 41. Diferencias significativas de la severidad de la roya, en el estrato bajo, entre los tratamientos y el grupo control a los 45 días.....	97
Tabla 42. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato medio a los 45 días.....	98
Tabla 43. Diferencias significativas de la severidad de la roya, en el estrato medio, entre los tratamientos y el grupo control a los 45 días.....	99
Tabla 44. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato alto a los 45 días.....	100
Tabla 45. Diferencias significativas de la severidad de la roya, en el estrato alto, entre los tratamientos y el grupo control a los 45 días.....	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	Pág.
Figura 1. Morfología de una planta de <i>C. arabica</i> . Fuente: Hermann 1887.....	10
Figura 2. Uredosporas de <i>Hemileia vastatrix</i> . Fuente: Gardeners' Chronicle 1869... 24	24
Figura 3. Ciclo de vida de la roya del cafeto. Fuente: SENASICA 2013.....	26
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Hemileia vastatrix</i> y factores que lo afectan. Fuente: Avelino y Rivas 2013; Feijóo 2014.	31
Figura 5. Fiálides y conidios de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> . Fuente: Zare y Gams 2001.	44
Figura 6. Colonias de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> . Fuente: Ward <i>et al.</i> 2014.....	45
Figura 7. <i>Simplicillium lanosoniveum</i> enrollándose alrededor de las urediniosporas de la roya de soja (<i>Phakopsora pachyrhizi</i>). Fuente: Ward <i>et al.</i> 2011; Ward <i>et al.</i> 2014.	46
Figura 8. Mapa de la ubicación geográfica del área de estudio: Finca Altamira.....	47
Figura 9. Mapa de la ubicación geográfica del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud.....	50
Figura 10. Mapa de la ubicación geográfica del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova”.	51
Figura 11. Recolección de muestra foliar con el hongo hiperparásito <i>Simplicillium lanosoniveu</i> .creciendo sobre roya.	52
Figura 12. Esquema de las plantas evaluadas dentro de cada parcela.	53
Figura 13. Aspersión del inóculo en plantas de café.	54
Figura 14. Esquema de los estratos en una planta de café y el número de hojas muestreadas en cada rama.....	55
Figura 15. Escala en porcentaje de daño foliar de la roya. Fuente: SENASICA 2013.	56
Figura 16. Selección e identificación de plantas, ramas y hojas evaluadas.....	56
Figura 17. Siembra del hongo <i>Simplicillium lanosoniveum</i> en el medio de cultivo PDA.	57

Figura 18. Identificación microscópica del hongo <i>Simplicillium lanosoniveum</i>	58
Figura 19. Estimulación del hongo <i>Simplicillium lanosoniveum</i> con luz blanca.	59
Figura 20. Preparación de arroz precocido para producción de esporas de <i>Simplicillium lanosoniveum</i>	60
Figura 21. Inoculación del arroz con la suspensión de esporas de <i>Simplicillium lanosoniveum</i>	62
Figura 22. Vista microscópica de los cuadros tomados en cuenta en el conteo de esporas en la cámara de Neubauer.	63
Figura 23. Morfología colonial de <i>Simplicillium lanosoniveum</i> . A) parte superior del medio. B) parte inferior del medio.	66
Figura 24. Estructura microscópica del hongo hiperparásito <i>Simplicillium lanosoniveum</i> . A) Fiálides no teñidas observadas con un aumento de 40X. B) Fiálides y conidios no teñidos a un aumento de 40X. C) Fiálides y conidios teñidos con lactofenol a un aumento de 40X. D) células conidiógenas observadas al natural en el microscopio con un aumento de 40X.	67
Figura 25. Diversidad de formas identificadas en los conidios de <i>Simplicillium lanosoniveum</i>	68
Figura 26. Lectura de las dimensiones de las esporas de <i>Simplicillium lanosoniveum</i>	69
Figura 27. Secuencias de ITS para la especie <i>Simplicillium lanosoniveum</i> . Fuente: Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) 2017.	70
Figura 28. Colonización de la pústula de roya por <i>S. lanosoniveum</i> . A) a los 10 días, B) a los 13 días. C) pústula totalmente colonizada a los 15 días.	71
Figura 29. Comparación de los promedios, en porcentaje, de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control a través del tiempo muestreado.	73
Figura 30. Comparación de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 0 días.	75
Figura 31. Comparación de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 15 días.	76

Figura 32. Comparación de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 30 días.	78
Figura 33. Comparación de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 45 días.	79
Figura 34. Comparación de los promedios de severidad de roya entre los tratamientos y el grupo control a través del tiempo muestreado.	81
Figura 35. Comparación de los promedios de severidad de la roya, en el estrato bajo, entre los tratamientos y el grupo control a los 0 días.....	83
Figura 36. Comparación de los promedios de severidad de la roya, en el estrato medio, entre los tratamientos y el grupo control a los 0 días.....	84
Figura 37. Comparación de los promedios de la severidad de la roya, en el estrato alto, entre los tratamientos a los 0 días.	86
Figura 38. Comparación de los promedios de la severidad de la roya, en el estrato bajo, entre los tratamientos y el grupo control a los 15 días.....	88
Figura 39. Comparación de los promedios de la severidad de la roya, en el estrato medio, entre los tratamientos y el grupo control a los 15 días.....	89
Figura 40. Comparación de los promedios de severidad de la roya, en el estrato alto, entre los tratamientos y el grupo control a los 15 días.....	91
Figura 41. Comparación de los promedios de severidad de la roya, en el estrato bajo, entre los tratamientos y el grupo control a los 30 días.....	92
Figura 42. Comparación de los promedios de severidad de la roya, en el estrato medio, entre los tratamientos y el grupo control a los 30 días.....	94
Figura 43. Comparación de los promedios de severidad de la roya, en el estrato alto, entre los tratamientos y el grupo control a los 30 días.....	96
Figura 44. Comparación de los promedios de severidad de la roya, en el estrato bajo, entre los tratamientos y el grupo control a los 45 días.....	97
Figura 45. Comparación de los promedios de severidad de la roya, en el estrato medio, entre los tratamientos y el grupo control a los 45 días.....	99
Figura 46. Comparación de los promedios de severidad de la roya, en el estrato alto, entre los tratamientos y el grupo control a los 45 días.....	101

Figura 47. Comparación de los porcentajes de la severidad de roya entre los tratamientos y el grupo control a través del tiempo muestreado.	102
Figura 48. Promedios de precipitación registrada durante las aplicaciones de los inóculos en los meses de abril a mayo de 2017.	103
Figura 49. Promedios de humedad relativa registrada durante las aplicaciones de los inóculos en los meses de abril a mayo de 2017.	104
Figura 50. Promedios de temperatura registrada durante las aplicaciones de los inóculos en los meses de abril a mayo de 2017.	105

ÍNDICE DE ANEXOS.

Nº	Pág.
Anexo 1. Recopilación de definiciones de palabras claves en el texto	132
Anexo 2. Fotografías que muestran la diferencia del desarrollo de <i>L. lecanii</i> y <i>S. lanosoniveum</i> sobre las pústulas de roya. A) <i>L. lecanii</i> forma necrosis en el tejido vegetal, tomada por el técnico de PROCAFÉ German Mejía 2004. B) <i>S. lanosoniveum</i> colonizando una pústula de roya sin formar necrosis en el tejido vegetal, tomada por Bianca Rosales y Otto Amaya 2017.....	134
Anexo 3. Esquema sobre los Postulados de Koch.....	134
Anexo 4. Proceso de recolección de muestras foliares con el hiperparásito <i>S. lanosoniveum</i> cubriendo pústulas de roya.....	135
Anexo 5. Proceso de preparación de los inóculos de <i>S. lanosoniveum</i> aplicados a las plantas de café infectadas	135
Anexo 6. Formato para evaluación de incidencia de roya por estrato en cada planta...136	
Anexo 7. Formato para evaluación de severidad de roya por número de pústulas y porcentaje de daño en cada hoja seleccionada.....	136
Anexo 8. Selección de plantas, ramas y hojas evaluadas para la determinación de la incidencia y severidad de roya.....	137
Anexo 9 Proceso de aislamiento y purificación de <i>S. lanosoniveum</i> en medio de cultivo PDA.	137
Anexo 10. Identificación del hongo <i>Simplicillium lanosoniveum</i> a través de un microscopio de campo claro.	138
Anexo 11. Proceso de preparación del arroz para la producción de esporas de <i>S. lanosoniveum</i>	138
Anexo 12. Proceso de inoculación del arroz para la producción de esporas de <i>S. lanosoniveum</i>	139
Anexo 13. Procedimiento de la suspensión de esporas de <i>S. lanosoniveum</i> para el conteo en la cámara de Neubauer.....	139
Anexo 14. Informe de análisis de ITS (espaciadores internos transcritos) emitido por el Laboratorio de Técnicas Moleculares Aplicadas a la Fitoprotección de la UCR.....	140
Anexo 15. Amplificación del ADN ribosomal con el cebador ITS 4.	141
Anexo 16. Amplificación del ADN ribosomal con el cebador ITS 5.	142
Anexo 17. Datos de la incidencia de roya registrada en el tratamiento de 900 g de arroz inoculados con el hiperparásito en estudio.....	143
Anexo 18. Datos de la incidencia de roya registrada en el tratamiento de 1500 g de arroz inoculados con el hiperparásito en estudio.....	143
Anexo 19. Datos de la incidencia de roya registrada en el grupo control.	144
Anexo 20. Datos de la severidad de roya registrada en el tratamiento de 900 g de arroz inoculados con el hiperparásito en estudio.....	144

Anexo 21. Datos de la severidad de roya registrada en el tratamiento de 1500 g de arroz inoculados con el hiperparásito en estudio.....	145
Anexo 22. Datos de la severidad de roya registrada en el grupo control.	145

RESUMEN.

Las enfermedades causadas por hongos en el cultivo del café tienen una gran incidencia en la calidad del grano y en la economía de los productores. *Hemileia vastatrix* es el hongo causante de la principal enfermedad de este cultivo, ya que a lo largo de la historia ha generado las mayores pérdidas debido a que afecta los tejidos vivos de las hojas y es altamente propagable.

El objetivo de la investigación fue aislar un hongo hiperparásito de la roya del cafeto y aplicarlo en plantas de café infectadas (Anexo 1), por lo que el trabajo se realizó en tres fases, en la primera se recolectó y se aisló la cepa de *Simplicillium lanosoniveum*, el cual se encuentra naturalmente parasitando la roya, dicho hongo se colectó en el Municipio de Concepción de Ataco, un lugar representativo de la caficultura salvadoreña; en la segunda fase se reprodujo masivamente la cepa en arroz precocido y en la tercera se aplicó y evaluó en plantas de café del mismo cultivo de donde se extrajo la cepa.

El ensayo se realizó bajo un diseño completamente al azar, seleccionando así tres parcelas una por cada tratamiento y el testigo, dentro de las cuales se eligieron cincuenta árboles de cafeto como parcela efectiva. La aplicación del hiperparásito aislado y producido en arroz se realizó en dos diferentes dosis y concentraciones de esporas, para el tratamiento uno se utilizó 900 gramos de arroz inoculado por 50 litros de agua (2.4×10^7 esporas por mililitro de agua) y para el tratamiento dos se utilizó 1500 gramos de arroz inoculado por 50 litros (3.21×10^7 esporas por mililitro de agua); es decir, a cada planta de café muestreada en ambos tratamientos se le asperjó un litro de agua inoculada con el hongo, dichas aplicaciones se realizaron tres veces en un intervalo de quince días.

Las evaluaciones de las variables incidencia y severidad de roya, se realizaron pre y quince días post a cada aplicación; para ello, se dividió cada cafeto evaluado en tres estratos, muestreándose una rama por cada uno, en el caso de la incidencia se contabilizó el número de hojas infectadas y hojas sanas de cada rama; en cambio, la severidad se evaluó de dos formas: contabilizando el número de pústulas de tres hojas de cada rama escogida y determinando el porcentaje de daño de cada hoja de acuerdo a la escala de severidad para roya.

Los resultados de la identificación de la cepa aislada y evaluada indicaron que tiene una secuenciación de identidad máxima del 99% con la adhesión del GenBank KT878334.1 de *S. lanosoniveum*, dicha identificación por medio de la base de datos de secuencias ITS fue realizada por el Laboratorio de Técnicas Moleculares Aplicadas a la Fitoprotección de la Universidad de Costa Rica. La identificación de la morfología macroscópica y microscópica del hongo realizada en este estudio, constató lo descrito por Zare y Gams 2001, ya que se observó colonias blancas con apariencia algodonosa y con un halo color amarillo cremoso en la parte inferior, células conidiógenas siempre solitarias y conidios de distintas formas y de un tamaño promedio de 1.8 x 1.5 μm .

Los resultados de la investigación indicaron que *S. lanosoniveum* es un hongo filamentososo que se puede aislar perfectamente en medio de cultivo PDA, producirse masivamente en medio sólido (arroz precocido) en un periodo de 18 días y en condiciones de campo parasitar las pústulas de roya totalmente en un lapso de 15 días. Los datos obtenidos de hiperparasitismo, se analizaron por el modelo de análisis de varianza para una variable, el cual nos indicó que las diferentes dosis y concentraciones del hongo aplicadas presentaron entre ellas diferencias estadísticamente significativas, ya que de acuerdo a la disminución de la enfermedad en cada parcela para las variables epidemiológicas de incidencia y severidad, entre la primera y la última evaluación del tratamiento uno y dos fueron respectivamente: 11,94% y 28,77%; 23,60% y 33%. Por lo tanto se concluyó que la enfermedad con la acción del hiperparásito en estudio disminuyó un 70% en las plantas del tratamiento uno y en las del tratamiento dos disminuyó un 89%.

I. INTRODUCCIÓN

En El Salvador el cultivo del café juega un papel importante en la economía, generando alrededor de 150,000 empleos directos y cerca de 500,000 empleos indirectos, además representa un 7.5 % de las exportaciones totales y el 22.8 % del PIB Agrícola (Consejo Salvadoreño del Café (CSC) 2013). Aunque durante los últimos años el cultivo del cafeto ha venido declinando debido al incremento de problemas como: los altos costos de producción, los bajos precios que se pagan al productor y la incidencia de plagas y enfermedades (Monzón 1992).

Las variedades del arbusto de café como Paca y Bourbon son las más cultivadas en nuestro país debido a la calidad del grano, pero en los últimos años se ha sustituido gran parte del bosque cafetalero con variedades resistentes a las enfermedades más comunes. En América Central, las enfermedades más comunes son: El ojo de gallo (*Mycena citricolor*), mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*), antracnosis (*Colletotrichum sp*), derrite o quema (*Phoma costarricensis*), mal de hilachas (*Corticium koleroga*) y la roya (*Hemileia vastatrix*) (López 2010); esta última, según la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFÉ) 2013 desde su aparición en los años de 1979, es la principal enfermedad de importancia económica del café y según Subero (2005) es considerada en el ámbito mundial entre las siete enfermedades más peligrosas que atacan al cafeto, ya que puede llegar a causar hasta un 100% de daño en las plantaciones y reducir considerablemente en unos pocos años la producción de las plantaciones, ya que provoca la caída prematura de las hojas propiciando la reducción de la capacidad fotosintética así como el debilitamiento de los arbustos de café, lo que finalmente causa la muerte de estos (American Phytopathological Society (APS) 2011).

En El Salvador desde la introducción de la roya se han registrado pérdidas debido a que el parque cafetalero está constituido en un 88.1% con variedades susceptibles a la roya (Bourbon, Paca, Catuai y Pacamara) (PROCAFÉ 2014), sin embargo fue en el año 2012 que se desató el peor brote de roya del café de los últimos 50 años, el cual impactó al menos un 47% del parque cafetalero nacional (Oxfam 2014), generando una reducción de al menos 400,000 mil quintales de una producción nacional estimada en 1.9 millones de quintales. Las variedades cultivadas en bajo y media altura reportaron las mayores pérdidas las cuales rondaron el 50%, lo cual generó una pérdida total del 34.2% en

exportaciones (Programa Mundial de Alimentos 2013). A partir de esa epidemia, la producción del café en el país ha experimentado un marcado declive, lo cual se evidencia en la cosecha de 2013/2014 en comparación con la temporada 2012/2013 ya que se redujo un 58% (Oxfam 2014). Otra problemática generada por la Roya es los efectos colaterales y repercusiones socioeconómicas que implica, ya que según el CSC (2013) la generación de empleo por parte del rubro cafetalero constituye cerca del 6% de la población económicamente activa y debido a la pérdida de jornales de café y la reducción de los precios internacionales del grano son alrededor de 7,608 hogares participantes en el jornaleo del café que están clasificados en una situación de inseguridad alimentaria moderada (Oxfam 2014).

Por todo lo que la roya implica, en nuestro país y en el resto de países cafetaleros se han implementado diferentes estrategias para el combate de dicha enfermedad, entre ellas están: el uso de fungicidas, los cuales no son muy factibles porque incrementan los costos de producción; la aplicación de prácticas culturales que incrementan la productividad compensando así las pérdidas por la roya; el uso de variedades resistentes, lo cual implica una desventaja debido a que las variedades menos resistentes a la roya poseen granos de mayor calidad e importancia económica, por lo que la implementación de esta última técnica no es tan factible y aumenta la pérdida de diversidad genética autóctona; el uso de microorganismos antagonistas del fitopatógeno y el control integrado (combinación de varias estrategias) (Avelino y Rivas 2013).

En los últimos años se ha vuelto una necesidad combatir la roya de una manera rentable económicamente y amigable con el medio ambiente, por lo tanto se han propuesto diferentes microorganismos antagonistas entre los que se encuentran los hongos fungulares, los cuales están asociados a otros hongos como parásitos o saprofitos (Hawksworth *et al.* 1995). El hiperparasitismo es el método que se ha propuesto en varios estudios relacionados a la roya, en nuestro país, instituciones como PROCAFÉ y COEX promueven el uso de *Trichoderma harzianum* como medida biológica preventiva para el control de la roya, pero según James *et al.* 2016, *Lecanicillium lecanii* y el género *Simplicillium* son los mejores candidatos micoparasitantes de alta abundancia para el control de la roya del cafeto, esto debido a que atacan a las pústulas en su etapa de madurez. La especie *L. lecanii* ya es ampliamente conocido como un antagonista de la roya del café, en cambio el género *Simplicillium* solo ha sido reportado por Zare y Gams 2001 y James *et al.* 2016, como asociada a *H. vastatrix*.

En El Salvador, no se ha documentado estudios enfocados a la evaluación del hongo *Simplicillium lanosoniveum* como controlador biológico de la roya del cafeto, por lo tanto esta investigación se realizó con el propósito de presentar a los caficultores salvadoreños una nueva alternativa biológica capaz de controlar la roya eficazmente y así contribuir al mejoramiento de la problemática más grande que enfrenta la caficultura salvadoreña.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general.

Aislar y aplicar *Simplicillium lanosoniveum* Zare y Gams 2001 para el control biológico de *Hemileia vastatrix* Berkeley y Broome 1869 (roya del café) en Concepción de Ataco, El Salvador.

2.2 Objetivos específicos.

- ✓ Encontrar una cepa de *Simplicillium lanosoniveum* en las hojas de los arbustos de *Coffea arabica*.
- ✓ Aislar, purificar y reproducir la cepa de *Simplicillium lanosoniveum*.
- ✓ Determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos asperjados con diferentes inóculos de *Simplicillium lanosoniveum*.

III. ANÁLISIS TEÓRICO

3.1 Antecedentes.

El control biológico en el país es una alternativa propuesta a los productores desde hace varios años por la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFÉ), con su producto a base de *Trichoderma harzianum*, el cual ha sido una alternativa muy efectiva para la prevención de la roya. Asimismo, Barrera y Menjívar 2004 y Cuellar 2006 realizaron estudios sobre la reproducción de *Lecanicillium lecanii* en melaza; este último autor, a partir de sus resultados de 44.63% de reducción recomendó la utilización de este hiperparásito como alternativa biológica para el control de la roya del cafeto.

En El Salvador no se ha reportado la existencia de *Simplicillium lanosoniveum* como parte de la micobiota, por consiguiente, no se registran estudios enfocados en la aplicación de *Simplicillium lanosoniveum* en plantas de café para el control biológico de *Hemileia vastatrix* (roya).

Zare y Gams 2001, reportaron por primera vez al hongo *Simplicillium lanosoniveum* asociado a la roya del café, lo cual fue confirmado por los investigadores James *et al.* 2016, ya que estos caracterizaron mediante ADN hongos asociados a pústulas de roya de cafeto provenientes de México y Puerto Rico, en sus resultados determinaron quince micoparásitos de la roya, de los cuales los más abundantes se concentran en la familia Cordycipitaceae (*Simplicillium lanosoniveum* y *Lecanicillium* sp) y el orden Tremellales (*Bullera* sp. y *Kockovaella schimae*).

Ward *et al.* 2011, reportaron por primera vez la colonización de la roya de la soja (*Phakopsora pachyrhizi*) por el hongo *Simplicillium lanosoniveum*. Los resultados de este estudio demostraron que las hifas de *S. lanosoniveum* se enrollan alrededor de las uredosporas de la roya de soja y que únicamente se encuentran parasitando a los soros sin colonizar las superficies foliares.

Ward 2011, describió el proceso de colonización del soro de la roya de soja por *S. lanosoniveum*, indicando que las hifas de este hongo micofílico fueron observadas enrollándose alrededor de las uredosporas, pero estas fracasaron en colonizar las superficies sanas de las hojas. También indicó que las hifas de *S. lanosoniveum* penetraron las uredosporas en 24 horas y a los cinco días de asperjado el 90% de uredosporas fueron colonizadas. De acuerdo a los resultados la autora recomendó aplicar a la soja entre el momento de la infección inicial y el desarrollo de los síntomas. Esto lo constataron los investigadores Ward *et al.* 2014 en su estudio enfocado en las interacciones antagónicas entre *P. pachyrhizi* y *S. lanosoniveum*, en el cual determinaron que el micoparásito *S. lanosoniveum* penetra las uredosporas de la roya de soja dentro de las 24 horas después de la inoculación y a las 48 horas se da una colonización extensa de las mismas. Además, indicaron que las hifas del micoparásito erupcionaron de las uredosporas colonizadas a los 7 días después de la inoculación y hubo esporulación extensiva en la superficie de las uredosporas.

Baiswar 2014, realizó el primer estudio enfocado en la caracterización morfológica y molecular, mediante ADN ribosomal y análisis filogenético, de *Simplificillium lanosoniveum*, un hiperparásito aislado de las pústulas de roya de *Elaeagnus latifolia* (*Aecidium elaeagni-latifoliae*).

3.2 Origen y distribución geográfica del café.

De acuerdo con Anthony *et al.* 1999 el origen del cultivo del café arábico se dio en las tierras altas de Etiopía, esto lo confirma León 2000 quien menciona que en las áreas montañosas de este país y áreas vecinas de Sudán, actualmente el café Arábico crece en forma silvestre sobre los 1500 msnm. Según Smith 1985, el café arábico fue descubierto en el año 850 y se extendió de Etiopía a Yemen (Arabia del sur) en el siglo XI, siendo cultivado en Harar durante su ocupación por los árabes, después se extendió a La Meca y desde allí fue llevado a casa por los peregrinos a otras partes del mundo islámico. Hasta el siglo XV el cultivo se mantuvo como un monopolio de los árabes en las cercanías del mar Rojo, ya que a finales del siglo se dio una fuerte expansión hacia el Oriente Medio (Anthony *et al.* 1999).

En 1706 se introdujo el café a Europa, cuando una planta de café fue enviada desde Java al Jardín Botánico de Ámsterdam, donde se produjeron semillas y plántulas que fueron distribuidas a los principales jardines botánicos de Europa (Demel 1999). En 1714, envió el rey Luis XIV de Francia un cafeto al Jardín de Plantas de París, lugar donde se originaron la mayoría de las variedades cultivadas actualmente en el mundo (Chevalier y Dagron 1929, Carvalho 1946).

Al continente americano el café se introdujo en el siglo XVIII, debido a que enviaron plantas de café a Guyana Holandesa (hoy Surinam) desde Ámsterdam y de París a la isla de Martinica en las Antillas, de donde en 1719 el cultivo se extendió rápidamente hacia la Guyana Francesa, y luego en 1727 hacia Brasil (Chevalier y Dagron 1929). El cultivo del café se expandió a países como: Perú, Paraguay, Puerto Rico, Jamaica (1730), El Salvador (1740), Guatemala (1750-1760), Costa Rica (1779) y Honduras (1804) (Demel 1999). A finales del siglo XVIII e inicios del siglo XIX el cultivo se extendió por todo América tropical (Anthony *et al.* 1999; León 2000).

Según Cárdenas 2007, el cultivo de café en Yemen dio origen a dos tipos de café Árabe: *C. arabica* var. *Typica* (arabica), que constituyó la base genética de las primeras variedades cultivadas en América y Asia; y *C. arabica* var. *Bourbon* que fue difundido a partir de la isla Bourbon (Krug *et al.* 1939, Carvalho *et al.* 1969). Estas evidencias sobre el origen del cultivo de café en América Latina muestran una reducida base genética lo que explica los procesos de erosión genética (dos grupos genéticos) que dieron como consecuencia los cultivares actuales, los cuales son altamente susceptibles a nuevas plagas y enfermedades, presentan baja adaptabilidad a nuevas condiciones de cultivo y con posibilidades de mejoramiento genético altamente limitadas (Anthony *et al.* 2002).

3.3 Introducción e historia del café en El Salvador.

En El Salvador se introdujo el café en la época de la colonia, específicamente en 1740 llegó desde las islas del Caribe. En sus inicios no fue propagado con fines comerciales, sino más bien para consumo privado de un pequeño grupo de personas. La sustitución del añil por el café como principal producto de exportación se dio después del año 1880 (Guerra *et al.* 2005; López 2006).

El café se desarrolló primeramente en el extremo occidental, desde el centro de Santa Ana hacia los Municipios vecinos de Chalchuapa y Coatepeque, y posteriormente hacia algunos Municipios de menor altura (Izalco, Ahuachapán, Nahuizalco, Salcoatitán y Armenia) y finalmente hacia los terrenos baldíos más extensos del departamento de Ahuachapán (Guerra *et al.* 2005; López 2006; Urbina 2009).

La primera exportación de café salvadoreño se dio entre los años 1855-1856, en el cual se exportaron 904 quintales. El valor de las exportaciones de café y su participación en el total de las exportaciones del país se incrementó constantemente a partir de 1859, ya que en este año las exportaciones fueron de 18 mil pesos de plata, mientras que en 1862 éstas ascendieron a 53 mil pesos de plata, lo cual representó un incremento del 200 por ciento aproximadamente (Guerra *et al.* 2005).

Aunque el café se comenzó a expandir durante los años de la independencia centroamericana y de la federación centroamericana, no fue hasta la década de 1860 y 1870 que recibió un decidido apoyo de los gobernantes en turno. El primer presidente en fomentar este cultivo fue Gerardo Barrios, quien fue responsable de otorgar tierras baldías de Nueva San Salvador y Santa Tecla para sembrar café (Guerra *et al.* 2005).

A partir de 1945 el alza de los precios produjo un incentivo para el incremento de la producción de café, ya que en este año los ingresos de exportación subieron 26 millones de pesos, en 1950 incrementaron a 154 millones y en 1955 superó los 228 millones. En el periodo de 1971 a 1972 la producción fue de 3.6 millones de quintales que representó un incremento de casi el 34% con respecto a la obtenida en el periodo de 1961 a 1962 que fue equivalente a 16.94 quintales por manzana (PROCAFÉ 2014).

El desarrollo del cultivo de café en El Salvador, generó la acumulación originaria de capital y años más tarde impulsó el desarrollo de la infraestructura nacional, dio empleo a millones de personas y puso a El Salvador como referente mundial en la producción del cultivo. Sin embargo, también fue el punto de inflexión en el apareamiento de grandes brechas de desigualdad entre la población; brechas cuyo catalizador fue la estructura de la tenencia de la tierra y su distribución desigual (Chiquillo *et al.* 2013), lo cual se evidenció con los conflictos sociales que afectaron a la sociedad salvadoreña en el siglo XX (Urbina 2009).

En 1980 se aprobó la Reforma Agraria, acompañada de la nacionalización de la banca y el comercio exterior, la primera impactó en la producción al reducir las inversiones en las fincas y la segunda burocratizando los procesos de exportación y el sistema cambiario, coincidiendo todos estos factores con la tendencia declinante de los precios internacionales del café. Además el conflicto armado fue otro factor importante para la baja en la producción, esto lo demuestra la caída del PIB a nivel nacional a 42% en 1986, año en el que el conflicto se encontraba en plena ebullición. En la década de 1991 al 2000 las exportaciones se redujeron a 3.14 millones de quintales anuales debido a la disminución de los niveles de producción y en el periodo del 2001 al 2010 se redujeron a 1.78 millones de quintales anuales, lo que causó un impacto en la economía global del país con una reducción en los ingresos promedios de US\$ 90.32 millones anuales (PROCAFÉ 2014).

La importancia del café ha cambiado durante los últimos años, de ser la espina dorsal de nuestra economía ahora se ha convertido en el último bastión ecológico; es decir el café es la divisa ecológica de El Salvador, ya que tiene una gran importancia hidrológica debido a que resguarda las principales vertientes de cuencas hidrográficas y permite la infiltración de agua a los mantos acuíferos, además protege los suelos contra la erosión y contribuye a la fijación de dióxido de carbono, ya que mantienen una reserva de 32.2 millones de toneladas de carbono, con una fijación de 13,178 toneladas de bióxido de carbono por día; además permite la conservación de la biodiversidad en flora y fauna, albergando 209 especies de árboles nativos y 21 exóticos, 188 especies de aves, 31 especies de mamíferos, 26 especies de reptiles y 8 especies de anfibios (Rivas *et al.* 2011).

3.4 Clasificación taxonómica del café.

La clasificación taxonómica de la planta de café es la siguiente: Reino Plantae, clase Equisetopsida, orden Gentianales, familia Rubiaceae, género *Coffea* y especie *arabica* (Tabla 1) (Flora de Nicaragua 2017).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del café (*Coffea arabica*). Fuente: Flora de Nicaragua 2017.

Reino:	Plantae
Clase:	Equisetopsida
Subclase:	Magnoliidae
Super Orden:	Asteranae
Orden:	Gentianales
Familia:	Rubiaceae
Género:	<i>Coffea</i>
Especie:	<i>arabica</i> L.

3.5 Morfología del café.

Las características principales de la planta de café como su raíz, tallo, ramas, hojas, flores, frutos y semillas son particulares (Figura 1), por eso se detallan a continuación:



Figura 1. Morfología de una planta de *C. arabica*. Fuente: Hermann 1887.

- **Raíces:** la parte principal del sistema radicular de un árbol de café arábico se encuentra en la primera capa de 0,30 m de la superficie del suelo y se distribuye en un círculo de alrededor de 1,50 m de diámetro alrededor del tronco (Sáiz del Río *et al.* 1961; Inforzato y Reis 1973; Huxley *et al.* 1974; Alfonsi *et al.* 2005). El sistema radical está constituido por una raíz principal cónica y pivotante, su longitud máxima en una planta adulta es de 50 a 60 cm, de esta se derivan dos tipos de raíces de segundo orden, las cuales reciben el nombre de raíces axiales o de sostén y laterales, de estas últimas se desarrollan las raicillas, las cuales en un alto porcentaje de 80-90% se encuentran en los primeros 30 cm del suelo con un radio de 2 a 2.5. Las raicillas son muy importantes ya que le permiten a la planta la absorción de agua y nutrimentos a partir del suelo (Alvarado y Rojas 1994).

- **Tallo:** es leñoso, erecto y de longitud variable de acuerdo con el clima y tipo de suelo; en las variedades comerciales varía entre 2 y 5 m de altura. En una planta adulta, la parte inferior es cilíndrica, mientras que la parte superior, es cuadrangular y verde, con las esquinas redondas y salidas. Está formado por un eje central en cuyo extremo hay una zona de crecimiento llamada comúnmente “yema terminal”, presenta la particularidad de producir tres tipos de yemas que originan diferentes partes de la planta: el tallo, bandolas y hojas (Alvarado y Rojas 1994).

- **Ramas:** conocidas también como ramas laterales o ramas primarias, éstas son opuestas y alternas y dan origen a las ramas secundarias, constituyendo las crinolinias o palmillas (Alvarado y Rojas 1994; Alvarado *et al.* 2004). Las ramas laterales tienen un punto apical de crecimiento que forma nuevas hojas y entrenudos, el número de estos puede variar de un año a otro, consecuentemente, las axilas que se forman dan origen al número de flores y por ende a los frutos (Alvarado y Rojas 1994).

- **Hojas:** la lámina de la hoja mide de 12 a 24 cm de largo por 5 a 12 cm de ancho, variando su forma de elíptica a lanceolada. Las hojas se caracterizan por tener color verde oscuro brillante en la cara superior y verde claro opaco en la inferior, y el número de hojas varía principalmente de acuerdo a la variedad, cantidad de sombra en el cafetal, estado fitosanitario, edad y densidad de siembra en la plantación (Alvarado y Rojas 1994; Alvarado *et al.* 2004).

- **Flor:** esta se forma en los vértices (axiales) de los laterales, en las axilas de las hojas se presenta las yemas florales de 1 a 3 ejes, los cuales se dividen en 2 o 6 ramificaciones cortas de 2 a 4 mm coronando cada una en una flor de color blanco, la cual está formada por el cáliz, corola, estambres y pistilo. Las flores poseen un ovario supero con dos óvulos, un cáliz poco desarrollado el cual se encuentra asentado en la base de la flor, la corona es un tubo largo que en su base presenta forma cilíndrica y mide de 6 a 12 mm, cinco estambres o filamentos finos de color blanco que se encuentran insertos en el tubo de la corola alternados con cinco pétalos, los cuales sostienen anteras largas que se abren longitudinalmente cuando están maduras para liberar el polen (Alvarado y Rojas 1994; Alvarado *et al.* 2004).

Las flores del café están influenciados por la luz solar, agua, temperatura, reguladores de crecimiento vegetal (hormonas), balance nutricional y condiciones fitosanitarias de la planta (Alvarado y Rojas 1994; Alvarado *et al.* 2004).

- **Fruto:** después de la fecundación del ovario la flor se trasforma en fruto y sus dos óvulos en semillas. Este fruto es una drupa elipsoidal de superficie lisa y brillante ligeramente aplanada de color rojo o amarillo y con una pulpa delgada, cuyos tres ejes principales miden entre 12 y 18 mm de longitud, 8 y 14 mm de ancho y 7 y 10 mm de espesor (Alvarado y Rojas 1994).
- **La semilla:** es elíptica, plano-convexa, que posee un surco longitudinal en la superficie plana (Dedecca 1957). La cubierta exterior de la semilla está formada por un endocarpio duro de color marrón pálido, que se convierte en el "pergamino" después del secado, el cual contiene una semilla cerrada, que tiene una testa delgada, verde (Mendes 1941). Las semillas de *Coffea arabica* miden de 10 a 18 mm de largo y de 6,5 a 9,5 mm de ancho (Dedecca 1957).

3.6 Fisiología del café.

Según Cannell 1985, los procesos fundamentales de una planta de café comprenden desde la germinación de las semillas, modo de crecimiento, fotosíntesis, comportamiento de estomas, la formación de tejido vegetativo hasta la florecida, dichos procesos se detallan a continuación:

- a) **Germinación de semillas.** Para germinar la semilla tarda aproximadamente siete días, aunque este tiempo puede ser mayor, dependiendo de las condiciones de humedad del medio o de la humedad intrínseca de la semilla, ya que para romper el endosperma y el pergamino, el embrión necesita de agua. Cuando la semilla se encuentra en condiciones óptimas para su desarrollo, las células del embrión se multiplican produciendo la elongación de la radícula que rompe los tejidos del endosperma y el crecimiento del hipocótilo. Para emerger del semillero, la plántula tarda de 30 a 45 días después de la siembra; permanece en dicho lugar 80 ó 90 días y durante este periodo vive de sus reservas alimenticias (Instituto Salvadoreño de Investigaciones del Café (ISIC) 1983).

- b) **Modo de crecimiento.** Las plantas de café que se siembran directamente al suelo en viveros tienen mayor oportunidad de vigorizarse por tener un mayor desarrollo radical que permite una mejor absorción de nutrientes. En cambio, en el trasplante del vivero al campo la planta sufre una disminución significativa de sus procesos fisiológicos, lo cual repercute en su crecimiento, estableciéndose dos o tres semanas después. El crecimiento ortotrópico proporciona la altura de la planta y el plagiotrópico el desarrollo de las bandolas, dichos tipos de crecimiento están influenciados por el régimen hídrico, el suelo, la variedad y el fotoperiodismo, este último influye durante el desarrollo de la planta, ya que existen periodos de crecimientos altos y bajos que coinciden con los meses de marzo a septiembre (mayor crecimiento) y octubre y febrero (menor crecimiento) (ISIC 1983).

En los cafetos, la producción de auxinas (hormonas en crecimiento) por la yema terminal es probablemente la causa de la inhibición de las yemas accesorias, por ello si se decapitan disminuye la concentración de auxinas en el tallo principal a un nivel lo suficientemente bajo como para estimular el crecimiento de estas yemas. Es

importante la estimulación de dichas yemas debido a que dan lugar a ramas secundarias y terciarias lo cual compensa en cierto grado el efecto de la edad, ya que la cosecha se muere continuamente hacia el extremo de las ramas y el tallo dejando atrás un número cada vez mayor de nudos improductivos y defoliados y el número de nudos productivos tiende a ser progresivamente menor conforme se elonga la rama debido a una translocación limitada de agua y nutrimentos a lugares distantes (Cannell 1985).

- c) **Fotosíntesis.** La parte de fotosintatos más dominante del café es el fruto, ya que durante la florecida y fructificación los fotosintatos son dirigidos con prioridad a las flores y frutos; por ello, las plantas bajo sombra producen menos flores y frutos pues la iniciación de las yemas florales es dependiendo de la luz. Los cafetos expuestos al sol producen más porque la fotosíntesis es mayor debido a que hay mayor cantidad de estomas por hoja. Las temperaturas mayores de 90 °F inhiben la fotosíntesis en las hojas totalmente expuestas a la luz.

En general la actividad fotosintética del café es baja comparada con otras especies vegetales, lo que sugiere ser un factor limitante de la capacidad de producción de la planta y la hace más susceptible a disturbios fisiológicos.

- d) **Comportamiento de estomas.** Estas estructuras permiten el intercambio de gases entre la hoja y el medio ambiente. Los estomas se presentan solamente en la epidermis inferior de las hojas y el número de estos en cada hoja varía proporcionalmente con la intensidad luminosa; es decir, las hojas bajo sombra poseen de 10-17 mil estomas por hoja en cambio las hojas expuestas al sol generalmente tienen entre 300 a 680 mil estomas por hoja.

Los estomas en el café permanecen abiertos durante el día y cerrados durante la noche aunque el rocío puede inducir apertura parcial durante la noche. La Luz intensa causa cierre parcial de los estomas y en hojas parcialmente sombreadas se mantienen completamente abiertos durante casi todo el día.

- e) **Formación de tejido vegetativo.** En años de alta producción la cantidad de tejido vegetativo que se forma es baja debido a que los fotosintatos van dirigidos al desarrollo del fruto, lo que ocasiona una disminución en la cosecha del próximo año.

En cambio en años de baja cosecha se estimula el crecimiento del tejido vegetativo y como consecuencia una buena cosecha el año siguiente.

- f) **Florecida.** El cafeto es una planta de día corto (fotoperiódica), ya que cuando la longitud del día es mayor de 13 o menor de 8 horas la planta no florece. Las yemas florales del cafeto crecen lentamente, máximo alcanzan un tamaño de 6 a 8 mm, y luego cesan de crecer por varias semanas y hasta meses. Posteriormente con la lluvia subsiguiente a un periodo seco inducen la antesis de muchas yemas de 8 a 10 días después, de lo contrario la yema se mantiene en estado latente. Las altas temperaturas dan origen a flores anormales y la intensidad luminosa baja afecta la florecida, ya que no estimula la iniciación de yemas florales.

3.7 Factores ecológicos que influyen en el cultivo del café.

En todas las plantas, los procesos fisiológicos son fundamentales para el desarrollo de las mismas pero estos dependen en gran medida de los factores ecológicos. La planta de café requiere de una temperatura, luminosidad, humedad relativa, vientos, precipitación y tipo de suelo idóneos para un buen crecimiento y desarrollo, dichos factores se detallan a continuación:

- **Temperatura.** Para el cafeto la temperatura media anual óptima varía según las especies, el rango general es de 23 a 27 grados centígrados, con extremos de 15°C a 30°C. La especie *Coffea arabica* crece y se desarrolla mejor bajo temperaturas que fluctúan entre los 60 a 75°F, siendo esta última la ideal para el cultivo. El efecto de este factor está íntimamente relacionado con el crecimiento vegetativo, ya que se estima que temperaturas mayores de 30°C estimulan el crecimiento espontáneo de las yemas accesorias, en tanto que la floración y fructificación se reducen significativamente, y del tallo principal originando plantas de tallos múltiples. En cambio, las temperaturas menores a 16°C o 13°C originan el crecimiento lento provocando que el arbusto alcance poco tamaño, además de originar clorosis foliar (ISIC 1983; Alvarado y Rojas 1994).

- **Precipitación.** El cafeto prospera en las regiones donde las precipitaciones alcanzan los 1,500 a 2,000 ml por año, con una distribución que permita una época lluviosa y una estación seca (ISIC 1983). La precipitación es un factor importante que tiene un efecto significativo en la fotosíntesis, la floración, en la producción y en la nutrición del arbusto de café (Alvarado and Rojas 1994). La influencia del agua incide grandemente en el desarrollo de la planta ya sea por déficit o exceso, en el primer caso los efectos producen la paralización del crecimiento, la reducción de yemas por glomérulo, la reducción de nudos productivos para la cosecha del próximo año, clorosis en las hojas, defoliación intensa y los frutos no alcanzan su madurez fisiológica. En cambio, el exceso de lluvia atenúa el crecimiento y provoca la caída de frutos debido a que se produce una aireación pobre del suelo con detrimento del desarrollo de raíces (ISIC 1983).

- **Humedad relativa.** El arbusto de café crece mejor bajo condiciones de alta humedad relativa, el porcentaje anual óptimo varía según las especies pero el rango general es de 70% a 85%, sin embargo el promedio de humedad relativa recomendable para *C. arabica* es de 70 a 95%. La cantidad de vapor de agua existente en la atmosfera influye significativamente en el cafeto, ya que gran parte de su transpiración está en función de este factor, ya que ayuda a fraccionar o disipar los rayos solares sirviendo como filtro, los cuales determinan las aperturas y cierres de los estomas. Si la humedad relativa excede el promedio se afecta la calidad del café y se favorece la incidencia de enfermedades (ISIC 1983).

- **Vientos.** Los vientos con velocidad excesiva perjudican al cafeto por la caída de ramas, hojas y frutos, pero también es afectado fisiológicamente si los vientos son secos y calientes, provocan una marchitez y resecamiento de las hojas y brotes jóvenes, deteniéndose el crecimiento; esto es debido al desequilibrio hídrico creado por una intensa transpiración. Además los vientos prolongados aumentan las posibilidades del ataque de enfermedades y forman huecos en la sección del suelo próxima a los troncos de los cafetos, lesionándolos y causando rotura de raíces, esto hace que los árboles pierdan anclaje y área de absorción por agua y nutrientes (ISIC 1983).

- **Luminosidad.** El cafeto se considera una planta de día corto por lo que necesita de 8 a 13 horas de iluminación para florecer (Alvarado y Rojas 1994). La alta intensidad lumínica favorece al desarrollo del cafeto, ya que aumenta la altura de la planta, el número de ramas laterales, el número de hojas, el peso seco de la raíz y el diámetro del tallo. El crecimiento y floración son afectados por la duración del día, ya que los días cortos tienen efectos inhibidores en el crecimiento de ramas laterales y los días largos aumenta el diámetro total de la planta (Cannell 1985).

En las condiciones de El Salvador, la necesidad de sombra se acentúa grandemente en aquellas zonas debajo de los 1,000 metros sobre el nivel del mar, en donde por lo general, los días son más soleados y las sequías son más frecuentes y prolongadas en las épocas de transición de la estación seca a lluviosa (abril - mayo). Por esta razón, es frecuente observar una defoliación marcada en cafetales de media altura y bajo que presentan un pobre sombreado. La sombra excesiva, por permitir una pobre iluminación, influye grandemente en la baja producción de cafetal (ISIC 1983).

- **Suelo.** Es el medio de sostén de la planta que ejerce una gran influencia en el desarrollo de la misma debido a que le proporciona los nutrientes necesarios para su desarrollo. El cultivo requiere suelos fértiles, profundos, de buen desagüe, preferiblemente arcillosos a sueltos y arenosos, ya que este último retiene poca humedad; sin embargo, los suelos más adecuados son los de origen lateríticos o volcánicos, ya que el pH es ligeramente ácido. El pH adecuado para el crecimiento del cafeto fluctúa entre 5.5 a 6.5 en la escala, cuando los suelos son muy ácidos u alcalinos no se observa el desarrollo normal esperado (ISIC 1983).

3.8 Variedades de café en El Salvador.

De acuerdo a PROCAFÉ 2014, las principales variedades de *Coffea arabica* en El Salvador son: Bourbon y Pacas.

- a. **Bourbón**, comprende el 52.2 % del área total de café cultivado en el país, es una variedad mejorada llamada Tekisic, palabra nahuatl que se compone de los vocablos tekiti que significa trabajo e isic, que son las siglas del Instituto Salvadoreño de

Investigaciones del Café. Esta variedad proviene del proceso de selección de la variedad Bourbon tradicional, la cual fue comercializada a partir del año 1976 por sus características ideales de producción y calidad de taza (PROCAFÉ 2006).

Las principales características de la variedad Bourbon mejorado son: su tamaño promedio es de aproximadamente 3 metros, las bandolas (ramas) forman un ángulo de 45 grados con el eje principal lo que proporciona al arbusto una forma ligeramente cónica, abundantes laterales y entrenudos largos, tallo flexible, hojas medianas y terminales de color verde tierno, fruto grande de color rojo y de maduración temprana y homogénea en relación a las variedades de porte bajo, la arquitectura es abierta por lo que debe cultivarse a mayor distanciamiento y menor cantidad de plantas por manzana, el cultivo tiene mayor producción entre 900 y 1500 msnm y el rendimiento en condiciones óptimas varían entre 41 y 55 quintales oro uva y mz (PROCAFÉ 2006). En El Salvador, las altitudes de siembra en donde expresa y aprovecha al máximo su capacidad productiva es arriba de los 1000 msnm, siendo posible cultivarlo desde los 800 msnm (Alvarado *et al.* 2004).

- b. Pacas**, proveniente de una mutación del Bourbon tradicional y representa el 33.4% del área total de café cultivado en el país, las principales características de esta variedad son: porte bajo, ramas laterales que forman un ángulo de 45 grados, follaje abundante, hojas de color verde oscuro con brillo y ligeramente consistentes, entrenudos cortos que le dan un aspecto compacto, tolerancia a los problemas de sequía, viento y sol. Su rendimiento promedio en condiciones óptimas varía de 24 a 55 quintales oro uva por manzana (PROCAFÉ 2014).

3.9 Enfermedades que afectan el cultivo de café.

La presencia y severidad de una enfermedad es el producto de las interacciones entre un ambiente favorable, un hospedero susceptible, un parásito agresivo y la intervención del productor (Zadoks y Schein 1979). Entre las prácticas del productor, el manejo de la sombra es especialmente importante en el cultivo del café, ya que muchas de las enfermedades son favorecidas por esta; sin embargo la sombra puede contribuir a la reducción de otras enfermedades. Las enfermedades del café que son favorecidas por la

sombra para su desarrollo son: el ojo de gallo (*Mycena citricolor*) y el mal de hilachas causado por *Corticium koleroga*. En cambio las siguientes enfermedades se ven desfavorecidas por la sombra: la mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*), reduce su proliferación debido a que está relacionada con deficiencias nutricionales más frecuentes al sol, y el derrite causado por *Phoma costarricensis* (López 2010).

El efecto de la radiación puede manifestarse aún dentro de la misma planta de café; la roya (*Hemileia vastatrix*) prospera mejor en las ramas inferiores, donde hay menos luz, así como más inóculo residual (Avelino *et al.* 1991). Al contrario, la mancha de hierro se desarrolla mejor en ramas altas que reciben mayor cantidad de radiación. Los hongos que causan antracnosis (*Colletotrichum spp*) se adaptan tanto a condiciones sombreadas como a pleno sol (López 2010).

Las enfermedades causadas por hongos que, de acuerdo a Orozco 2003 y López 2010, se han reportado para el cultivo de café son: antracnosis y mancha mantecosa, roya, cercospora, mancha de phoma, mancha de ascochyta, ojo de gallo, hilachas, mancha de hierro, el derrite y la enfermedad de la baya del café (Tabla 2).

Tabla 2. Enfermedades causadas por hongos reportadas para el cafeto. Fuente: Orozco 2003; López 2010.

Enfermedades del cafeto	
Nombre común	Nombre científico del hongo causante
Enfermedad de la baya del café.	<i>Colletotrichum kahawae</i>
Antracnosis y mancha mantecosa	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
Roya	<i>Hemileia vastatrix</i>
Cercospora	<i>Cercospora spp.</i>
Mancha de phoma	<i>Phoma spp.</i>
Mancha de ascochyta	<i>Ascochyta spp.</i>
Ojo de gallo	<i>Mycena citricolor</i>
Hilachas	<i>Corticium kolerogal</i>
Mancha de hierro	<i>Cercospora coffeicola</i>
El derrite	<i>Phoma costarricensis</i>
Podredumbre negra de la raíz	<i>Rosellinia sp</i>

En El Salvador la enfermedad que más afecta el parque cafetalero es la roya, ya que el 88.1% del área cultivada son variedades susceptibles a la misma, otra enfermedad causada por hongos que afecta al 32.9% del área cultivada es la antracnosis lo que la

ubica como la segunda enfermedad más frecuente en los cafetales. Otras enfermedades menos frecuentes que generan daños en los cafetales del país son: el derrite, cercospora, ojo de gallo y podredumbre negra de la raíz (PROCAFÉ 2014).

3.10 Origen de la roya del cafeto.

La roya anaranjada del cafeto fue reportada formalmente por primera vez a principios de 1869 en una plantación de la isla asiática de Ceilán, hoy Sri Lanka. En ese mismo año, el micólogo británico Berkeley describió y nombró al hongo, responsable de la enfermedad, como *Hemileia vastatrix*. La repentina aparición de la enfermedad y su rápida expansión en una región tan alejada de los centros de origen y de diversificación del cafeto, localizados en África central y África oriental, desató una gran polémica sobre el origen de ésta ya que lo esperado hubiera sido que el hongo se detectara primero en África, pues los centros de origen de un hospedero y sus patógenos suelen coincidir (Leppik, 1970).

La coexistencia entre una planta y un hongo conduce normalmente a una coevolución de ambos, la cual se traduce por la expresión de una gran variabilidad genética en cuanto a la resistencia de la planta hacia el hongo y en cuanto a la virulencia del hongo hacia la planta (Avelino *et al.* 1999; Avelino y Rivas 2013). Por ello, La hipótesis más verosímil es que la roya anaranjada fue introducida a Ceilán desde África del Este, en forma accidental a través de plantas infectadas (Butler 1918), siguiendo la expansión imperial británica, la cual facilitó el movimiento de personas y bienes, y por consiguiente de plantas y sus patógenos. Al llegar a Ceilán, la enfermedad encontró condiciones propicias para su desarrollo, tanto de clima como de sistema de cultivo. La isla está, en efecto, bajo el régimen de lluvias monzónicas, lluvias abundantes que favorecen varios procesos de la enfermedad. Los colonos Europeos habían establecido plantaciones homogéneas con materiales susceptibles, a pleno sol, propiciando altas producciones, otro factor que favorece la enfermedad. Finalmente, pocas opciones de control químico estaban disponibles en esa época, ya que las propiedades fungicidas del caldo Bordelés no fueron documentados sino hasta 1885, o sea 16 años después del primer reporte de la roya anaranjada en Ceilán (Avelino *et al.* 1999; Avelino y Rivas 2013).

La gran resistencia del cafeto hacia la roya anaranjada observada especialmente en los cafetales silvestres de Etiopía demuestra que el origen de la enfermedad fue efectivamente en África (Avelino *et al.* 1999; Avelino y Rivas 2013). Por ello, el primer reporte sobre el hongo pudo haber sido hecho antes del famoso capítulo de Ceilán, en 1861 por un explorador británico, el cual notó la enfermedad sobre cafetos que se encontraban al estado silvestre en la región del lago Victoria, en África del Este (Wellman 1952). En esta zona, las especies de café más susceptibles eran naturalmente raras, lo que explica que durante muchos años el hongo pudiera pasar prácticamente desapercibido (Saccas y Charpentier 1971).

3.11 Introducción e historia de la roya en América.

La primera aparición de la roya fue en Suramérica específicamente en Brasil en el año 1970, existen dos hipótesis que explican la presencia de este hongo en América, la primera fue propuesta por Bowden *et al.* 1971, sugiere que las uredosporas del hongo fueron transportadas por los vientos alisios desde África del Oeste hasta Brasil. Sin embargo la segunda hipótesis sugiere que la enfermedad fue introducida accidentalmente a través de material vegetal o de ropas contaminados (Waller 1972). En el año 1976 llegó a Centro América específicamente a Nicaragua (Schuppener *et al.* 1977; Avelino *et al.* 1999; Corrales 2013), luego se expandió en toda la región: El Salvador 1979; Honduras y Guatemala 1980 y Costa Rica 1983 (Avelino *et al.* 1999; Avelino y Rivas 2013).

La llegada de la roya anaranjada a América suscitó una gran preocupación, ya que todas las variedades de Arábica cultivadas en América Latina eran susceptibles a la roya anaranjada (Avelino *et al.* 1999; Avelino y Rivas 2013). La primera reacción cuando la roya anaranjada llegó a Brasil, Nicaragua y México, fue de tratar de erradicar la enfermedad apoyándose en las experiencias de Nueva Guinea donde se habían logrado tres erradicaciones, aunque solamente temporales, en 1892, 1903 y 1965, hasta el año 1986 cuando la enfermedad se estableció definitivamente (Shaw 1968). Ninguno de estos intentos fue exitoso, por eso se abandonaron, ya que el progreso de la roya anaranjada era imparable, debido a su gran capacidad de dispersión a larga distancia (Avelino *et al.* 1999; Avelino y Rivas 2013).

La zona centroamericana ha logrado convivir con la roya anaranjada a través del uso de fungicidas, de la siembra de variedades resistentes (especialmente en Honduras) y de la aplicación de técnicas que incrementaron la productividad, compensando así los costos y las pérdidas de producción relacionadas con la roya anaranjada (McCook, 2009). No obstante, en el año 2012 se desató la epidemia de roya anaranjada más grave de la región (Cressey 2013) aunque ésta no fue la primera epidemia grave desde la introducción de la enfermedad a la región. En 1989-1990, se dio por ejemplo una epidemia severa en Costa Rica, otra en Nicaragua en 1995-1996 y en El Salvador en el 2002-2003 (McCook, 2009).

3.12 Clasificación taxonómica de la roya del café.

La roya es un hongo que pertenece al reino Fungi, al phylum Basidiomycota, al subphylum Pucciniomycotina, a la clase Pucciniomycetes, al orden Pucciniales, al género *Hemileia* y a la especie *vastatrix* (Tabla 3) (SENASICA 2016).

Tabla 3. Clasificación taxonómica de la roya del café (*Hemileia vastatrix*). Fuente: SENASICA 2016.

Reino	Fungi
Phylum	Basidiomycota
Subphylum	Pucciniomycotina
Clase	Pucciniomycetes
Orden	Pucciniales
Género	<i>Hemileia</i>
Especie	<i>vastatrix</i>

Los estudios realizados con *H. vastatrix* han permitido demostrar que el hongo ha evolucionado y desarrollado variantes genéticas (razas del hongo), las cuales atacan de forma diferenciada a las especies y variedades de café, dependiendo de los genes de resistencia de la planta y de los genes de virulencia del hongo (Cristancho 2011). En Centroamérica, la presencia de nuevas razas de roya del café es limitada, este comportamiento se explica porque desde el ingreso de la roya del café a Nicaragua en

1976 y su posterior dispersión por el resto de países, se identificó que la mayor parte del área sembrada de café contenía variedades susceptibles a la raza II, pero desde 1997 se reportó una nueva raza en Honduras (raza I; v2 y 5) en muestras recolectadas en la región del lago de Yojoa; y posteriormente esta misma raza también fue reportada en El Salvador (Avelino *et al.* 1999). En el 2013, los análisis realizados por el CIFIC de muestras de roya del café recolectadas en Costa Rica revelaron la presencia de las razas XXIV (v2, 4 y 5) y XXXVI (v2, 4, 5 y 8) (Várzea 2013).

3.13 Morfología de la roya del cafeto.

El micelio de *Hemileia vastatrix* se encuentra completamente dentro del mesófilo y consiste de hifas hialinas en abundancia, de aspecto tortuoso y frecuentemente ramificado en forma muy irregular; el diámetro de las hifas es bastante uniforme y oscila entre 5 y 6 μ m. Presenta septas que están separadas a veces por intervalos grandes, especialmente en las hifas que crecen rápidamente. Algunas veces el contenido de las hifas tiene una coloración anaranjada rojiza (Subero 2005).

Las hifas crecen entre las células del mesófilo y penetran en ellas mediante ramificaciones cortas, filiformes, que terminan en expansiones ovoides, reniformes o un poco irregulares, miden entre 7 a 8 x 4.5 μ m, contienen citoplasma denso con uno a dos gránulos refringentes. Estas expansiones constituyen los haustorios y sirven probablemente como órganos de absorción de alimentos. El micelio del hongo es más abundante en el parénquima esponjoso de la hoja. En las variedades más susceptibles, el micelio tiende a penetrar el tejido de empalizada y hasta puede enviar haustorios a las células de la epidermis superior (Subero 2005).

Las hifas forman unas masas entrelazadas de micelio en las cavidades subestomáticas. De estas masas crece un fascículo de filamentos finos llamados “esterigmas”, que emergen a través de los estomas, dando lugar a las esporas. Las esporas son de tamaño microscópico (30 μ de largo X 20 μ de ancho) de forma reniforme, lisas en la cara interna y rugosa en la externa (Figura 2), denominadas uredosporas, que son producidas en grandes cantidades y corresponden al polvillo amarillo o naranja que se visualiza en el envés de las hojas de café y que es característico de esta enfermedad. La forma de las uredosporas maduras varía según su posición en el haz de estas estructuras.

Generalmente son angostas y triangular-redondeadas en un corte transversal. Las teliosporas, cuya ocurrencia es muy baja, son de forma redondeada de un tamaño de 20 a 25 μ (Subero 2005; SENASICA 2013).

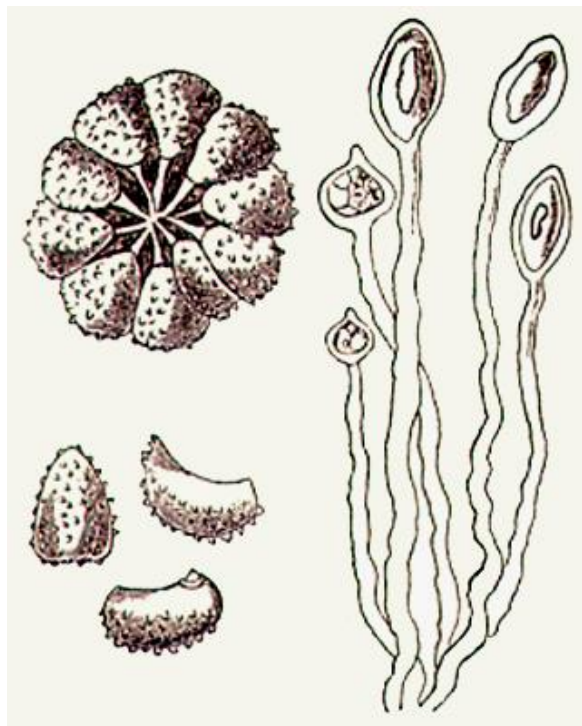


Figura 2. Uredosporas de *Hemileia vastatrix*. Fuente: Gardeners' Chronicle 1869.

3.14 Ciclo de vida de la roya del café.

El ciclo biológico de *Hemileia vastatrix*, según Rivillas *et al.* 2011 y Avelino y Rivas 2013, está comprendido por cuatro etapas, las cuales son: diseminación, germinación, colonización y reproducción (Figura 3).

- **Etapas de diseminación**, se realiza a través de esporas microscópicas llamadas uredosporas. Esta etapa se divide en una fase de liberación y una fase de dispersión, en la primera la uredospora se despegas del esporóforo y en la segunda la espora abandona la lesión, y se deposita sobre otra hoja y que al producirse en abundantes cantidades originan el polvo amarillo o naranja que se observa en la cara inferior de la hoja y que es característico de la enfermedad.

- **Etapa de germinación**, esta etapa marca el inicio del proceso infeccioso, ya que la infección todavía no está realmente establecida. Esta etapa es el proceso en el cual una vez que la espora se ha depositado en el envés de la hoja emite de uno a cuatro tubos germinativos, en un tiempo de 6 a 12 horas, los cuales crecen hasta encontrar los estomas. Durante esta etapa, el hongo necesita agua, la nula o poca presencia de luz, y temperaturas inferiores a 28°C y superiores a 16°C.

- **Etapa de colonización**, la penetración del hongo por los estomas de la hoja constituye el inicio de la tercera etapa en la cual, por primera vez, se establecen relaciones tróficas entre el hongo y el hospedero. El hongo desarrolla unas estructuras denominadas haustorios, los cuales se encargan de ponerse en contacto con las células de la planta, y con los que extraen los nutrientes para su crecimiento. La colonización de la hoja por las hifas lleva a la formación de los primeros síntomas visuales. Las células parasitadas de la hoja pierden su coloración verde y, es ahí donde se observan zonas cloróticas o amarillentas, generando la aparición de los síntomas de la enfermedad. El periodo comprendido entre el inicio de la germinación y la expresión de los primeros síntomas (lesiones amarillentas) constituye el periodo de incubación, el cual tiene poca importancia del punto de vista epidemiológico, ya que en esta etapa todavía no se ha producido ninguna entidad infecciosa nueva.

- **Etapa de reproducción**, la emergencia posterior del esporóforo y la producción de nuevas uredosporas infecciosas constituyen la etapa de la esporulación. Luego de haber pasado 30 días, después de la colonización, el hongo está completamente maduro como para diferenciarse en estructuras llamadas soros, que son las encargadas de producir nuevas uredosporas, a razón de 1.600 por milímetro cuadrado (mm²) de hoja, por un período de 4 a 5 meses, y que serán dispersadas para iniciar el nuevo ciclo. El tiempo que pasa desde la infección hasta la producción de esporas se denomina período de latencia.

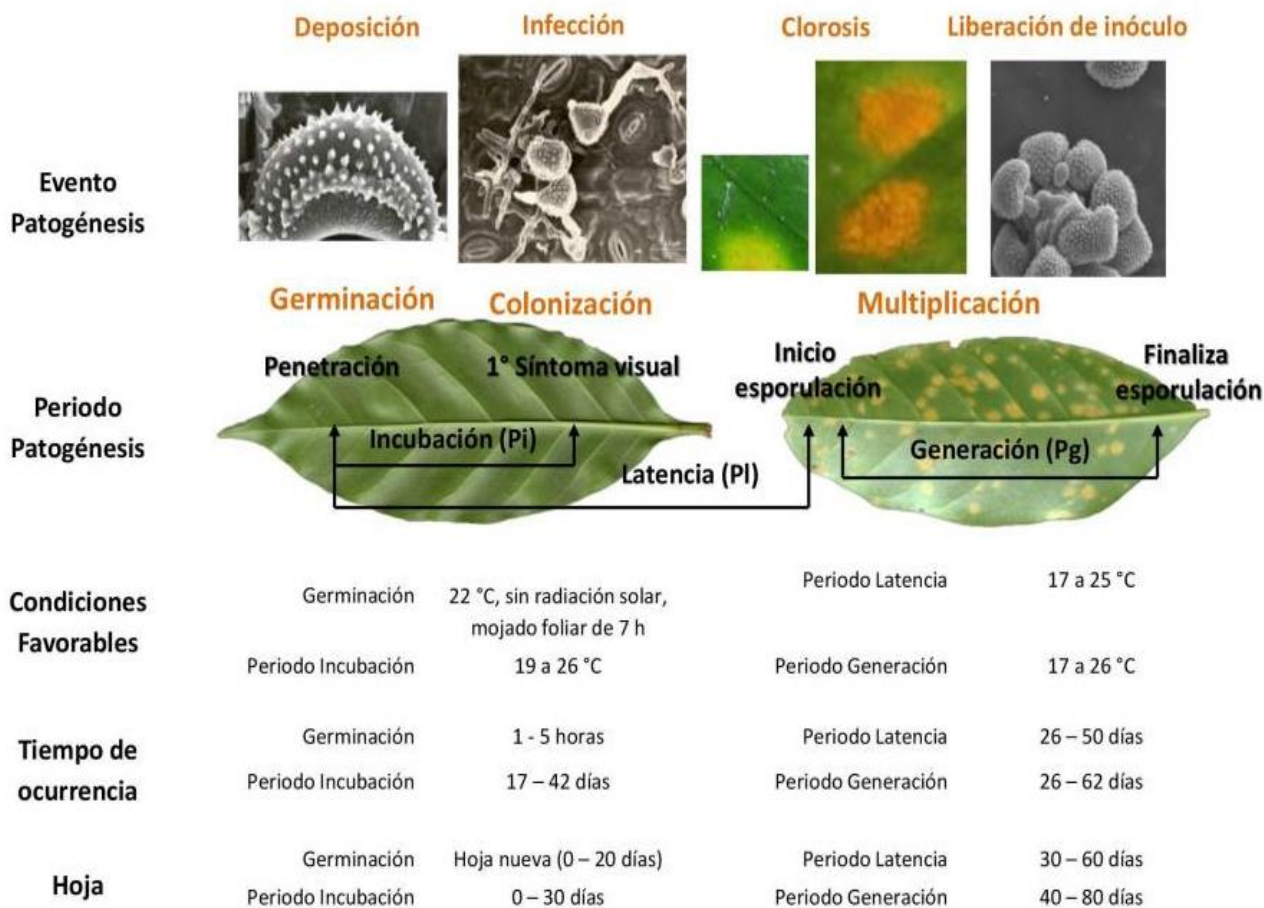


Figura 3. Ciclo de vida de la roya del café. Fuente: SENASICA 2013.

3.15 Sintomatología de la roya.

La enfermedad se caracteriza por presentar pequeñas manchas redondeadas y polvorientas en el envés de las hojas (Subero 2005). Inicialmente, las manchas son de color amarillo claro que luego se vuelven de color anaranjado; y a medida que la enfermedad avanza se visualizan manchas amarillentas en la superficie del haz de la hoja (Fischersworing y RoBKamp 2001).

El área afectada por una sola infección tiene un diámetro de aproximadamente 3 mm, pero gradualmente aumenta el tamaño hasta 2 cm o más (Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP) 1984), y la cual tiende a unirse con otras infecciones para formar una lesión más o menos irregular que a veces puede abarcar gran parte de la superficie foliar (Subero 2005).

En los estados muy tempranos se nota sólo una mancha pálida, amarillenta, en el envés de la hoja. Uno o dos días después de su aparición, la mancha toma un color anaranjado y cuando esta envejece, su centro muere, y se torna marrón oscuro y se seca, pero en algunas ocasiones la pérdida del color amarillento-anaranjado típico de las esporas

puede acelerarse con la presencia de un hongo blancuzco, parasítico, conocido como *Lecanicillium* (*Verticillium*). La formación de esporas en las áreas muertas cesa y con frecuencia las esporas presentes tienden a volverse grisáceas, antes de que el tejido foliar se torne marrón, pero el porcentaje de esporas con contenido hialino aumenta hacia el centro de la lesión y la pérdida de color no se debe necesariamente al envejecimiento de las esporas *in situ*, ya que al ser removidas puede producirse una nueva generación de esporas hialinas. Pero, a veces en etapas avanzadas del ataque, cerca del margen, sobreviven áreas amarillento-anaranjadas portadoras de esporas (Subero 2005).

Las lesiones comúnmente pueden ser limitadas por la nervadura principal y con menos frecuencia por una vena lateral, pero a veces estas barreras apenas retardan la expansión de una lesión o tienen poco efecto. La apariencia exacta de una lesión puede variar de acuerdo con la variedad del café y su susceptibilidad (Subero 2005).

Cuando hay áreas grandes de la hoja infectada por la enfermedad, las áreas adyacentes, no infectadas, también pueden secarse y morir, afectando con frecuencia la hoja entera. Aun cuando sólo haya unas pocas lesiones, la hoja a menudo se reduce mucho y puede caerse a temprana edad. Como consecuencia de esto y de la abscisión de hojas muy atacadas, un árbol afectado severamente puede perder gran parte de su follaje, lo que a su vez puede conducir a una muerte descendente más o menos pronunciada de sus ramas. Este efecto depende del clima en ese momento, de la cosecha que produce el árbol y de la reserva de carbohidratos (Subero 2005).

Los daños severos, mayores al 60%, además de provocar pérdida del follaje también puede afectar considerablemente el rendimiento de la producción de café, si la infección ocurre en etapas tempranas se puede presentar una reducción en el rendimiento. Sin embargo, si la infección se presenta en etapas tardías el efecto se observará en los niveles de amarre del fruto del siguiente ciclo de cultivo (Subero 2005; Castro *et al.* 2009).

3.16 Patogénesis de la roya.

El progreso de la enfermedad causada por *H. Vastatrix* en la planta de café, según Rivillas *et al.* 2011 y Barquero 2013, permite establecer tres etapas de la infección:

- **Primera etapa: crecimiento lento.**

Esta etapa se caracteriza por un aumento lento de la enfermedad, casi imperceptible, que coincide con el inicio del periodo de lluvias y con el crecimiento vegetativo del café. El inóculo residual de la roya que se encuentra en el tejido infectado permaneció en la planta luego de la época seca y apenas inicia la producción de esporas por lo que el surgimiento de nuevas manchas en hojas sanas es lento. Durante esta fase las infecciones solo se aprecian en menos del 10% de las hojas en la planta.

- **Segunda etapa: crecimiento acelerado.**

En esta etapa los cambios en la cantidad de la enfermedad de un mes a otro son muy rápidos, pero depende en gran medida de la cantidad de enfermedad desarrollada en la primera etapa y de las condiciones climáticas existentes. El crecimiento acelerado ocurre a partir de una incidencia del 10% al 15%, la cual puede alcanzar un 30% o más en un tiempo de 2 a 3 semanas, ya que puede aumentar de 0,11 a 0,36 % por día.

- **Tercera etapa: crecimiento máximo y final.**

Es cuando la enfermedad alcanzó su máximo incremento y es demasiado tarde para implementar una estrategia de control químico, debido a que una gran cantidad de hojas tienen la presencia de la enfermedad y es común que las lesiones cubran gran parte de las hojas provocando la caída de gran parte de estas, además el aumento de la enfermedad es muy lento porque la presencia de hojas sanas es mínima y finalmente la enfermedad termina por el agotamiento del hospedero. Esta etapa coincide con la maduración de los frutos y con la etapa de mínimo crecimiento vegetativo de la planta.

3.17 Aspectos epidemiológicos de la roya.

Hemileia vastatrix es un parasito obligado de *Coffea* sp (Javed 1987), ya que la planta de café es susceptible al ataque de la roya durante todas las etapas de su desarrollo, desde el estado cotiledonal hasta la etapa productiva en el campo; por ello, en general las especies de esta planta son atacadas en mayor o menor grado (Schierber 1975).

De acuerdo a Rayner 1972, la germinación de las uredosporas ocurre entre las primeras 12 a 24 horas y a las 48 horas se da la formación de los apresorios. Los síntomas aparecen a los 14 días después de la inoculación y la esporulación comienza después de 2 a 4 días de haber aparecido los síntomas. En algunas investigaciones se ha determinado que se requiere agua para la germinación de las uredosporas, y que ésta ocurre entre 2,6 y 4,7 horas a 23 °C, con un mínimo de una hora; la formación de apresorios toma de 6,5 a 8,5 horas con un mínimo de 5,3 horas. La germinación puede ser inhibida por la alta insolación pero es favorecida con las noches húmedas, las cuales proporcionan mayor infección, ya que la infestación se inicia a través de los estomas (Delgado 2012).

La infección resulta de la formación de manchas pálidas (pústulas) de hasta 15 mm de diámetro en el envés de las hojas, a veces con una ligera clorosis en la parte superior (Javed 1987); dichos síntomas se manifiestan 30 días después que la uredosporas han germinado en el envés de las hojas y ha penetrado a través de la hoja o por los estomas de la misma, (Rayner 1972; Subero 2005).

3.18 Mecanismos de diseminación de la roya.

La enfermedad causada por *H. vastatrix* es altamente propagable porque utiliza distintos factores como mecanismo de diseminación entre los que están: el viento, las lluvias, los insectos entre otros medios. A continuación se describen cada uno de los mecanismos de propagación:

- a) **El viento**, un factor que se ha sugerido en varias teorías como medio de diseminación de la roya debido a pruebas realizadas con trampas para coleccionar esporas, en las cuales se coleccionaron de *H. vastatrix* desde aviones volando a 50, 100, 250, 500 y 1000 metros de altura. Las uredosporas coleccionadas a 1000 metros estaban a 150 Km. de un área afectada en Sao Paulo. A partir de ello, se le considera a las corrientes de aire como mecanismo de propagación de *H. vastatrix* (Subero 2005).
- b) **Las lluvias**, en algunas investigaciones se ha concluido que la dispersión de la roya por el aire es de poca o de ninguna importancia y que las salpicaduras de la lluvia son el agente principal, no solamente para la dispersión, sino también para la liberación de esporas. La relación entre la intensidad de la lluvia y la dispersión de las uredosporas es lineal y bajo condiciones promedio, solo las lluvias que exceden de 0,3 pulgadas dispersan esporas (Subero 2005).
- c) **Los insectos**, se han encontrado insectos (*Euphysothrips subramanii*, *Scirtothrips bispinosus*, *Lestodiplosis sp* y *Mycodiplosis sp*) que se alimentan de pústulas de roya y que llevan hasta 280 esporas en su cuerpo. De acuerdo con esas investigaciones, los insectos tendrían un papel suplementario con la dispersión que podría llegar a ser importante a nivel de hojas, árboles e incluso plantaciones completas, pero sería irrelevante en la dispersión a largas distancias (Subero 2005).
- d) **Otros medios de diseminación**, material de propagación infectado, pero con síntomas poco visibles, puede provocar un avance acelerado de la roya en grandes áreas geográficas. También podría ser posible la propagación de la enfermedad a través de otras especies vegetales importadas de otros países (Subero 2005).

Además el contacto de ropa o brazos del personal que trabaja en cafetales basta para permitir que una gran cantidad de uredosporas queden adheridas en el envés de hojas sanas. De igual manera se considera que los sacos de café pueden ser ocasionalmente vehículos de las esporas de la roya. También se ha indicado que la densidad del tránsito aéreo ha permitido el transporte involuntario de esporas por esta vía, incluso entre continentes (Subero 2005).

3.19 Factores que afectan al desarrollo de *Hemileia vastatrix*.

La ocurrencia de una enfermedad de carácter epidémico como la roya está relacionada con factores bióticos (condiciones del hospedante y del patógeno) y factores abióticos (Figura 4) (Subero 2005).

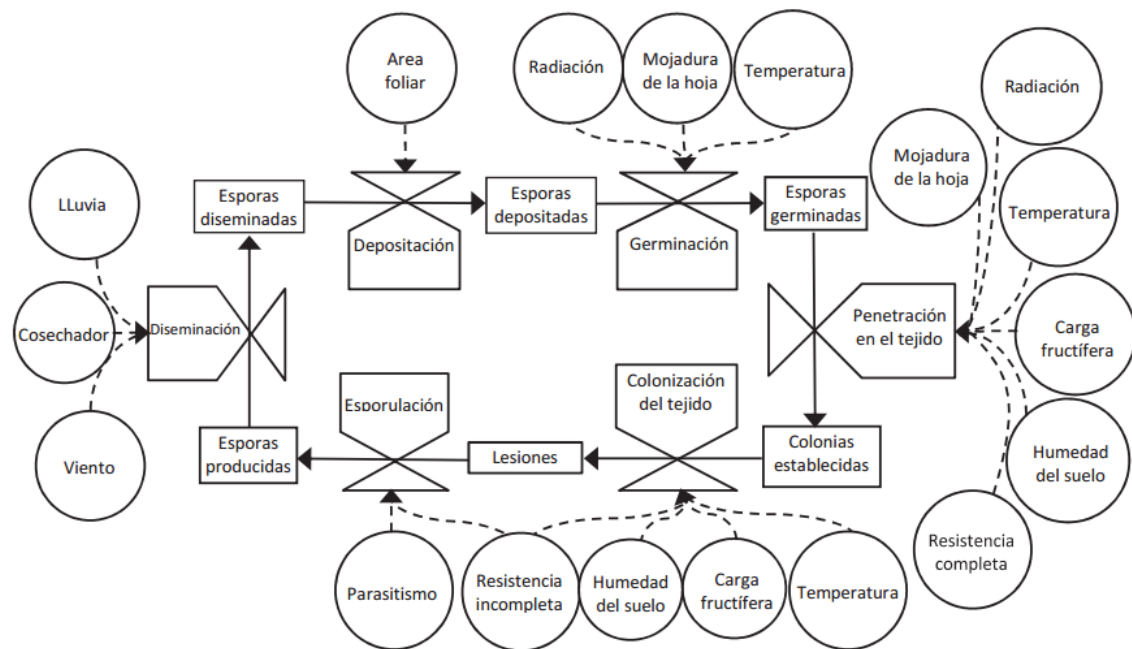


Figura 4. Ciclo de vida de *Hemileia vastatrix* y factores que lo afectan. Fuente: Avelino y Rivas 2014; Feijóo 2014.

Según Subero 2005, entre los factores abióticos están los siguientes:

- **La temperatura**, afecta el desarrollo epidémico de la roya del cafeto debido a su acción directa sobre el proceso de germinación e infección del hongo, ya que temperaturas por debajo del óptimo tienden a inhibir el crecimiento del hongo, prolongando así el tiempo de germinación de las uredosporas, la formación de apresorios, la penetración y colonización del hospedante, haciendo más largo el ciclo epidémico de la roya.

La temperatura óptima para la germinación de las uredosporas es de 24°C; por encima de ella se afecta más severamente la germinación que aquellas por debajo de

ésta, ya que la temperatura por encima del óptimo altera el metabolismo y disminuye el poder germinativo.

- **Efecto de la luz**, un factor determinante para la germinación de las uredosporas, para el inicio del proceso infectivo y para la sobrevivencia o viabilidad de las esporas producidas. La ausencia de luz estimula la germinación y el crecimiento del tubo germinativo; por ello, la intensidad lumínica superior a 2,5 bujías/pie reduce gradualmente el desarrollo de las lesiones y de la germinación, sin embargo, ésta aún se realiza bajo una intensidad de 10 bujías/pie. La duración del período de oscuridad para obtener un máximo de germinación es de cuatro horas, siendo en cambio necesario nueve horas para un máximo de infección.
- **Efecto de la humedad**, la lluvia actúa como factor determinante en la germinación de las esporas, en su dispersión, e indirectamente sobre otros factores ambientales tales como la humedad relativa, la temperatura y la luminosidad. También ejerce un efecto sobre el incremento de la enfermedad cuando la intensidad y frecuencia de las lluvias exceden determinados niveles. La germinación de las uredosporas de la roya ocurre a los 24°C aproximadamente, siendo indispensable el contacto con agua en estado líquido. La humedad relativa en el aire de 95 y 98% son inadecuadas para estimular la germinación. Aún en atmósfera saturada, la germinación no tiene lugar cuando no hay agua líquida en contacto con las esporas.

3.20 Control de la roya del cafeto.

Durante décadas se ha investigado diferentes métodos para controlar la roya, entre los cuales están:

- a) **El control químico.** La eficacia de los fungicidas depende del ingrediente activo, dosis, residualidad, frecuencia, época de aplicación, distribución en la planta y del tamaño de partícula (Centro de Investigaciones en Café (CICAFÉ) 2013). Los tipos de fungicidas utilizados para el control de la roya son los siguientes:

- **Fungicidas protectores**, estos actúan cubriendo la superficie de las hojas, en forma de capas delgadas, previniendo la germinación o penetración de las esporas. El primer producto químico que se utilizó para combatir la roya fue el azufre, sin llegar a resultados suficientemente satisfactorios. Posteriormente, se utilizó el cobre obteniendo una buena protección a los cafetos, pero sin lograr erradicar la enfermedad, debido a que son productos de contacto, no penetran dentro de la hoja, pero evitan que el hongo pueda causar enfermedad al formar una barrera de protección. Así mismo, los fungicidas protectores no curan, por lo que en las partes que ya han sido atacadas, el hongo continúa su desarrollo. Además estos pueden ser lavados con el tiempo a causa de la lluvia constante y las hojas nuevas formadas luego de su aplicación quedan desprotegidas, de ahí la necesidad de aplicar con regularidad este tipo de fungicidas para mejorar la protección contra la enfermedad (CICAFÉ 2013).

Para lograr los mejores resultados con el uso de fungicidas protectores (óxidos e hidróxidos de cobre), se recomienda su aplicación a una concentración de 0,30 % (peso / volumen) al inicio de la época de lluvias y cuando los niveles de infección de la enfermedad son bajos. Después de un 10 % de infección la capacidad de estos para detener el avance de la enfermedad se reduce (CICAFÉ 2013).

En la Tabla 4, se indican algunos fungicidas cúpricos y dosis que pueden ser utilizados para la estrategia de control preventivo en el combate de la roya del café.

Tabla 4. Fungicidas protectores recomendados para el combate preventivo de la roya del cafeto.
Fuente: CICAFAÉ 2013.

Nombre técnico	Nombre comercial	Gramos por litro	Kg en 200 litros	Kg/ha*
Oxido de cobre	Cobre Sandoz MZ Cobre Nordox	2,5 - 3,5	0,5 - 0,7	1,0 – 1,4
Hidróxido de cobre	Kocide-101 Coopicide Cuprox Hidroxide	2,5 - 3,5	0,5 - 0,7	1,0 – 1,4
Oxícloruro de cobre	Oxicoop Cupravit verde Oxicup	4,5 - 5,0	0,9 – 1,0	1,8 – 2,0

*Dosis estimada para un volumen de aplicación de 400 l/ha.

- **Fungicidas sistémicos**, son productos que tienen la capacidad de detener el avance de las infecciones de la roya, desde el interior de las hojas, principalmente en etapas tempranas de la infección cuando se usa la cantidad o concentración apropiada de fungicida. Estas sustancias pueden llegar a los tejidos internos de las hojas y circular dentro de ellas por los conductos por donde se moviliza el agua y los nutrientes. La mayoría de los fungicidas sistémicos se mueven hacia la parte superior de la planta, pero principalmente dentro de las hojas hacia los márgenes y las puntas cuando son aplicados sobre las hojas de los cafetos. Los primeros fungicidas sistémicos utilizados para el combate de la Roya pertenecen a los grupos químicos de las anilidas y los triazoles, los primeros fueron descartados poco tiempo después por su baja capacidad de control de la roya en cambio los triazoles han mantenido un adecuado control de la enfermedad desde que se comenzaron a utilizar y su mecanismo de acción se basa en impedir la producción de una sustancia esencial para el crecimiento del hongo llamada ergosterol (precursor biológico de la vitamina D).

A continuación se indican algunos fungicidas sistémicos cúpricos que pueden ser utilizados para la estrategia de control preventivo en el combate de la roya del café (Tabla 5).

Tabla 5. Fungicidas sistémicos recomendados para el combate de la roya del café. Fuente: CICAPE 2013.

Nombre técnico	Nombre comercial	ml por litro	ml en 200 litros*
Cyproconazol	Atemi 10 SL Cyprosol 10 SL	1,00	200
Propoconazol	Tilt 25 EC Propicon 25 EC	1,25	250
Triadimenol	Caporal 25 DC	1,25	250
Tebuconazol + Triadimenol	Silvacur 30 EC Tebutriazel 30 EC	1,75	350
Cyproconazol + Carbendacin	Duett 25 SC	1,25	250
Cyproconazol + Pyraclostrobin	Opera 18,3 SE	2,50	500
Cyproconazol + Trifoxistrobin	Esfera 26,75 EC	1,50	300

*Volumen de aplicación sugerido de 400 l/ha.

b) Control genético. Una de las alternativas para el control de la roya es el mejoramiento genético, el cual comprende el uso de variedades resistentes o tolerantes a la roya del café. La resistencia es un fenómeno general de las plantas, un criterio de evaluación de resistencia consiste en la observación del tamaño de las lesiones ocasionadas por la roya, si las manchas cloróticas son reducidas indican resistencia o si las manchas son grandes que indican susceptibilidad (Calderón 2012).

En la resistencia específica del café a la roya están implicados al menos nueve genes, dichos genes corresponden a la resistencia “gen a gen”. De los nueve genes conocidos, cuatro han sido identificados en *Coffea arabica* (Canjura 2000). Se han identificado fuentes de resistencia genética a la roya dentro de las especies *C. arabica* (Arábicas), *C. liberica* y *C. canephora* (Robustas), siendo esta última la más utilizada para crear variedades resistentes, en particular los híbridos Catimores, obtenidos de la cruce de las variedades timor y caturra, estos tuvieron su origen en un cruzamiento espontáneo entre la variedad típica de *C. arabica* y Robusta de *C. canephora*, identificada alrededor de 1917 en una plantación de Arábicas en la isla

de Timor Oriental (Océano Índico) (Asociación Nacional del Café (Anacafé) 2013; Gobierno Regional San Martín *et al.* 2013).

En América los cultivares tradicionales poseen una estrecha base genética, por lo cual el problema de la roya adquiere mayor trascendencia y se hace más difícil encontrar alguna variación importante en resistencia (Ruiz 1994). De acuerdo con Beaker 1978 en El Salvador las investigaciones para el mejoramiento genético comenzaron en los años 70s, a cargo del Instituto Salvadoreño de Investigaciones del Café, ISIC, ahora Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café PROCAFÉ, el cual cruzó al híbrido de Timor, procedente del Centro de Investigaciones sobre la Roya en Oeiras, con Caturra para la obtención de Catimor, híbrido que presentó una buena adaptación en alturas mayores a 1000 msnm, pero en 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 (Rodríguez 1990).

Reportes del Instituto de café de Costa Rica, recomienda no sembrar la variedad Costa Rica 95, por que presenta problemas por la menor calidad de taza comparada con Caturra y Catuai (Gobierno Regional San Martín *et al.* 2013).

- c) **Control cultural.** Las principales prácticas culturales que deben priorizarse en el control de la roya son: sembrar o regular la sombra de los cafetales, para proteger la humedad de los suelos y asegurar la nutrición de la planta, evitando de esta manera el estrés de las plantas en las épocas de baja precipitación como junio, julio, agosto y en algunos sectores hasta septiembre; previo a fertilizar regular la acidez de los suelos, verificando el pH del suelo, aplicando enmiendas orgánicas como roca fosfórica, carbonato de calcio entre otros, siendo necesaria su aplicación como mínimo 30 días antes del abonamiento; también se debe fertilizar de acuerdo a los resultados de análisis de suelo y en base a un plan nutricional; además se debe controlar la maleza para evitar la competencia del cafeto por nutrientes y se debe mantener algunas plantas acompañantes que permita evitar la erosión; y en caso de daño de la roya amarilla del cafeto realizar un plan de podas de renovación en plantaciones mayores de 6 ó 7 años, a fin de renovar la estructura productiva de la

planta (Gobierno Regional San Martín *et al.* 2013). Todas estas prácticas culturales se describen a continuación:

- **Densidades de siembra**, se define como el número de plantas por unidad de área de terreno; tiene un marcado efecto sobre la capacidad de producción de las plantas y es tan importante que se le considera como un insumo más en el proceso de producción; de la misma importancia que un fertilizante (Arcila *et al.* 2007; Anacafé 2013).

La densidad de siembra está relacionada con los efectos que produce en la planta la competencia de otras plantas de la misma o de otra especie, y además, con una mayor o menor eficiencia de captación de la radiación solar (Fageria 1992; Anacafé 2013). A medida que se incrementa la población de plantas por área, disminuye la producción media por planta, debido a la competencia por los recursos necesarios para su crecimiento. Entre los factores más importantes que deciden la densidad de siembra óptima para un cultivo, están las características morfológicas de las plantas, las cuales deben tener condiciones ambientales favorables para que puedan desarrollarse sin limitantes y expresar la capacidad genética (Anacafé 2013).

- **Tipos y sistemas de poda**, el cafeto es una planta de producción distal; es decir, la cosecha de cada año se ubica en los nudos nuevos formados durante el periodo de crecimiento anterior. En cada ciclo los nudos productivos se localizan hacia el extremo de la rama, y sucesivamente hacia atrás cada vez queda mayor área de tejido improductivo. Este comportamiento productivo del cafeto induce un agotamiento progresivo, particularmente en sistemas de cultivo intensivos, lo que condiciona la productividad de la planta a la recuperación, la cual se da con el inicio de la poda (Carvajal 1984, Federación de Cafeteros de Colombia 1979 y Ramírez 1994).

Según Ramírez 1996, las principales estrategias de poda de cafetos que actualmente se aplican son las siguientes: poda selectiva, consiste en la poda individual por planta de acuerdo con el agotamiento que cada una presenta, poda por hileras, las plantas se podan en hileras completas en ciclos de 3, 4 y 5 años; y poda por lotes, este sistema comparte el criterio de renovación sistemático de la poda por hileras con la diferencia de que la organización de las áreas por podar se realiza por lotes y

no por calles. De esta manera se divide la plantación en partes iguales, es decir en 3, 4 y 5 lotes.

- **Uso de sombra**, el empleo de sombra es primordial para favorecer la productividad del café. El uso y manejo apropiado de los árboles de sombra tiene por objeto evitar extremos que son perjudiciales, ya que sombra excesiva afecta o limita la producción y exceso de sol acorta la vida productiva de la plantación y demanda mayor uso de insumos (Calderón 2012).

Según Anacafé (2002), es mejor el sistema de cultivo de café bajo sombra, ya que las ventajas del mismo son múltiples, y van desde las necesidades eco-fisiológicas de la planta, generación de energía, hasta la de cumplir con requerimientos del mercado en temas ambientales, como protección de suelos y recursos hídricos, conservación de flora y fauna.

Una plantación necesita mayor densidad de sombra (30-40%) y menor cantidad de luz (70-60%), cuando se cultivan bajo condiciones de alta temperatura, baja humedad relativa y mayor exposición a la luz solar; sin embargo, la plantación necesitara una menor densidad de sombra (25-30%) y una mayor cantidad de luz (75-70%) si es cultivada bajo condiciones de baja temperatura, alta humedad relativa menor exposición a la luz solar y alta humedad natural del suelo. Al inicio de las lluvias (mayo-junio), se realiza la poda de mantenimiento o regulación con el propósito de obtener una buena penetración y distribución de la luz dentro del cafetal (Anacafé 2002).

- **Fertilización**, está demostrado que los fertilizantes son absolutamente necesarios en los cultivos de café, ya que el manejo nutricional de las plantas desempeña un papel fundamental en el comportamiento del ciclo productivo del cultivo. Una buena nutrición proporciona los minerales que requiere la planta para realizar sus funciones metabólicas y fisiológicas fortaleciendo así sus mecanismos de defensa contra la roya y manteniendo su capacidad productiva (Virginio y Astorga 2015).

Existe en el comercio, fertilizantes líquidos o fertilizantes foliares (químicos u orgánicos o ambos) que, aplicados por aspersión a las hojas de las plantas, le suministran los nutrientes complementarios, igual como lo hacen los fertilizantes sólidos aplicados al suelo (Virginio y Astorga 2015). Los fertilizantes aplicados en las hojas son absorbidos en una elevada proporción, no inferior al 90%. Por el

contrario los fertilizantes aplicados al suelo se pierden en un 50% o más, por diferentes motivos. Otras ventajas de la fertilización foliar es que se pueden aplicar fungicidas en la misma solución, por ende al mismo tiempo que se nutre se controlan las enfermedades (Anacafé 2006).

Igualmente, es importante revisar el diseño, composición y manejo de los árboles en asocio con el café, ya que ellos contribuyen con nutrientes complementarios al programa de fertilización (Virginio y Astorga 2015).

d) Control biológico: el uso de parasitoides, depredadores, patógenos, antagonistas y poblaciones competidoras para suprimir una población de plagas, haciendo esta menos abundante y por tanto menos dañina que en ausencia de éstos (Van y Bellows 1996).

Es ampliamente conocido que los patógenos presentes en la superficie de las partes áreas de las plantas, son susceptibles al ataque de otros microorganismos, lo cual puede contribuir a la reducción de la incidencia de enfermedades foliares (Canjura *et al.* 2002).

Para que el parasito realice el control que se desea, deben de facilitarse las condiciones naturales de su acción. Los ensayos demuestran que para que haya un parasitismo son necesarias, además de condiciones atmosféricas y del ecosistema del cafetal, dos condiciones, las cuales son: mantenimiento permanentemente en el suelo de las plantaciones una densidad elevada del hiperparásito y presencia de los vectores (principalmente insectos) que transportan el hongo del suelo a las hojas infectadas (Rolz *et al.* 2013).

3.21 Impacto económico de la roya.

En la década de los noventa, la producción del parque cafetalero reflejaba alto potencial de producción, ya que fluctuó entre 11.3 y 18.4 qq uva oro/mz, logrando los mejores volúmenes de producción en los años 1992/93 y 1999/2000, donde se produjeron 4.2 y 3.7 millones de quintales uva oro respectivamente. La caída de los precios en el quinquenio 1997/98 al 2001/02, provocó que los productores abandonaran sus fincas y los niveles de inversión en el mantenimiento de estas decayeran en más del 64% en el 2003, limitándose a actividades como la limpia de cafetales y la cosecha del fruto en la

mayoría de fincas que no fueron abandonadas. Esta situación contribuyó a disminuir la capacidad productiva y al envejecimiento de los cafetales, al no haber renovación de cafetos. El efecto se reflejó en la caída del potencial productivo de las fincas tocando el más bajo rendimiento en el año 2006/07 de 7.6 qq oro uva/mz, obteniendo una producción de 1.74 millones de quintales oro uva, es decir cayó con respecto al promedio productivo de la década 1990/91-1999/00 un 41% (PROCAFÉ 2014).

Según Virginio y Astorga (2015), la baja de los precios del café en el mercado internacional en los últimos años ha contribuido al desarrollo de la enfermedad más importante del café, debido a que los productores reducen las prácticas de manejo de los cafetales y como resultado se aumenta la incidencia de la roya, lo que disminuye la producción y se potencian los efectos colaterales negativos, particularmente los impactos socioeconómicos.

La roya anaranjada desde su origen ha causado grandes pérdidas económicas. A partir de la dispersión de la roya anaranjada del cafeto en el mundo se han reportado reducciones en las cosechas de grandes países cafetaleros, especialmente en las zonas de bajío donde las temperaturas son más adecuadas para esta enfermedad (Avelino y Rivas 2013). El brote que reportó mayores pérdidas a nivel centroamericano fue en la producción del 2012-2013, ya que se estimaron pérdidas de aproximadamente el 20%, los países más afectados fueron Honduras, Guatemala y El Salvador (Tabla 6) (Avelino y Rivas 2013); dicho porcentaje de pérdida equivalió a unos 3,5 millones de sacos de café de 60 kg (USD 499 millones), lo que se tradujo en la afectación del 80% de los pequeños productores que carecen de otras fuentes de ingresos, es decir que unas 373.584 personas (17,2% de la fuerza laboral del sector) fueron desplazadas como consecuencia del brote (Virginio y Astorga 2015).

Tabla 6. Pérdidas causadas por la roya anaranjada en la producción del 2012-2013. Fuente: Avelino y Rivas 2013.

	Producción en la cosecha 2011-2012 (en millones de sacos de 46 kg de café oro)	Pérdida en 2012-2013 causada por la epidemia de roya anaranjada (en miles de sacos de 46 kg)	(%)	Estado de emergencia declarado
Honduras	7.10	2192	31	Si
Guatemala	4.85	730	15	Si
Costa Rica	2.01	97	5	Si
Nicaragua	2.00	58	3	No
El Salvador	1.50	442	23	No

En El Salvador, en los últimos años el aporte que el sector café realiza al Producto Interno Bruto (PIB), ha decrecido debido a la baja cosecha que ha provocado la infestación de la roya, lo que a su vez ha generado la supresión de empleo del sector cafetalero. Según datos de la Organización Internacional del Café (OIC) y el Consejo Salvadoreño del café 2016, la producción registrada para el 2010-2011 fue cercana a los 2614,000.00 quintales oro uva, para el 2011-2012 se reportó una producción de 1624,211.00 quintales, para el 2012-2013 fue de 1730,000.00 quintales oro uva, en el 2013-2014 la producción bajo a 700,025 quintales, para el 2014-2015 la producción fue de 925,160 quintales y para el 2015-2016 se reportó una producción de 784,740 quintales oro uva, es decir 17.8% inferior a lo recolectado en la cosecha 2014-2015. La reducción en las cosechas de cada año se ha reflejado en el PIB, ya que en el año 2010 fue de 1.6 %; en el 2011 fue de 1.4%, en el 2012 de 1.2%, en el 2013 bajo a 0.7% y en el año 2014 solo representó el 0.6%, lo que se traduce en pérdidas un poco mayores de 100 millones debido a que la producción ha caído más de 1.4 millones de quintales.

Una de las implicaciones que ha traído la baja producción de café en el país es la reducción de empleos, ya que según datos de OIC y CSC (2016) se reportó una caída de 92,450 empleos entre los años 2010 y 2016. De acuerdo con datos de dicho informe en el 2010 el sector cafetalero reportó la creación de 130,700 empleos en cambio para el 2013 la cifra bajó hasta 38,250 empleos.

3.22 Microhongos con capacidad antagonista contra *Hemileia vastatrix*.

Existen varias investigaciones que indican al hiperparásito *Lecanicillium lecanii* como el mejor antagonista de la roya, sin embargo se han aislado otros hiperparásitos de *H. vastatrix* como: *Aphanocladium melirolae*, *Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium leptobactrum*, *Verticillium* sp, *Acremonium byssoides*, *Calcarisporium arbuscula*, *Calcarisporium ovalisporum*, *Sporothrix guttuliformis*, *Fusarium pallidoraserum* y *Trichoderma* sp (Rolz *et al.* 2013). Otros antagonistas de la roya del café son *Verticillium psalliotae*, *Cladosporium hemileiae*, *Paranectria hemileiae*, *Darluca filum* y *Tuberulina maxima*; estos hongos se encuentran en forma natural, atacan las hifas y las estructuras de reproducción de *H. vastatrix* reduciendo la infección e inóculo de roya (Canjura *et al.* 2002).

Trichoderma sp. es un antagonista que aprisiona los filamentos o la estructura del hongo patógeno, excreta enzimas y posiblemente antibióticos, con el objeto de crear orificios de entrada en la pared celular del hongo que sufre el ataque, y finalmente penetra o extrae nutrientes. El resultado de esta acción es prácticamente el fin del hongo patógeno (Rolz *et al.* 2013).

Las uredosporas de *Hemileia vastatrix*, agentes causantes de la roya del cafeto, las cuales son frecuentemente hiperparasitadas por el hongo *L. lecanii*. El tejido de la hoja de café no es infectado por este hongo, pero las hojas en las que se encuentra parasitando pústulas de roya, muestran a menudo necrosis y caen más rápido que las no parasitadas (Leguizamón *et al.* 1989). Este hongo es capaz de penetrar las uredosporas de la roya utilizando el siguiente mecanismo: la hifa entra a través de los poros germinales de las uredosporas o forma estructuras similares a apresorios que le permiten penetrar la pared celular y mediante la actividad enzimática de lipasas, proteasas, 3 glucanasas y quitinasas facilitan la degradación de la pared celular, la cual está compuesta principalmente por β -glucanos y quitina. Es este el mecanismo de acción para lograr la reducción de la infección por roya en condiciones de invernadero y campo (Vélez y Rosillo 1995). *Lecanicillium* además está catalogado como un hongo entomopatógeno, ya que se conoce que las quitinasas se hallan involucradas en los procesos de infección en los insectos. Además, se ha probado que, en su función como controlador de fitopatógenos, este hongo parasita a la diana, a través de una

combinación de enzimas que incluyen a las celulasas, proteasas, β -1,3-glucanasas y quitinasas (González *et al.* 2014).

3.23 Clasificación taxonómica de *Simplicillium lanosoniveum* (Zare y Gams 2001).

Antiguamente los géneros *Simplicillium* y *Lecanicillium* se clasificaron en el género *Verticillium* y en la familia Clavicipitaceae, sin embargo Sung *et al.* 2001 y Zare y Gams 2001, propusieron una nueva clasificación debido a los resultados obtenidos en análisis filogenéticos moleculares realizados a los tres microorganismos. *Simplicillium* y *Lecanicillium* por sus filogenias se introdujeron en la familia Cordycipitaceae, la cual fue propuesta por Diehl en 1950 (Sung *et al.* 2007). La especie *S. lanosoniveum* se asemeja en cierta medida a *L. lecanii* y *L. muscarium*, pero se puede distinguir de ellos por sus conidios corto-elipsoidales y pequeños, ausencia completa de ramificación verticiladas, usualmente solo tienen fiálides individuales que surgen de hifas áreas postradas y la velocidad de crecimiento es más rápida (Zare y Gams 2001; Sung *et al.* 2007)

De acuerdo a Sung *et al.* 2007, este hongo pertenece al Reino Fungi, a la clase Sordariomycetes, al orden Hypocreales, a la familia Cordycipitaceae, científicamente se le conoce como *S. lanosoniveum* (Zare y Gams 2001) (Tabla 7).

Tabla 7. Clasificación taxonómica de *Simplicillium lanosoniveum*. Fuente: Sung *et al.* 2007.

Reino:	Fungi
Division:	Ascomycota.
Clase:	Sordariomycetes
Subclase:	Magnoliidae
Orden:	Hypocreales
Familia:	Cordycipitaceae
Género:	<i>Simplicillium</i>
Especie:	<i>lanosoniveum</i>

3.24 Morfología de *Simplicillium lanosoniveum* (Zare y Gams 2001).

- **Fiálides (células conidiógenas):** son largas y estrechas que surgen de hifas aéreas, siempre solitarias y el tamaño varía de 15-35 x 0,7-1,5 μm (Zare y Gams 2001; Ward 2011).
- **Conidios,** son pequeñas cabezas globosas que se encuentran en el extremo de las fiálides en un grupo formando cabezuelas. Son muy pequeños y su tamaño varía de 1,5-3,5 x 0,7-1,5 μm , además bastante variables en forma, desde sub-globoso, oval o elipsoidal a sub-cilíndrico (Figura 5) (Zare y Gams 2001).

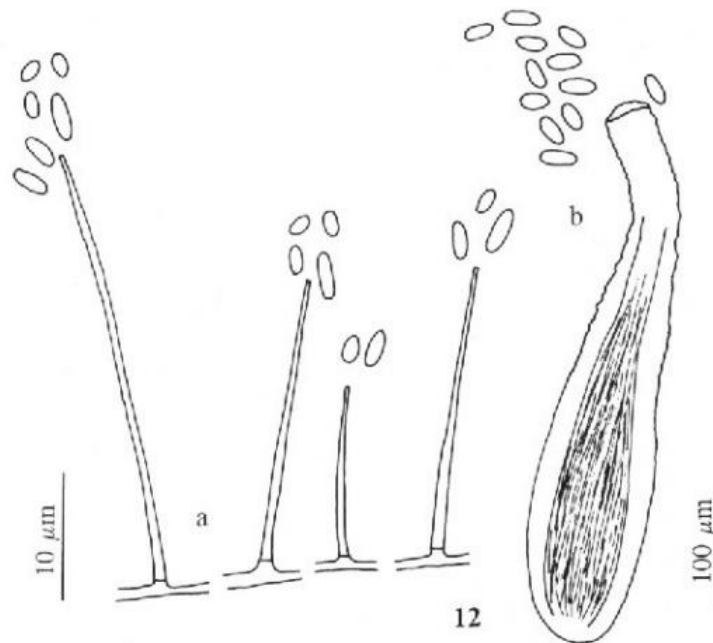


Figura 5. Fiálides y conidios de *Simplicillium lanosoniveum*. Fuente: Zare y Gams 2001.

- **Colonias,** *Simplicillium lanosoniveum* 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 aéreo blanco o crema (Figura 6), que forma colonias blancas con apariencia algodonosa que mide de 24-34 mm de diámetro en 10 días en PDA. Al inverso del cultivo o en la parte inferior del medio es de color amarillo cremoso y se observa la formación de una especie de halo, debido a que las hifas se desplazan concéntricamente sobre el medio de cultivo (Zare y Gams 2001; Lim *et al.* 2014).

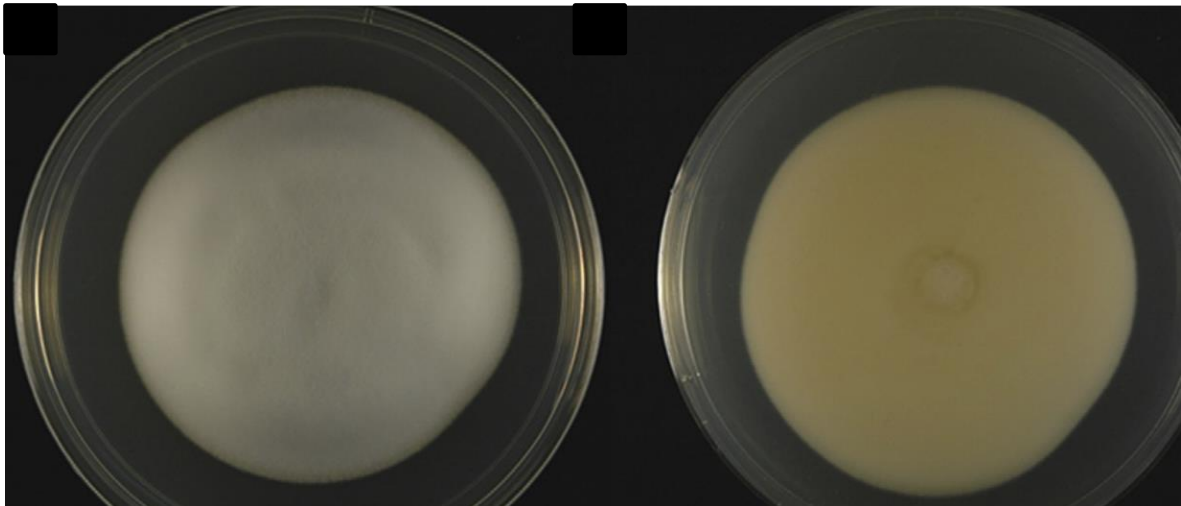


Figura 6. Colonias de *Simplicillium lanosoniveum* Fuente: Ward *et al.* 2014.

3.25 Modo de acción de *Simplicillium lanosoniveum* (Zare y Gams 2001).

La especie de *Simplicillium lanosoniveum* ha sido reportado como un controlador biológico de ciertas plagas que atacan cultivos, teniendo la función de micoparásito y entomopatógeno. Este microorganismo se encuentra habitando de manera natural hongos, nematodos y algas (Zare y Gams 2001; Ward 2011; Dong *et al.* 2013; Lim *et al.* 2014). *S. lanosoniveum* además parasita insectos que son considerados plagas para ciertos cultivo como: áfidos, *Aphis gossypii* y *Ceratovacuna lanígera* (Chen *et al.* 2017) y según Lim *et al.* 2014 también este hongo posee igual capacidad entomopatógena que *Beauveria bassiana*.

El hongo micofílico *S. lanosoniveum* coloniza las pústulas de roya de soja (*Phakopsora pachyrhizi*) enrollándose alrededor de las uredosporas (Figura 7). El micoparásito penetra la uredosporas a través de los poros en un periodo de 24 horas después de la inoculación. Las hifas colonizan los soros, pero no colonizan las superficies de las hojas libres de pústulas. Dentro de 3 días las hifas, se enrollaron firmemente alrededor de uredosporas, colonizándolas en un 60%. A los 5 días posteriores a la inoculación las uredosporas se colonizaron en un 90%, por eso los poros de las uredosporas presentan hundimiento. La colonización se distribuye uniformemente dentro de las uredosporas, y las hifas se enrollaron alrededor de la capa interna de esporas y a lo largo del citoplasma. Después de 7-10 días, los conidios se produjeron en largos fiálides

individuales saliendo de uredosporas colapsadas. A los 10 días, el contenido de la uredosporas se encuentra vacío de orgánulos y casi ausencia de hifas de *S. lanosoniveum*. Las uredosporas se encuentran deformes y con apariencia colapsadas (Ward 2011).

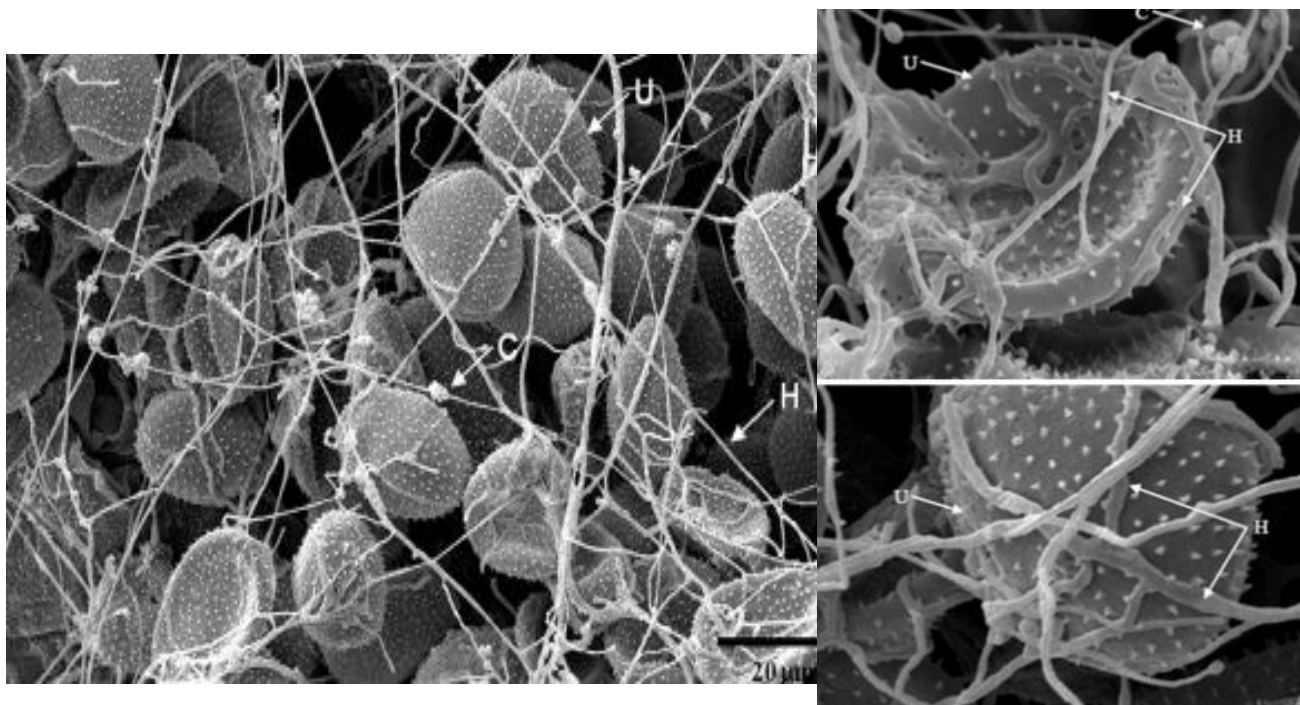


Figura 7. *Simplicillium lanosoniveum* enrollándose alrededor de las uredosporas de la roya de soja (*Phakopsora pachyrhizi*). Fuente: Ward *et al.* 2011; Ward *et al.* 2014.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Ubicación del área de estudio: Finca Altamira.

El estudio se realizó en una finca ubicada en el Cantón Shucutitán en el kilómetro 93 ½ de la Ruta de las Flores, en el Municipio de Concepción de Ataco, del Departamento de Ahuachapán (Figura 8), este Municipio se encuentra a 1273 m.s.n.m. y limita al norte con el Municipio de Ahuachapán; al este con Apaneca; al sur con Jujutla y al oeste con Tacuba (Alcaldía Municipal de Concepción de Ataco 2002). El área de estudio se encuentra entre las coordenadas geográficas siguientes: 13°49'57.02"N y 89°49'43.90"O.

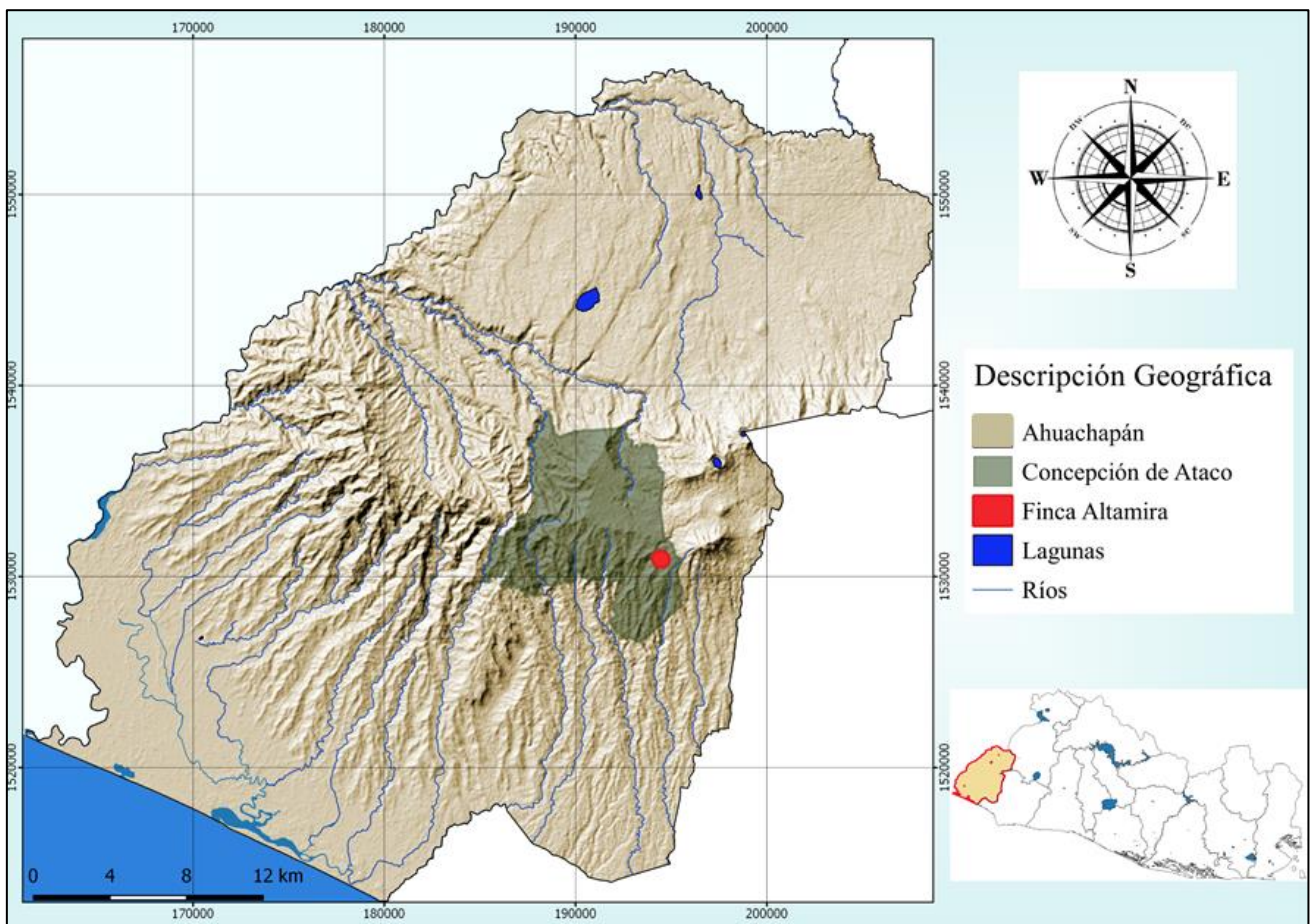


Figura 8. Mapa de la ubicación geográfica del área de estudio: Finca Altamira.

4.1.1 Características físicas de Concepción de Ataco.

- Topografía.

Concepción de Ataco tiene una extensión de 99.682,38 Has, de las cuales el 95% corresponde a un paisaje montañoso y el 5% se caracteriza por ser plano a semi-plano. Por lo tanto, casi todo el Municipio presenta pendientes elevadas que actualmente se utilizan en agricultura y ganadería (Alcaldía Municipal de Concepción de Ataco 2002).

- Clima.

De acuerdo con la Alcaldía Municipal de Concepción de Ataco (2012), el 42% del área geográfica del Municipio presenta un clima con lluvias abundantes y temperaturas superiores a los 24° C, el 56% presenta lluvias variables y temperaturas que oscilan entre 17° C y 22° C y solamente el 2% presenta un clima con lluvias que alcanzan los 2000 mm por año y temperaturas que oscilan entre 10° C y 17° C. Generalmente las lluvias se presentan en los meses de: marzo, abril, mayo, octubre y noviembre; siendo los dos últimos los que presentan mayores precipitaciones.

El valor medio de humedad relativa registrado para el Municipio es del 67% (Alcaldía Municipal de Concepción de Ataco 2002).

- Suelo.

De acuerdo con el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) 2012, el suelo del Cantón Shucutitán de Concepción de Ataco es de tipo Andisol. Los andisoles jóvenes tienen un horizonte oscuro compuesto de ceniza, con textura franca y un horizonte superficial entre 20 a 40 cm. de espesor. En cambio los andisoles de mediano desarrollo, tienen un horizonte oscuro pero más rico en materia orgánica, con textura limosa y un horizonte superficial de 40 cm. o más de espesor (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales (MARN) y Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) 2007).

El 84% del área geográfica del Municipio está dedicado a la explotación agrícola, el 14.35% son pastos para la producción ganadera, el 0.68% son bosques y el 0.23% son para diferentes usos (Alcaldía Municipal de Concepción de Ataco 2012).

- **Flora.**

En el Municipio de Concepción de Ataco, la degradación de los recursos naturales especialmente la flora se ha visto gravemente afectada debido a la explotación minera; por ello, es poca la diversidad de especies vegetales en la zona. Las especies vegetales más abundantes reportadas para el Municipio son: capote, hobo, iguá, caracolí, guarumo, laurel, cordoncillo y friegaplatos (Alcaldía Municipal de Concepción de Ataco 2002). Asimismo, las plantas más abundantes en el cantón Shucutitán son: roble, guachipilín, ceiba, cortés blanco, pito y belloto¹.

- **Fauna.**

En el Municipio de Concepción de Ataco, la degradación de la flora ha influido en el recurso faunístico, ya que la pérdida de condiciones habitacionales, han reducido las posibilidades de vida para los diferentes grupos taxonómicos. Por ello, para el Municipio solo se reportaron un total de treinta y nueve especies de aves (garza blanca, rey gallinazo, guala, aguililla, gavial, gavilán, guacharaca, perdiz, búho, torcaza, corralera, tórtola, garrapatero, jiriguelo, chow-chow, cascabelito, loro, guacamaya, perico, tominejo, arrendajo, toche, chamon, cardenal, barranquero, azulejo, mirla blanca, sinsonte, chisgua, mirla embarradora, golondrina, carpintero, copeton, siriri, tijerete, petirrojo, chorola, chilaco y cucarachero), veintitrés especies de mamíferos (*Didelphys marsupialis*, *Bradypus variegatus*, *Dasybus novemcinctus*, *Eira barbara*, *Tamandua mexicana*, *Desmodus rotundus*, *Carollia castanea*, *Aotus lemurinus*, *Cerdocyon thous*, *Leopardus pardalis*, *Potos flavus*, *Nasua nasua*, *Procyon Cancrivorus*, *Lontra longicaudis*, *Conepatus semistriatus*, *Mustela frenata*, *Odocoileus virginianus*, *Tayassu tajacu*, *Sciurus granatensis*, *Mus musculus*, *Dasyprocta punctata*, *Agouti paca* y *Sylvilagus brasiliensis*) y trece especies de reptiles (*Bothrops atrox*, *Micrurus mipartitus*, *Microrus dumerilii*, *Clelia clelia*, *Leptophis ahaetulla*, *Spilotes pullatus*, *Drymarchon corais*, *Crótalos durissus*, *Mastigodryas pleei*, *Iguana iguana*, *Cnemidophorus* sp, *Tupinambis nigropunctatus* y *Polychrus marmoratus*) (Alcaldía Municipal de Concepción de Ataco 2002).

1. Vázquez Villacorta, José Alejandro. Capataz de la Finca Cafetalera, comunicación personal, 11 de mayo del 2017.

4.2 Ubicación del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), el cual está ubicado dentro de la Universidad de El Salvador, en la Autopista Norte y Final de Avenida Héroes y Mártires del 30 de Julio, Ciudad Universitaria, San Salvador, El Salvador (Figura 9). El laboratorio se encuentra localizado entre las coordenadas geográficas siguientes: $13^{\circ}43'4.85''\text{N}$ y $89^{\circ}12'6.20''\text{O}$.

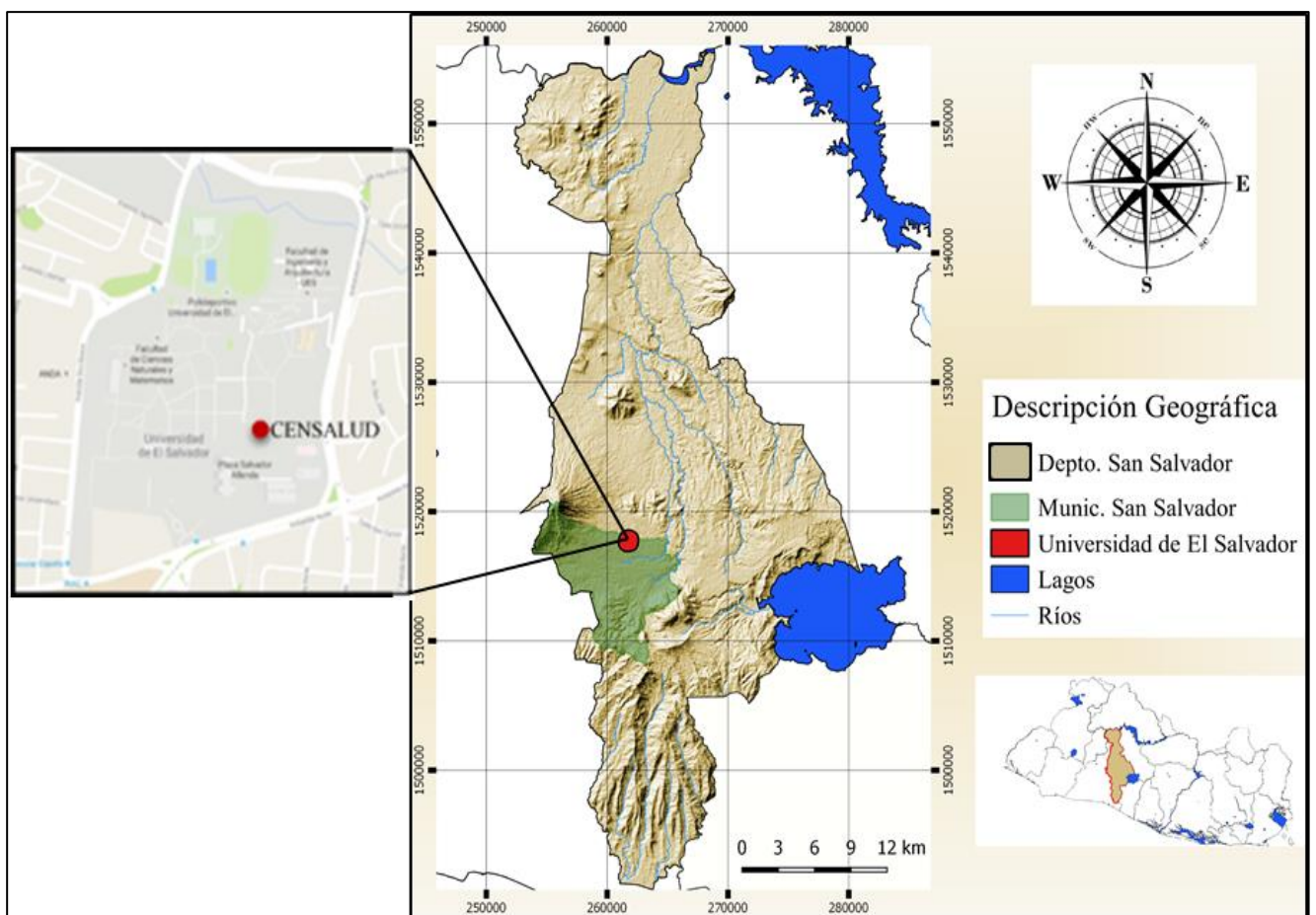


Figura 9. Mapa de la ubicación geográfica del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud.

4.3 Ubicación del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova”.

La medición de esporas se realizó en el Laboratorio de Parasitología Vegetal del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA), el cual está ubicado en el km. 33 1/2, carretera a Santa Ana en el Municipio de Ciudad Arce, La Libertad, El Salvador (Figura 10). Se encuentra entre las coordenadas geográficas siguientes: 13°48'13.85"N y 89°24'4.50"O.

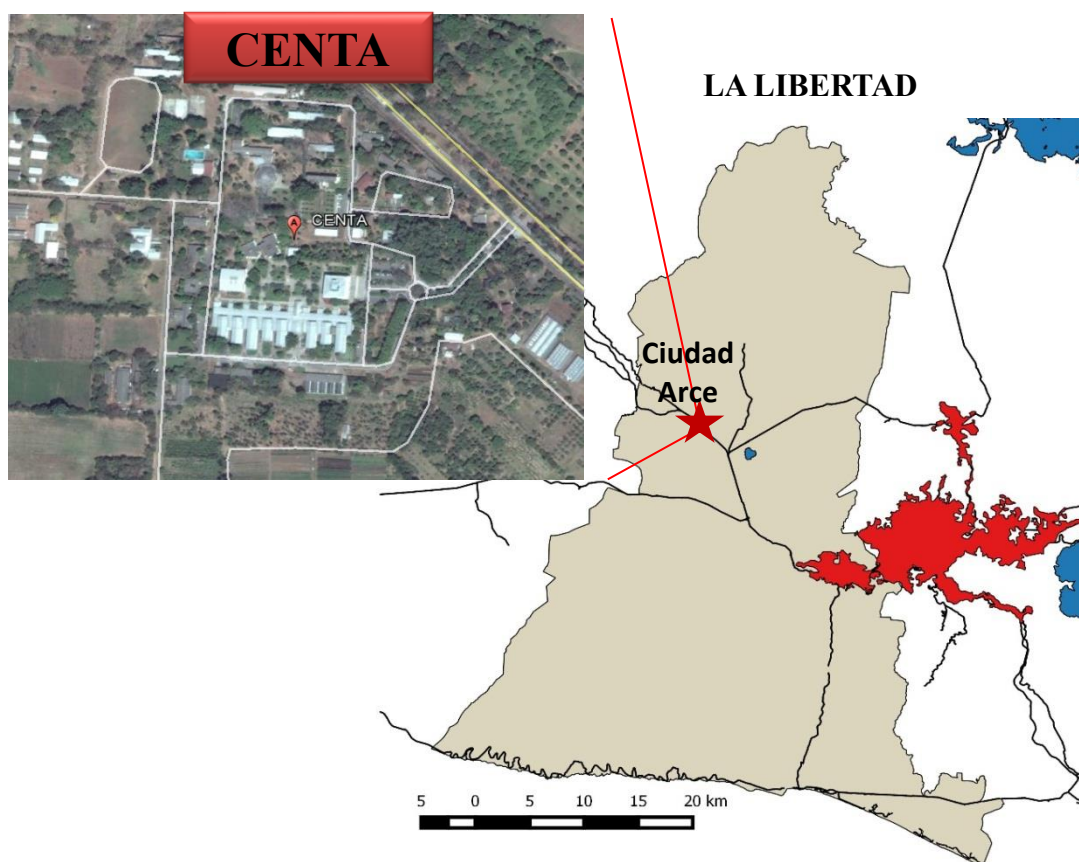


Figura 10. Mapa de la ubicación geográfica del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova”.

4.4 Fase de campo.

Etapa que describe paso a paso la recolección de las muestras foliares con el micoparásito *Simplicillium lanosoniveum*, la aplicación de este en plantas de café y la medición de variables antes y después de cada aspersión.

4.4.1 Recolección de muestras foliares con *Simplicillium lanosoniveum*.

Simplicillium lanosoniveum es un hongo que se encuentra hiperparasitando en forma natural pústulas de roya del cafeto, este se caracteriza por un micelio blanco que se desarrolla sobre las uredosporas y por no formar necrosis en el tejido; esta última característica diferencia en campo a esta especie con *Lecanicillium lecanii*, ya que según Vélez 1991, este también desarrolla un micelio blanco sobre las pústulas pero forma necrosis en el tejido (Anexo 2).

La recolección de muestras foliares con el hongo se realizó dos veces, la primera para la obtención del hongo en septiembre del 2016 y la segunda en mayo del 2017, para cumplir con el último Postulado de Koch (Anexo 3), que indica que se debe aislar nuevamente y corroborar si fue el hongo asperjado el que parasitó al fitopatógeno (Volcy 2008). Para ello, se empleó la metodología modificada de Aizpurua *et al.* 1996, la cual consistió en seleccionar veinte plantas de *coffea arabica* que tuvieran hojas con las características descritas anteriormente, de cada planta se seleccionó al azar una de esas hojas y se procedió a cortarlas, haciendo uso de una tijera previamente desinfectada con alcohol diluido al 70% (Figura 11). Posteriormente, se colocaron dentro de bolsas plásticas estériles, previamente rotuladas (con el número asignado a la planta, fecha, lugar de procedencia), y se trasladaron en una hielera al laboratorio de CENSALUD (Anexo 4).



Figura 11. Recolección de muestra foliar con el hongo hiperparásito *Simplicillium lanosoniveum* creciendo sobre roya.

4.4.2 Inoculación de plantas de café con *Simplicillium lanosoniveum*.

El ensayo se conformó de tres parcelas, una por tratamiento y el grupo control, cada una con 20 metros de largo y 12 metros de ancho. Las parcelas constaron de 60 cafetos, organizados en hileras de diez horizontalmente por hileras de seis verticalmente, de los cuales 50 cafetos, elegidos al azar, conformaron la muestra (Figura 12). La distancia entre cada parcela fue de aproximadamente 90 metros.

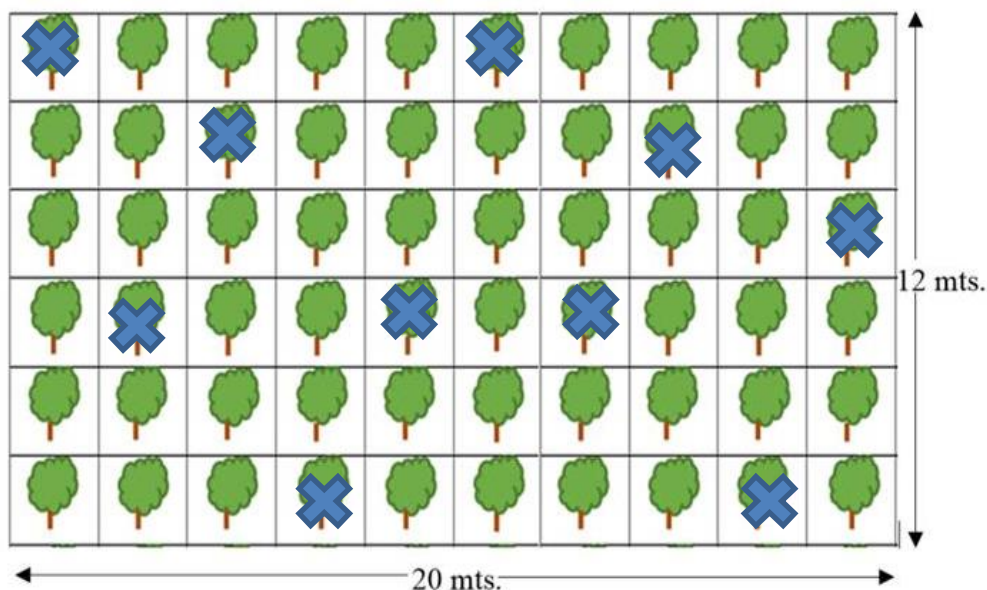


Figura 12. Esquema de las plantas evaluadas dentro de cada parcela.

Después del aislamiento, la identificación y la reproducción de *Simplicillium lanosoniveum*, llevadas a cabo en el laboratorio, se procedió a la aspersión en campo, la cual se realizó de acuerdo con el diseño experimental modificado de Guerra y Welchez 2013, el cual consistió en establecer dos tratamientos (900 gramos y 1500 gramos de arroz inoculados con el hongo) y un grupo control (sin aspersión o manipulación de ningún tipo). Se efectuaron tres aplicaciones por tratamiento con un intervalo de quince días por aspersión; es decir, la inoculación se llevó a cabo durante un periodo de 31 días, iniciando el dos de abril y finalizando el dos de mayo del año dos mil diecisiete, dichas aspersiones se realizaron por la tarde a partir de las cuatro, lo cual se resume en la tabla 8.

Tabla 8. Diseño experimental de la investigación.

Tratamientos	Fechas de las evaluaciones de resultados y aplicaciones de los inóculos.
0 g de arroz inoculados con <i>S. lanosoniveum</i>	02/Abril/2017
900 g de arroz inoculados	17/Abril/2017
1500 g de arroz inoculados	02/Mayo/2017

Para la preparación del inóculo se vertieron cinco litros de agua sobre un recipiente plástico, luego se colocaron dentro del mismo los gramos de arroz inoculados con el hongo y se removió hasta desprender totalmente el micelio y las esporas de los granos. Posteriormente se procedió a colar, haciendo uso de una malla-colador, y se mezcló con el resto de agua (45 litros) (Anexo 5). Una vez preparado el inóculo se decantó en una bomba de mochila y se aplicó un litro del inóculo por planta de café (Figura 13).



Figura 13. Aspersión del inóculo en plantas de café.

4.4.3 Toma de datos en campo.

Para la evaluación de incidencia en las plantas de café se tomó en cuenta la metodología modificada de Feijóo 2014, la cual consistió en dividir el arbusto en tres estratos (bajo, medio y alto) y seleccionar al azar una rama de cada uno. El grado de incidencia se evaluó contabilizando, en cada rama seleccionada, el número de hojas con roya y el número de hojas sanas (Anexo 6), para la selección de las ramas se tomó en cuenta que tuviese más de tres hojas infectadas. Asimismo, para la evaluación de severidad se utilizó la metodología modificada de García 2013, para la cual se seleccionó, al azar, tres hojas infectadas de las ramas seleccionadas y se contabilizó el número de pústulas en cada una (Figura 14) y se determinó el porcentaje de daño foliar de acuerdo a la escala propuesta por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) 2013 (Figura 15), para la selección de las hojas se tomó en cuenta que no estuvieran infectadas más del 50 % debido a que la hoja cae (Anexo 7).

Las plantas de café, ramas y hojas seleccionadas se identificaron con una cinta color amarillo esto con el fin de tener un mejor control de los resultados (Figura 16 y Anexo 8). La evaluación del estado de infección que presentaban las plantas de café se realizó antes de la primera aspersion y a los quince días posteriores a cada aspersion.

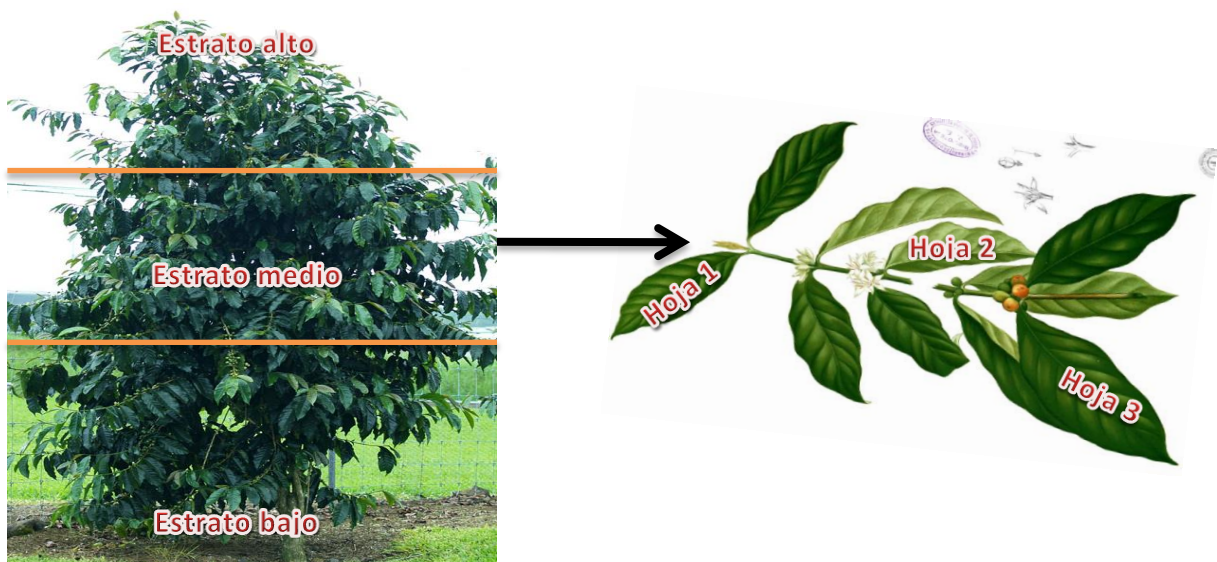


Figura 14. Esquema de los estratos en una planta de café y el número de hojas muestreadas en cada rama.

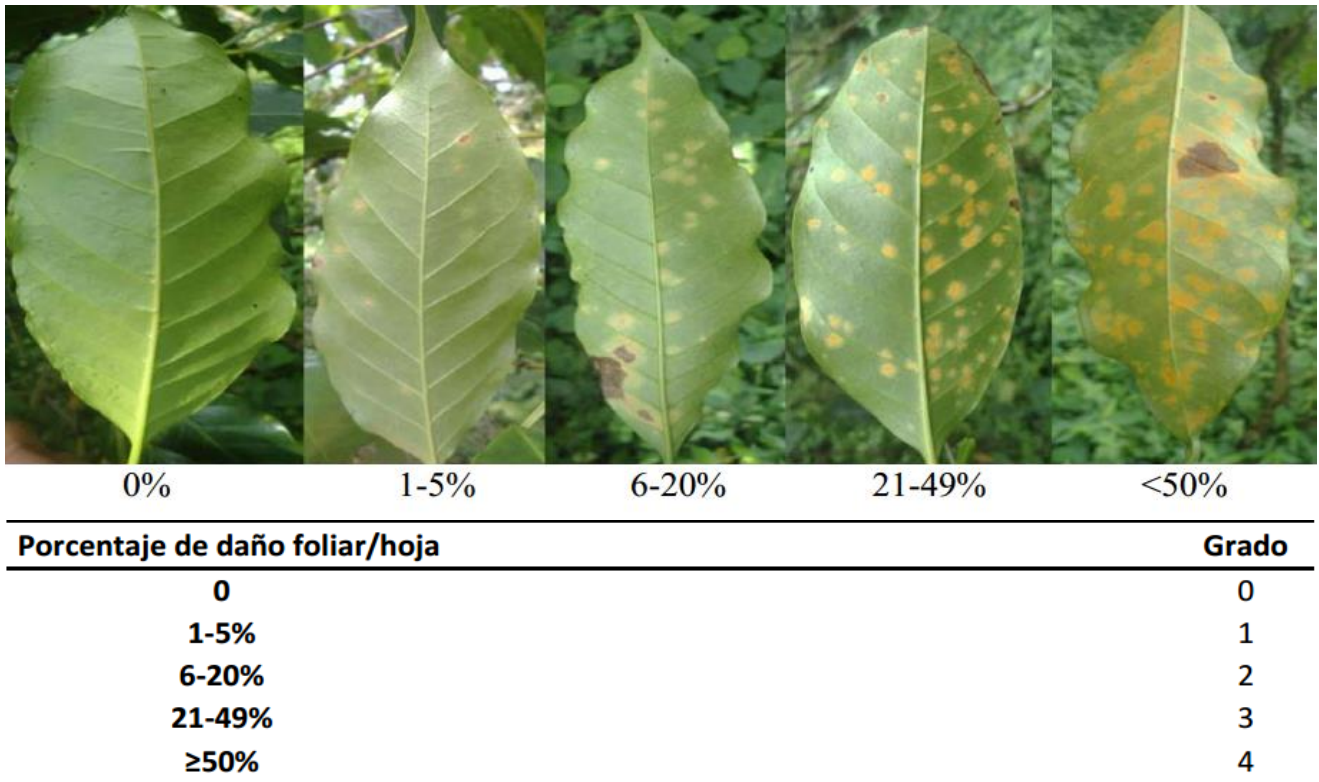


Figura 15. Escala en porcentaje de daño foliar de la roya. Fuente: SENASICA 2013.



Figura 16. Selección e identificación de plantas, ramas y hojas evaluadas.

4.5 Fase de laboratorio.

Fase que describe paso a paso desde el aislamiento, la identificación y la purificación del micoparásito *Simplicillium lanosoniveum* hasta la reproducción, conteo y medición de esporas.

4.5.1 Aislamiento y purificación de la cepa *Simplicillium lanosoniveum*.

El aislamiento y purificación del hongo foliar en PDA se realizó de acuerdo a la metodología descrita por French y Hebert 1980. Para la siembra primero se recortó, con una tijera estéril, los trozos de hoja con roya cubierta por micelio blanco, luego se desinfectaron con agua destilada estéril e hipoclorito de sodio al 3%, posteriormente con una pinza previamente esterilizada se tomó parte del micelio blanco y se colocó en una caja Petri con medio de cultivo PDA solidificado (Figura 17), finalmente las cajas Petri se sellaron, rotularon y dejaron a temperatura ambiente por quince días hasta la esporulación del hongo, esto para poder identificar el microorganismo. Una vez identificado se purificó y conservó la cepa utilizando la técnica de punta de hifa, la cual consistió en colocar una porción del micelio en el centro de la caja Petri, sobre el medio de cultivo solidificado y luego sellar y conservar a temperatura ambiente (Anexo 9). Para la obtención de cultivos puros se repitió dicho procedimiento varias veces.



Figura 17. Siembra del hongo *Simplicillium lanosoniveum* en el medio de cultivo PDA.

4.5.2 Identificación del hongo *Simplicillium lanosoniveum*.

A los quince días después del aislamiento, cuando el hongo se encontraba en fase de esporulación, se procedió a la identificación, para la cual se empleó la metodología de French y Hebert 1980, la cual consistió en utilizar claves taxonómicas de hongos para la identificación macroscópica (color, forma y tamaño de las colonias) y microscópica, para esta última se realizó preparaciones al fresco por la técnica de montaje por disección, para la cual se colocó una gota de agua destilada sobre una lámina portaobjeto y luego con una aguja de disección se colocó el micelio a identificar, Posteriormente se cubrió con una laminilla cubreobjetos y se observó en el microscopio con un aumento de 40 X y 100 X, en donde se identificó hasta género de acuerdo a las características presentadas (Figura 18 y Anexo 10). Para una mejor observación en el microscopio de las estructuras del hongo se colocó una gota de azul de lactofenol, en una esquina de la laminilla cubreobjetos para que se absorbiera rápidamente por capilaridad



Figura 18. Identificación microscópica del hongo *Simplicillium lanosoniveum*.

Para la identificación hasta especie del hongo aislado, se llevaron dos muestras del hongo, en cajas Petri descartables y debidamente rotuladas, al Laboratorio de Técnicas Moleculares Aplicadas a la Fitoprotección del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos (CIPROC) de la Universidad de Costa Rica (UCR), donde se realizó la identificación del hongo por ITS (Espaciador Transcrito Interno). De acuerdo a lo

descrito por la Dra. Mónica Blanco Meneses, el análisis del ADN se realizó a partir de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y se utilizó los cebadores universales de la región ribosomal del ITS. Los resultados fueron confirmados mediante electroforesis en gel de agarosa (0.8%) y la secuenciación se realizó mediante producto de PCR purificado a una concentración de 50 ng/ μ l.

4.5.3 Efecto de la luz en el desarrollo y producción de conidios de *Simplicillium lanosoniveum*.

De acuerdo con la metodología descrita por Valdez 2009, se estimuló el hongo con luz blanca por cuarenta y ocho horas para un mayor desarrollo en la caja Petri y una mayor producción de conidios; para ello, se hizo uso de un foco de 25 W, el cual se colocó a 40 cm de distancia sobre la superficie de las cajas Petri (Figura 19).



Figura 19. Estimulación del hongo *Simplicillium lanosoniveum* con luz blanca.

4.5.4 Reproducción de esporas de *Simplicillium lanosoniveum* en medio sólido (arroz precocido).

Después de la purificación y estimulación de la cepa se realizó la producción de esporas, para la cual primero se esterilizó los granos de cereal y luego se procedió a la inoculación de los mismos con el hongo.

La preparación de arroz por contenido de bolsa se realizó de la siguiente manera: primero se pesó 300 gramos de arroz precocido en un beaker plástico de 500 ml, seguidamente se le agregó 250 ml de agua destilada estéril y 0.125 g de tetraciclina, esto se dejó reposar por 15 minutos. Posteriormente se coló el arroz y se extendió sobre papel toalla para dejar secar por 60 minutos. Una vez seco se colocó dentro de una bolsa plástica de polipropileno, de 15 cm de largo y 10 cm de ancho, y luego está se selló con grapas y se esterilizó en la autoclave por un periodo de 15 minutos a 120 °C, después se dejó enfriar para luego refrigerar por 16 horas a una temperatura de 8 °C (Figura 20 y Anexo 11).



Figura 20. Preparación de arroz precocido para producción de esporas de *Simplicillium lanosoniveum*.

La inoculación del arroz se realizó a partir de cajas Petri conteniendo el hongo completamente extendido sobre el medio y en proceso de esporulación. Para la inoculación de ocho bolsas con 300 gramos de arroz se utilizó una caja Petri, para dicho proceso primero se vertió 15 ml de agua destilada estéril en la caja Petri y luego se realizó un raspado con una aguja de disección para el desprendimiento completo del micelio, este inóculo se vertió en un beaker que contenía 115 ml de agua destilada y se mezcló (Tabla 9). Después se procedió con una tijera previamente esterilizada a hacer un pequeño corte en la bolsa y con una jeringa estéril a inocular cada bolsa con 20 ml de la suspensión de esporas (Anexo 12). Una vez inoculadas se sellaron con grapas y tirro y posteriormente se colocaron en una caja de cartón por diez días y luego se extrajo el arroz inoculado de cada bolsa y se extendió en bandejas por una semana con el fin de eliminar cualquier rastro de humedad. Finalmente se empaquetó el contenido de cada bandeja en bolsas de polipropileno (Figura 21).

Tabla 9. Medidas adecuadas para la reproducción de *S. lanosoniveum* en ocho bolsas de polipropileno.

Contenido de gramos de arroz precocido por bolsa.	300 gramos
Número de cajas Petri conteniendo <i>S. lanosoniveum</i>.	3 cajas
Cantidad de agua destilada estéril para el desprendimiento del hongo.	15 ml
Cantidad de agua destilada estéril necesaria para inocular 8 bolsas.	115 ml
Cantidad de la suspensión necesaria para inocular el arroz.	20 ml



Figura 21. Inoculación del arroz con la suspensión de esporas de *Simplicillium lanosoniveum*.

4.5.5 Medición y conteo de esporas de *Simplicillium lanosoniveum*.

La medición de esporas se realizó utilizando el software Motic Images Plus 2.0. Para dicho procedimiento primero se calibro el programa, luego se hizo preparaciones al fresco del hongo y se observaron en el objetivo 40 X del microscopio de campo claro. Una vez identificadas las esporas a medir se procedió a enfocar y capturar la imagen de cada una de ellas en el programa, después se trazó en cada espora una línea vertical para medir el largo y una línea horizontal para medir el ancho de la misma. Este procedimiento se realizó con treinta esporas, escogidas al azar, y se obtuvo un promedio de las medidas, con el fin de obtener una medida más exacta de las esporas de *Simplicillium lanosoniveum*.

Para el conteo de esporas de los inóculos asperjados se empleó la metodología de French y Hebert 1980, la cual se realizó de la siguiente manera: primero se prepararon las suspensiones de esporas, para el inóculo de 900 gramos se pesó 18 gramos de arroz inoculado y para el inóculo de 1500 gramos se pesó 30 gramos, luego cada uno de estos se colocó en un erlenmeyer conteniendo un litro de agua destilada estéril y se

removieron con un agitador hasta obtener una mezcla homogénea. Posteriormente para cada suspensión, se tomó con un gotero Pasteur una muestra y se colocó en la ranura al centro del margen de la cámara Neubauer, donde fue rápidamente absorbida por fuerza capilar (Anexo 13). Posteriormente se observó en el microscopio a 100X y para el conteo se tomó en cuenta las esporas presentes en cinco cuadros secundarios (los cuatro esquinados y el central) del cuadro principal central (Figura 22) y se multiplicó la suma de éstos por 50,000 para obtener el número de esporas por centímetro cúbico. Este procedimiento se realizó con cinco bolsas de arroz inoculado escogidas al azar y así se obtuvo un promedio de la dosis de conidios de *Simplicillium lanosoniveum* aplicada a cada planta de café por tratamiento.

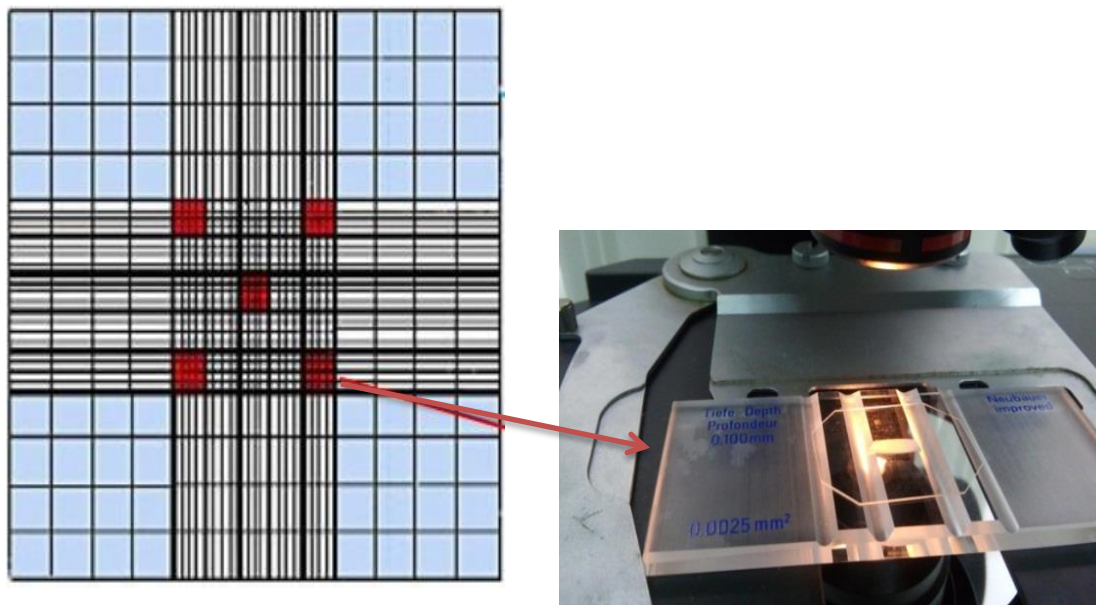


Figura 22. Vista microscópica de los cuadros tomados en cuenta en el conteo de esporas en la cámara de Neubauer.

4.6 Medición de las variables.

Las variables evaluadas en esta investigación fueron la incidencia y severidad de roya, las cuales permitieron evaluar el grado de infestación que presentaba el área de estudio.

4.6.1 Variable 1: Incidencia de roya.

El porcentaje de incidencia de roya por individuo o planta de café se determinó a partir del porcentaje de incidencia por cada rama evaluada, el cual se obtuvo empleando la fórmula descrita por Feijóo 2014, la cual se muestra a continuación:

$$PI(\%) = \frac{NHR}{NHT} \times 100$$

Donde: PI(%)= porcentaje de incidencia.

NHR= número de hojas con roya en rama evaluada.

NHT= número de hojas sanas e infectadas en rama evaluada.

4.6.2 Variable 2: Severidad de la roya.

El porcentaje de severidad se determinó a partir del daño foliar que presentaron cada una de las hojas evaluadas, este se calculó empleando la fórmula descrita por García 2013, la cual se detalla a continuación:

$$PS(\%) = \frac{(N0 * 0) + (N1 * 1) + (N2 * 2) + (N3 * 3) + (N4 * 4)}{N * 4} \times 100$$

Donde: PS(%)= porcentaje de severidad.

N0= número de hojas con valor 0 de la escala.

N1= número de hojas con valor 1 de la escala.

N2= número de hojas con valor 2 de la escala.

N3= número de hojas con valor 3 de la escala.

N4= número de hojas con valor 4 de la escala.

N= total de hojas evaluadas.

4.7 Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos en este trabajo sobre la severidad e incidencia de roya antes y después de cada aplicación del hiperparásito se compararon a través de un análisis de varianza de un factor. Para procesar los resultados utilizando el método estadístico mencionado anteriormente se hizo uso del software IBM SPSS Statistics.

4.7.1 Análisis de varianza de un factor (ANOVA).

El análisis de varianza permite comparar las medias de una determinada variable cuantitativa en tres o más grupos de datos; contrastando la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado (Universidad de Alcalá 2004). En este trabajo, se utilizó ANOVA de un factor para determinar las diferencias significativas entre las medias de incidencia y severidad de la roya, en los tratamientos y el grupo control (Anexo 17, 18, 19, 20, 21 y 22). La homogeneidad de las varianzas se determinó empleando las pruebas de Dunnett.

Según la Universidad de Alcalá 2004, la valoración de las diferencias entre las medias de los distintos grupos se resume en la siguiente fórmula:

$$SS_{\text{Total}} = SS_{\text{entre grupos}} + SS_{\text{dentro de grupos}} \quad \Rightarrow \quad F = \frac{S^2_{\text{entre grupos}}}{S^2_{\text{dentro de grupos}}}$$

Dónde: SS = suma de cuadrados

S^2 = varianza.

V. RESULTADOS

5.1 Descripción morfológica del hongo aislado *Simplicillium lanosoniveum*.

El aislamiento del hongo se realizó a partir de pústulas de roya de café parasitadas por un micelio blanco, el cual se trasladó en medio PDA, donde se desarrolló en un periodo de diez días a temperatura ambiente; presentó las características descritas por Zare y Gams (2001) y Lim *et al.* (2014), como lo son un micelio color blanco con apariencia algodonosa y en la parte inferior del medio un halo color amarillo cremoso (Figura 23).

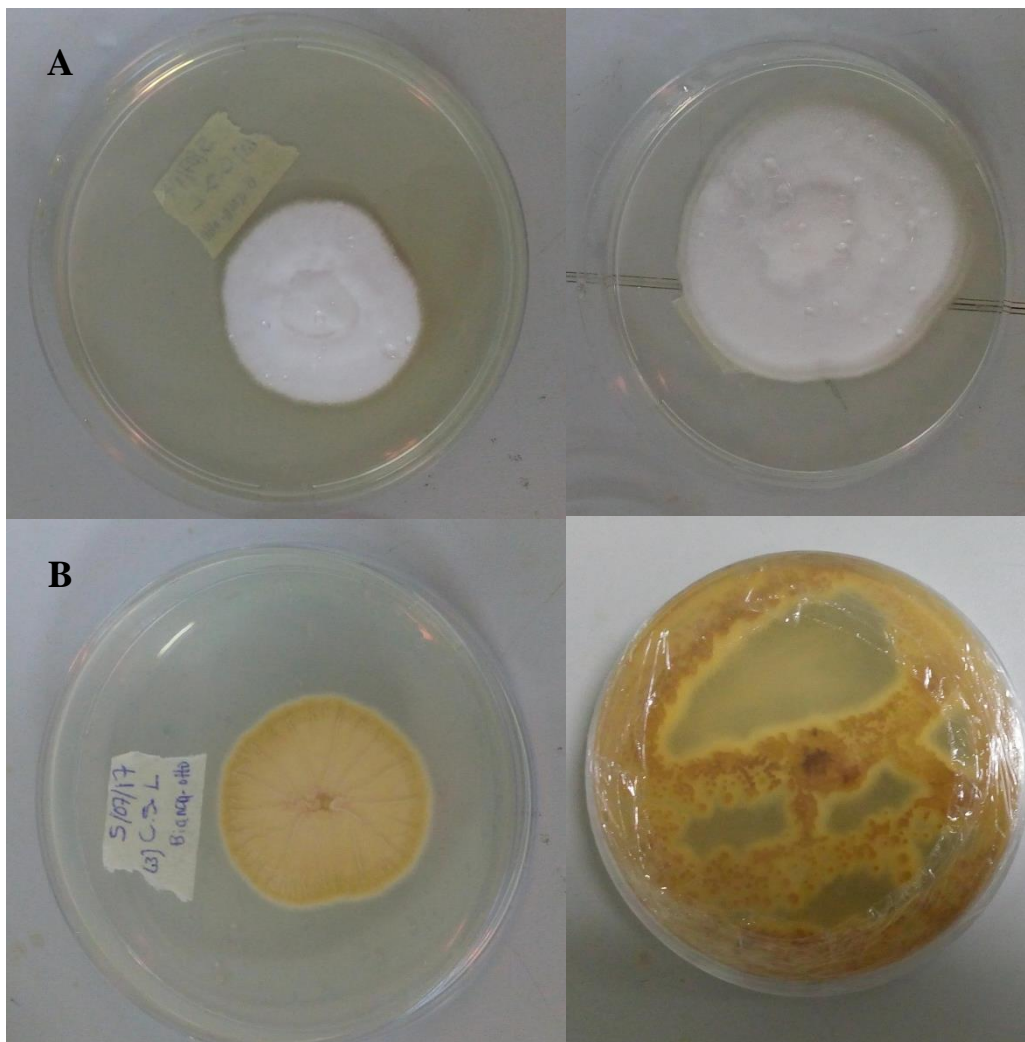


Figura 23. Morfología colonial de *Simplicillium lanosoniveum*. A) parte superior del medio. B) parte inferior del medio.

Al observarlo al microscopio, presentó las características descritas por Zare y Gams (2001), Sung *et al.* (2007) y Ward (2011); es decir, se observaron células conidiógenas largas, estrechas y no segmentadas que surgen de hifas aéreas postradas, siempre solitarias o individuales y sin ramificaciones verticiladas, lo cual se puede constatar en la figura 24.

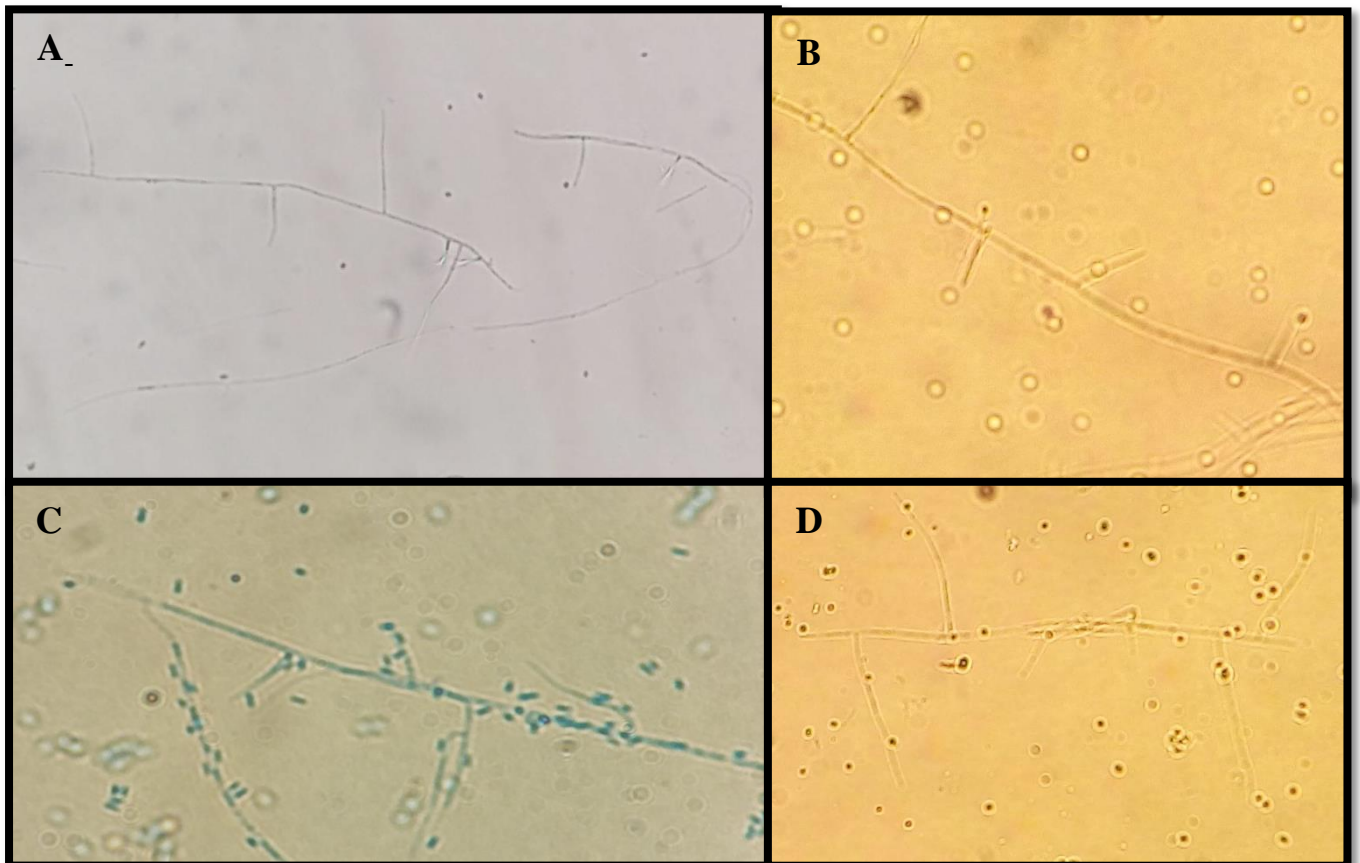


Figura 24. Estructura microscópica del hongo hiperparásito *Simplicillium lanosoniveum*. A) Fiálides no teñidas observadas con un aumento de 40X. B) Fiálides y conidios no teñidos a un aumento de 40X. C) Fiálides y conidios teñidos con lactofenol a un aumento de 40X. D) células conidiógenas observadas al natural en el microscopio con un aumento de 40X.

5.1.1 Medición de esporas de *Simplicillium lanosoniveum*.

Los conidios fueron obtenidos de una colonia de cultivo monospórico, reproducido en medio PDA a temperatura ambiente. Se observó que los conidios de esta especie son pequeños, de coloración verdusca y bastante variables en su forma (sud-globosos, oval o elipsoidal a sub-cilíndricos), tal como lo describen a *S. lanosoniveum* Zare y Gams (2001) (Figura 25).

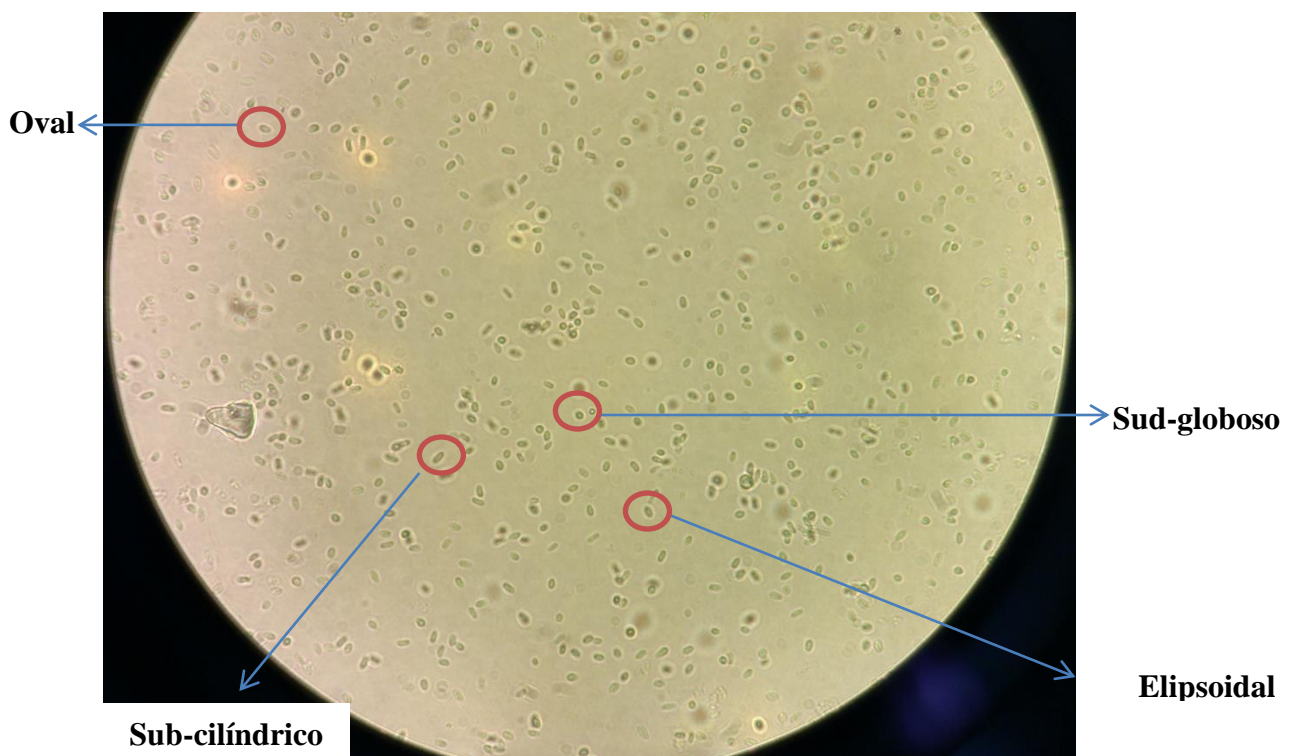


Figura 25. Diversidad de formas identificadas en los conidios de *Simplicillium lanosoniveum*.

Con el programa Motic Image Plus se realizaron las lecturas de las dimensiones (ancho y largo) de los 30 conidios medidos, las cuales indicaron que el tamaño puede variar entre 1,5-3,5 x 0,7-1,5 μm , tal y como lo detallan Zare y Gams (2001), ya que el promedio de largo obtenido fue de 1.8 μm y el promedio de ancho fue de 1.5 μm (Figura 26).

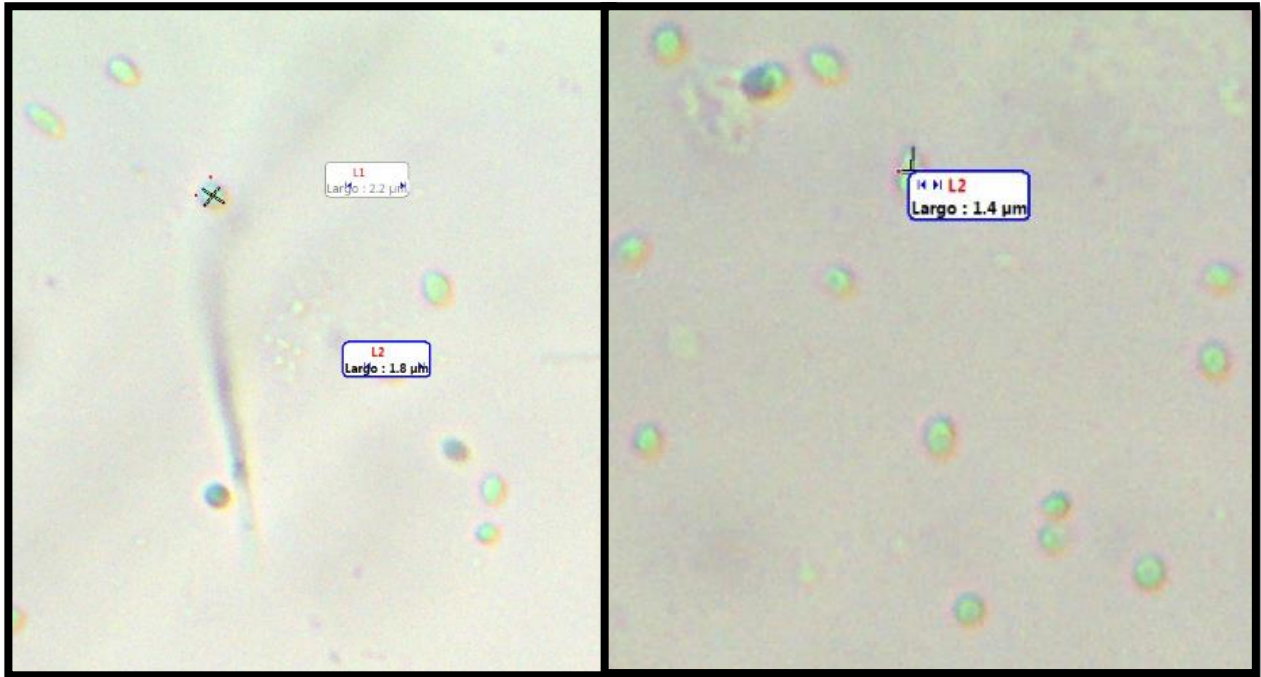


Figura 26. Lectura de las dimensiones de las esporas de *Simplicillium lanosoniveum*.

5.2 Identificación molecular del hiperparásito aislado.

En el análisis de ADN ribosomal mediante la técnica molecular de ITS (espaciadores internos transcritos) realizado por el Laboratorio de Técnicas Moleculares Aplicadas a la Fitoprotección de la UCR, se detectó que la cepa aislada y aplicada a las plantas de café infectadas con roya corresponde en un 99% de similitud con muestras de *Simplicillium lanosoniveum*, ya que de un total de 600 bases analizadas 593 bases corresponden según el BLAST (GenBank- NCBI) a la secuencia genética de *S. lanosoniveum* con número de accesoión o raza KT878334.1 (Anexo 14, 15 y 16), el cual de acuerdo a la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica fue descubierta por Yao *et al.* 2015 (Figura 27).

Organism	LSU sequence	Strain	References	Source
<i>S. lanosoniveum</i>	AB758126.1	TAMA 173	Tsuchiya and Okuda 2012	Dead Aphidoidea
<i>S. lanosoniveum</i>	AF339553.1	CBS 704.86	Sung et al 2001	-
<i>S. lanosoniveum</i>	AF339603.1	IMI 317442	Sung et al 2001	-
<i>S. lanosoniveum</i>	AJ292395.1	IMI 317442	Zare 2000	-
<i>S. lanosoniveum</i>	AJ292396.1	CBS 704.86	Zare and Gams 2001	-
<i>S. lanosoniveum</i>	DQ522358.1	CBS 704.86	Sung et al 2006	-
<i>S. lanosoniveum</i>	DQ522405.1	CBS 101267	Sung et al 2006	-
<i>S. lanosoniveum</i>	DQ522527.1	CBS 704.86	Spatafora et al 2006	-
<i>S. lanosoniveum</i>	EF469048.1	CBS 101267	Sung et al 2007	-
<i>S. lanosoniveum</i>	EF469049.1	CBS 704.86	Sung et al 2007	-
<i>S. lanosoniveum</i>	EF512887.1	IMI 303103b	Kouvelis et al 2007	-
<i>S. lanosoniveum</i>	EF641862.1	CBS 962.72	Zare and Gams 2007	-
<i>S. lanosoniveum</i>	EU284715.1	Btab03	Lee and Park 2007	-
<i>S. lanosoniveum</i>	EU939525.1	Cs0701	Chen et al 2008	Giant salvinia
<i>S. lanosoniveum</i>	FJ861375.1	1T9BA	Greengarten et al 2009	Tick
<i>S. lanosoniveum</i>	HQ232185.1	CBS 321.72	Summerbell et al 2010	-
<i>S. lanosoniveum</i>	HQ270476.1	D082307-2A	Ward et al 2010	Soybean rust on soybean
<i>S. lanosoniveum</i>	JN116646.1	PSU-ES104	Supaphon et al 2011	-
<i>S. lanosoniveum</i>	KC008871.1	41559-3	Rajkumar and Chaturvedi 2012	Cave and mine
<i>S. lanosoniveum</i>	KM035981.1	vec1_01	Baiswar and Ngachan 2014	-
<i>S. lanosoniveum</i>	KM035982.1	vec1_02	Baiswar and Ngachan 2015	-
<i>S. lanosoniveum</i>	KP276771.1	ARSEF7550	Mitina et al 2014	-
<i>S. lanosoniveum</i>	KR424457.1	GA-B1	Magotra et al 2015	-
<i>S. lanosoniveum</i>	KT878334 .1	02502	Yao et al 2015	BALF
<i>S. lanosoniveum</i>	KU183022.1	TYL001	Wang et al 2015	-
<i>S. lanosoniveum</i>	KX034391.1		Xiang et al 2016	Hair
<i>S. lanosoniveum</i>	KX395184.1	F2	Shen et al 2016	-

Figura 27. Secuencias de ITS para la especie *Simplicillium lanosoniveum*. Fuente: Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) 2017.

5.3 Producción de esporas de *S. lanosoniveum*.

Las concentraciones de esporas aplicadas a cada planta de café fueron distintas para cada tratamiento. La dosis para el tratamiento uno fue de dieciocho gramos de arroz inoculados por litro de agua, la cual contenía 2.4×10^7 esporas por mililitro. En cambio, la dosis para el tratamiento dos correspondió a treinta gramos de arroz inoculados por litro de agua, la cual contenía 3.21×10^7 conidios por mililitro (Tabla 10).

Tabla 10. Dosis y promedios de concentraciones de esporas de *S. lanosoniveum* aplicadas en las plantas de café.

Tratamientos	Dosis del hongo	Concentración de esporas
GC	Testigo (cero aplicación)	0 ml.
T1	18 g. de arroz inoculados con <i>S. lanosoniveum</i> /lt de agua. 900 g./50 lt de agua.	2.4×10^7 ml.
T2	30 gr. de arroz inoculados con <i>S. lanosoniveum</i> /lt de agua. 1500 g./50 lt de agua.	3.21×10^7 ml.

5.4 Período de colonización de pústulas de roya de café por *S. lanosoniveum*.

En este estudio, se observó que *S. lanosoniveum* parasita al fitopatógeno *Hemileia vastatrix* cuando se encuentra en la fase de multiplicación o liberación de inóculo. El micelio blanco característico del hongo *S. lanosoniveum* comienza a desarrollarse levemente sobre el centro de las pústulas de roya, después de los 10 días de la aplicación, esta etapa aún es casi imperceptible visualmente ya que el micelio no es espeso y puede confundirse con la tonalidad amarilla de la pústula. A los trece días de la aspersión del hongo, el desarrollo del micelio sobre la pústula es mucho más espeso y cubre alrededor del 40% al 50 % de la misma. La colonización completa o a un 90% se observa a los 15 días posteriores a la inoculación (Figura 28) y a diferencia de *Lecanicillium lecanii* no deja necrosis en la hoja. Además este hiperparásito mostró una tendencia a secar las pústulas cuando apenas empiezan a aparecer en las hojas.

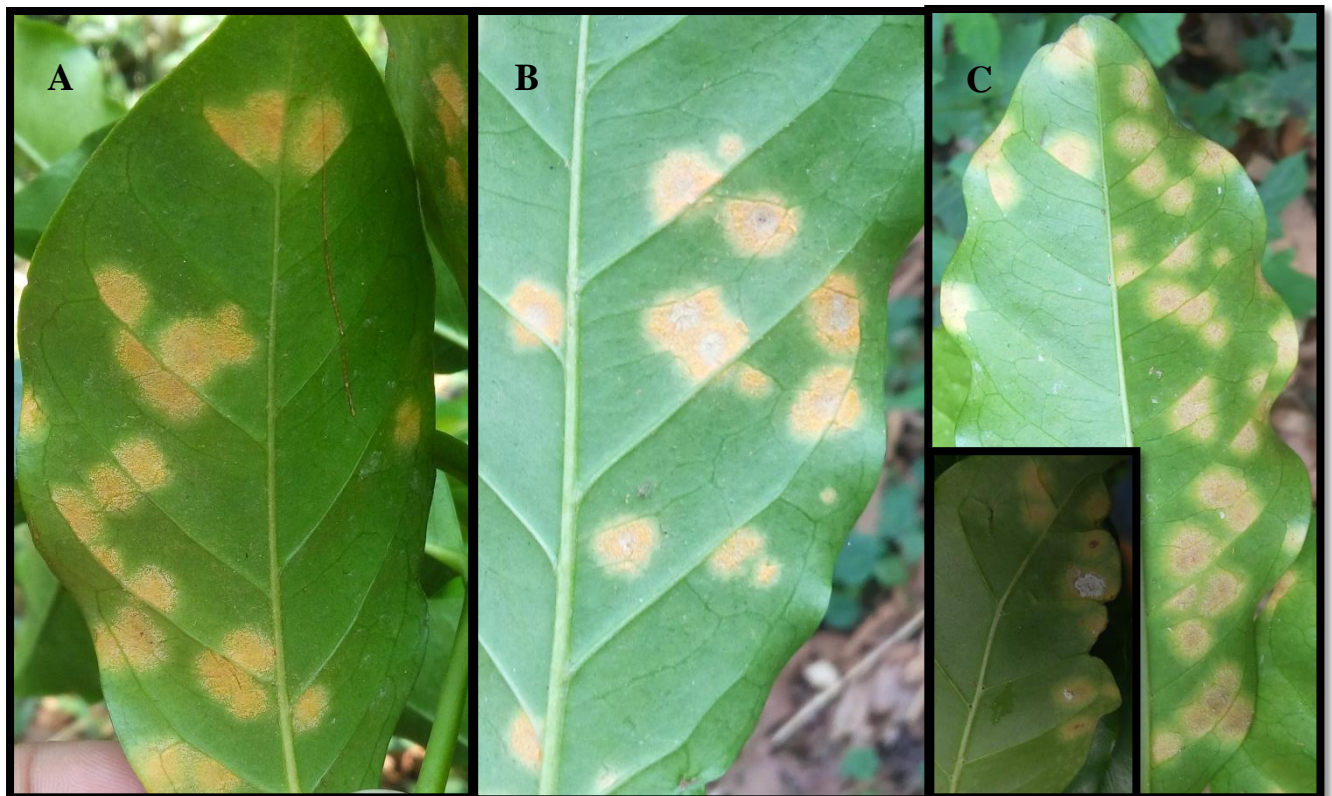


Figura 28. Colonización de la pústula de roya por *S. lanosoniveum*. A) a los 10 días, B) a los 13 días. C) pústula totalmente colonizada a los 15 días.

5.5 Resultados estadísticos de incidencia de roya.

El análisis de varianza para cada tratamiento y el grupo control demuestra que existe una diferencia altamente significativa entre la primera hasta la última evaluación de incidencia, ya que el valor de P para cada uno es menor a 0,05, lo cual indica que efectivamente las evaluaciones son estadísticamente diferentes en los tratamientos (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis de varianza de incidencia de roya en los tratamientos y el grupo control.

	Suma de cuadrados	GL	Media Cuadrática	F	Sig.
Tratamiento 1					
Inter-grupos	4920,640	3	1640,213	70,949	0,000
Intra-grupos	4531,151	196	23,118		
Tratamiento 2					
Inter-grupos	20935,358	3	6978,453	474,189	0,000
Intra-grupos	2884,454	196	14,717		
Grupo control					
Inter-grupos	374,903	3	124,968	7,939	0,000050
Intra-grupos	3085,147	196	15,741		

En la tabla 12, se resumen las diferencias significativas existentes entre cada evaluación de incidencia efectuada, la cual nos indica que entre la primera (0 días) y la última (45 días) evaluación en los dos tratamientos y el grupo control existe una diferencia altamente significativa. De igual manera, muestra que existen diferencias significativas en el tratamiento dos, entre la primera y segunda evaluación con la tercera evaluación. Asimismo la comparación de los promedios, en porcentaje, de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control se muestra en la figura 29.

Tabla 12. Diferencias significativas de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control a través del tiempo muestreado.

Categorías de la variable		Tratamiento 1	Tratamiento 2	Grupo control
		(Sig.)	(Sig.)	(Sig.)
Cero días	Quince días	1,000	1,000	1,000
	Treinta días	0,215	0,000*	0,116
	Cuarenta y cinco días	0.000*	0,000*	0,000*
Quince días	Cero días	1,000	1,000	1,000
	Treinta días	0,215	0,000*	0,126
	Cuarenta y cinco días	0.000*	0,000*	0,000*
Treinta días	Cero días	0,215	0,000*	0,116
	Quince días	0,215	0,000*	0,126
	Cuarenta y cinco días	0.000*	0,000*	0,228

*Evaluaciones de incidencia con diferencias significativas.

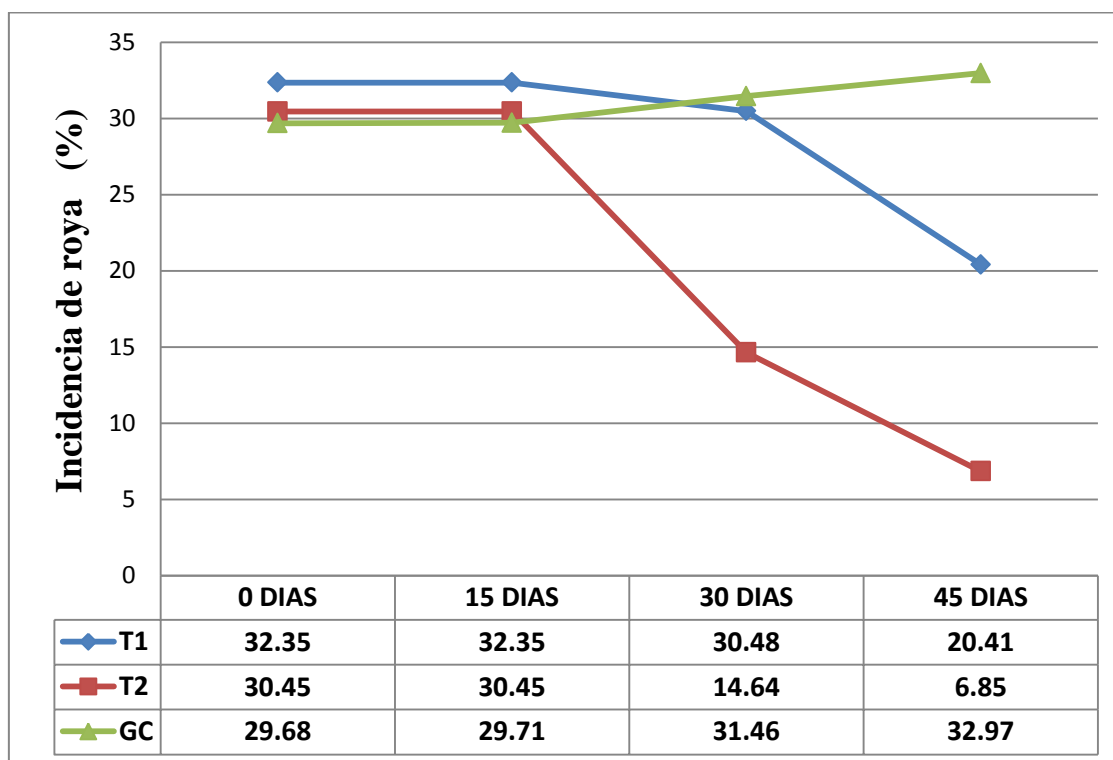


Figura 29. Comparación de los promedios, en porcentaje, de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control a través del tiempo muestreado.

En la figura 29, se presentan los promedios, en porcentaje, de incidencia de cada tratamiento y grupo control por evaluación efectuada, se visualiza una disminución de incidencia de roya en los tratamientos y un aumento en el grupo control; es decir, en el

tratamiento uno se redujo la incidencia de un 32,35 % a 20,41% y en el tratamiento dos disminuyó de un 30,45% a 6,85%, en cambio el grupo control presentó un aumento del 29,68% a 32,97%.

5.5.1 Incidencia de roya a los 0 días (antes de la aplicación).

La tabla 13 muestra el análisis de varianza de incidencia de roya antes de la aplicación de los inóculos, y de acuerdo con el valor de P ($< 0,05$) se detecta una diferencia significativa en la incidencia de roya de los tratamientos y el grupo control.

Tabla 13. Análisis de varianza de incidencia de roya a los 0 días.

	Suma de cuadrados	GL	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	188,285	2	94,142	5,321	0,006
Intra-grupos	2601,038	147	17,694		
Total	2789,322	149			

Los tratamientos con diferencias significativas de incidencia de roya antes de la aspersión se resumen en la tabla 14, en la cual se observa que el tratamiento uno y el grupo control son estadísticamente diferentes, ya que el valor de P es de 0,005 y presentan una diferencia de medias de 2,66600. Asimismo, la figura 30 muestra la comparación de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control antes de la aplicación de los inóculos.

Tabla 14. Diferencias significativas de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 0 días.

Categorías de la variable		Diferencia de medias	Sig.
Tratamiento 1	Tratamiento 2	1,89680	0,066
	Grupo control	2,66600*	0,005
Tratamiento 2	Tratamiento 1	-1,89680	0,066
	Grupo control	0,76920	0,632

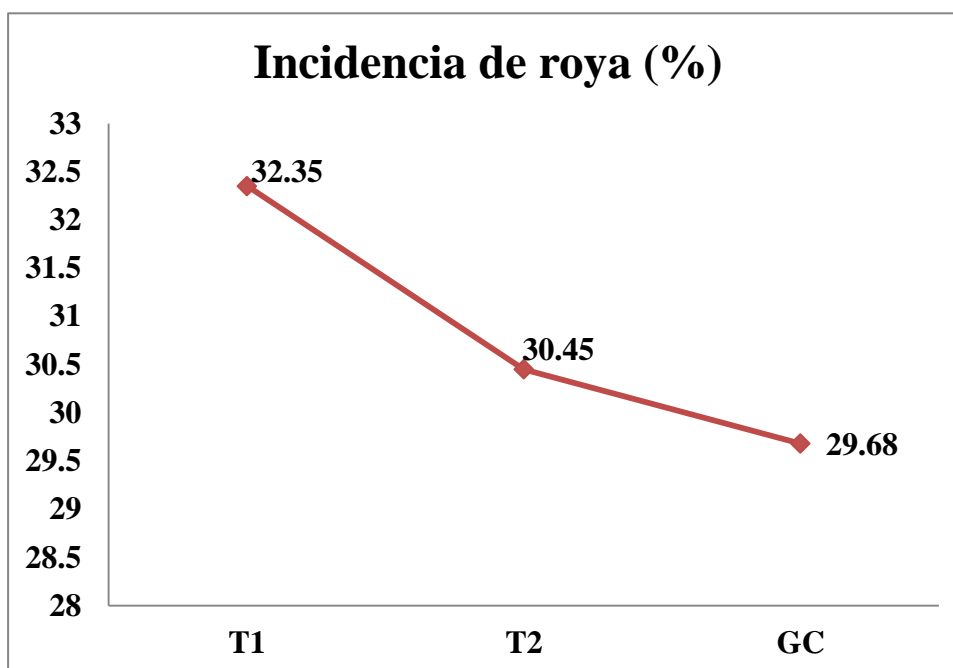


Figura 30. Comparación de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 0 días.

En la figura 30 se muestra los promedios de incidencia de roya de los tratamientos y grupo control antes de la aplicación de los inóculos, se visualiza que los porcentajes de incidencia entre los tratamientos uno y dos difieren en 1,9%; en cambio, el tratamiento uno y el grupo control difieren un 2,67% por lo que son estadísticamente diferentes, lo cual nos indica que la roya no estaba repartida en forma uniforme en toda la plantación.

5.5.2 Incidencia de roya a los 15 días (después de la aplicación).

El análisis de varianza de incidencia de roya a los 15 días después de la aplicación de los inóculos se resume en la tabla 15, en la cual se indicó que el valor de P es menor a 0,05 por lo que se deduce que existen diferencias significativas en la incidencia de roya de los tratamientos y el grupo control.

Tabla 15. Análisis de varianza de incidencia de roya a los 15 días.

	Suma de cuadrados	GL	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	184,857	2	92,428	5,242	0,006
Intra-grupos	2592,118	147	17,633		
Total	2776,974	149			

En la tabla 16 se indican los tratamientos con diferencias significativas de incidencia de roya, en la primera evaluación después de la aplicación. Se registró una diferencia de medias de 2,63580 y un valor de P menor a 0,05 para el tratamiento uno y el grupo control, por lo que son estadísticamente diferentes. Además se muestra en la figura 31, la comparación de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 15 días después de la aplicación de los inóculos.

Tabla 16. Diferencias significativas de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 15 días.

Categorías de la variable		Diferencia de medias	Sig.
Tratamiento 1	Tratamiento 2	1,89680	0,092
	Grupo control	2,63580*	0,009
Tratamiento 2	Tratamiento 1	-1,89680	0,092
	Grupo control	0,73900	0,719

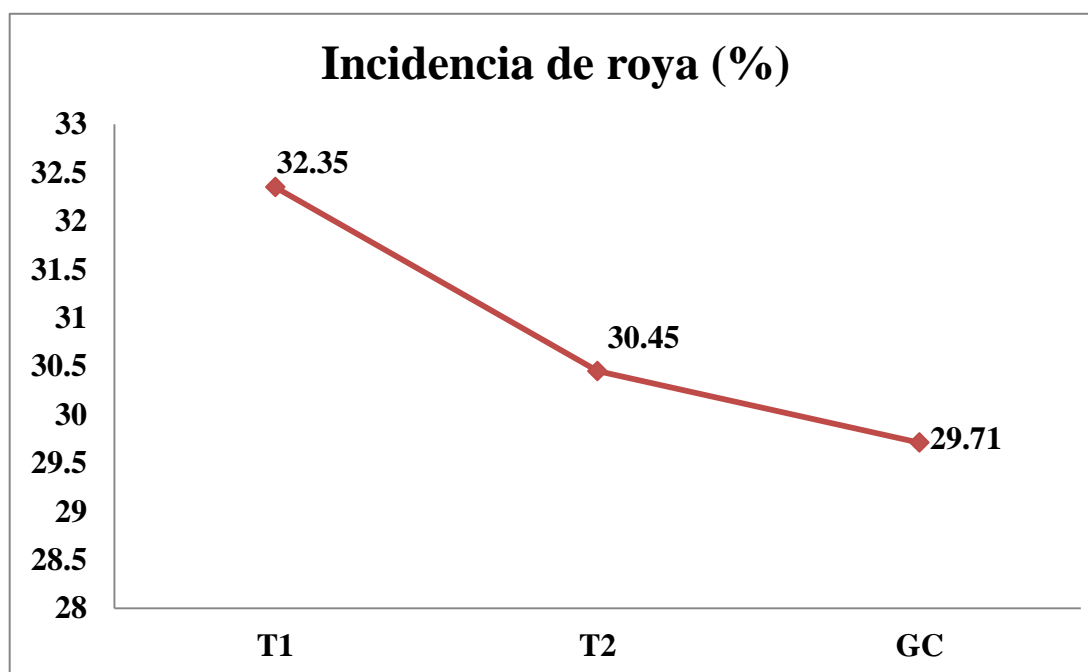


Figura 31. Comparación de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 15 días.

La figura 31 presenta los promedios de incidencia de cada tratamiento y grupo control a los 15 días después de la aplicación, los cuales indican que los tratamientos uno y dos mantuvieron los porcentajes de incidencia de roya de 32,35% y 30,45% respectivamente. Sin embargo, el grupo control presentó un leve aumento de 0,03%, ya que en la evaluación anterior se registró una incidencia del 29,68%.

5.5.3 Incidencia de roya a los 30 días (después de la aplicación).

La tabla 17 muestra el análisis de varianza de incidencia de roya a los 30 días después de la aplicación de los inóculos, en la cual se indica el valor de P es menor a 0,05, por lo tanto se detecta diferencias significativas en la incidencia de roya de los tratamientos y el grupo control.

Tabla 17. Análisis de varianza de incidencia de roya a los 30 días.

	Suma de cuadrados	GL	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	8916,064	2	4458,032	240,225	0,000
Intra-grupos	2727,989	147	18,558		
Total	11644,052	149			

Los tratamientos con diferencias significativas de incidencia de roya en la segunda evaluación después de la aplicación de los inóculos se resumen en la tabla 18, en la cual se indica que el tratamiento dos presenta diferencias significativas con el tratamiento uno y el grupo control, por lo que son estadísticamente diferentes. De igual manera, se muestra en la figura 32 la comparación de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 30 días después de la aplicación de los inóculos.

Tabla 18. Diferencias significativas de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 30 días.

Categorías de la variable		Diferencia de medias	Sig.
Tratamiento 1	Tratamiento 2	15,84480*	0,000
	Grupo control	-0,97640	0,584
Tratamiento 2	Tratamiento 1	-15,84480*	0,000
	Grupo control	-16,82120*	0,000

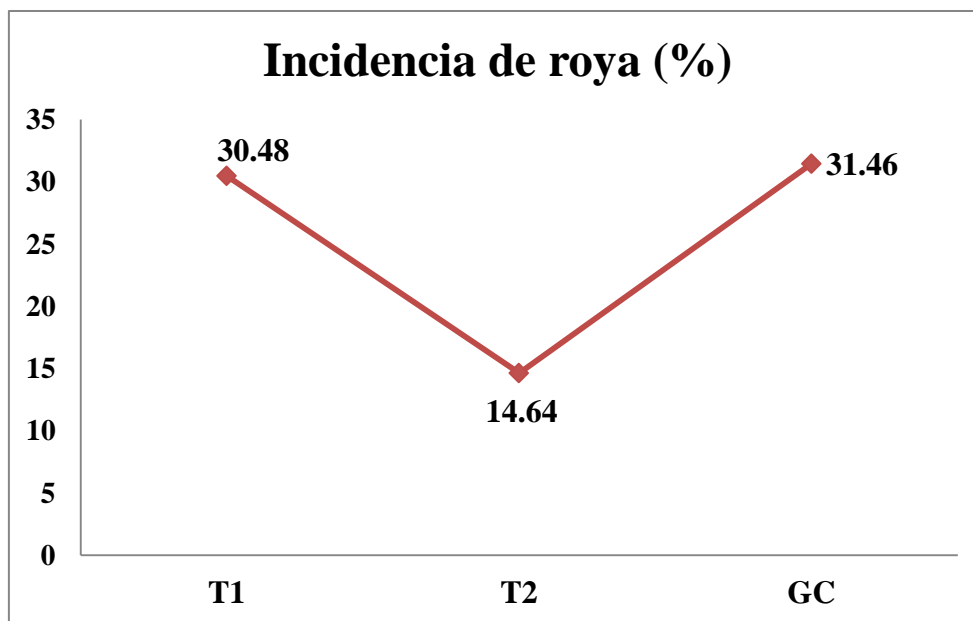


Figura 32. Comparación de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 30 días.

En la figura 32 se visualiza los promedios de incidencia de cada tratamiento y grupo control a los 30 días después de la aplicación de los inóculos, el cual muestra que los tratamientos uno y dos disminuyeron los porcentajes de incidencia de roya de 32,35% a 30,48% y de 30,45% a 14,64% respectivamente. Sin embargo, el grupo control presentó un aumento de 1,75%, ya que en la evaluación anterior se registró una incidencia del 29,71%.

5.5.4 Incidencia de roya a los 45 días (después de la aplicación).

El análisis de varianza de la incidencia de roya a los 45 días después de la aplicación de los inóculos se resume en la tabla 19, en la cual se indicó que el valor de P es 0,000 un número menor de 0,05 por lo que se deduce que existen diferencias significativas en la incidencia de roya de los tratamientos y el grupo control.

Tabla 19. Análisis de varianza de incidencia de roya a los 45 días.

	Suma de cuadrados	GL	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	17071,068	2	8535,534	486,401	0,000
Intra-grupos	2579,609	147	17,548		
Total	19650,677	149			

En la tabla 20 se indican los tratamientos con diferencias significativas de incidencia de roya, en la tercera evaluación después de la aplicación de los inóculos. Se registró un valor de P menor a 0,05 para todos los tratamientos por lo que se deduce que son estadísticamente diferentes. Además en la figura 33, se muestra la comparación de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 45 días después de la aplicación de los inóculos.

Tabla 20. Diferencias significativas de incidencia de roya entre los tratamientos a los 45 días.

Categorías de la variable		Diferencia de medias	Sig.
Tratamiento 1	Tratamiento 2	13,55780*	0,000
	Grupo control	-12,56720*	0,000
Tratamiento 2	Tratamiento 1	-13,55780*	0,000
	Grupo control	-26,12500*	0,000

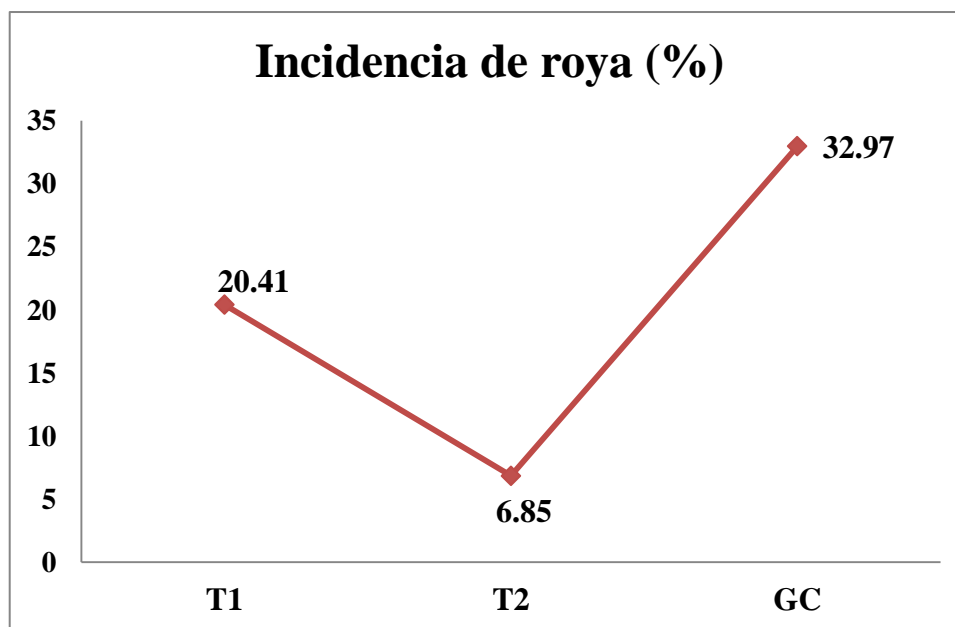


Figura 33. Comparación de incidencia de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 45 días.

En la figura 33 se presentan los promedios de incidencia de cada tratamiento y grupo control a los 45 días después de la aplicación de los inóculos, se visualiza que el tratamiento uno disminuyó el porcentaje de incidencia a 20,41% y el tratamiento dos a 6,85%, lo cual nos indica que se redujo la incidencia de la enfermedad un 11,94% para

el tratamiento uno y un 23,6% para el tratamiento dos. En cambio, el grupo control presentó un aumento de 3,29%, ya que en la primera evaluación se registró un porcentaje de incidencia del 29,68%.

5.6 Resultados estadísticos de severidad de roya.

El análisis de varianza para cada tratamiento y el grupo control demuestra que existe una diferencia altamente significativa entre la primera hasta la última evaluación de severidad, ya que el valor de P para cada uno es menor a 0,05 deducimos que los tratamientos son estadísticamente diferentes (Tabla 21).

Tabla 21. Análisis de varianza de la severidad de la roya en los tratamientos y el grupo control.

	Suma de cuadrados	GL	Media Cuadrática	F	Sig.
Tratamiento 1					
Inter-grupos	1589,447	3	529,816	231,921	0,000
Intra-grupos	447,755	196	2,284		
Tratamiento 2					
Inter-grupos	2165,951	3	721,984	477,173	0,000
Intra-grupos	296,556	196	1,513		
Grupo control					
Inter-grupos	35,295	3	11,765	3,102	0,028
Intra-grupos	743,274	196	3,792		

En la tabla 22 se resumen las diferencias significativas existentes entre cada evaluación de severidad efectuada, la cual nos indica que entre la primera (0 días) y la última (45 días) evaluación en los dos tratamientos y el grupo control existe una diferencia altamente significativa. De igual manera, se muestra diferencias significativas en el tratamiento dos, entre la primera y segunda con la tercera evaluación. También se muestra en la figura 34, la comparación de severidad de roya entre los tratamientos y el grupo control.

Tabla 22. Diferencias significativas de la severidad de la roya entre los tratamientos y el grupo control a través del tiempo muestreado.

Categorías de la variable		Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
		(Sig.)	(Sig.)	(Sig.)
Cero días	Quince días	0.000*	1,000	0,000*
	Treinta días	0.000*	0,000*	0,000*
	Cuarenta y cinco días	0.000*	0,000*	0,000*
Quince días	Cero días	0.000*	1,000	0,000*
	Treinta días	0.000*	0,000*	0,000*
	Cuarenta y cinco días	0.000*	0,000*	0,000*
Treinta días	Cero días	0.000*	0,000*	0,000*
	Quince días	0.000*	0,000*	0,000*
	Cuarenta y cinco días	0.000*	0,000*	0,000*

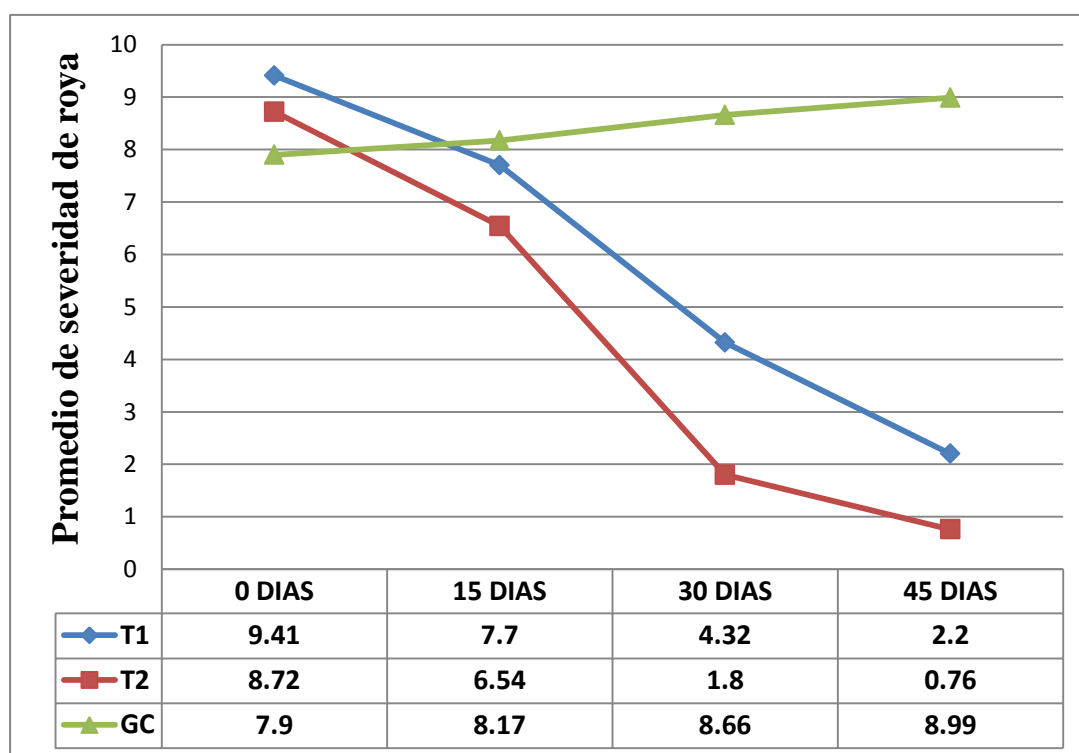


Figura 34. Comparación de los promedios de severidad de roya entre los tratamientos y el grupo control a través del tiempo muestreado.

En la figura 34, se presentan los promedios de severidad de cada tratamiento y grupo control por evaluación efectuada, se visualiza una disminución del número de pústulas en los tratamientos y aumento en el grupo control; es decir, en el tratamiento uno se redujo el promedio de número de pústulas por hoja de 9,41 a 2,2 y en el tratamiento dos

disminuyó de 8,72 a 0,76, en cambio el grupo control presentó un aumento de 7,9 a 8,99.

5.6.1 Severidad de la roya en el estrato bajo a los 0 días (antes de la aplicación).

La tabla 23 muestra el análisis de varianza de severidad de roya en el estrato bajo antes de la aplicación de los inóculos, la cual nos indica que el valor de P 0,036 es menor a 0,05, por lo que se detecta diferencias significativas en la severidad de los tratamientos y el grupo control.

Tabla 23. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato bajo a los 0 días.

	Suma de cuadrados	GL	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	449,493	2	224,747	3,402	0,036
Intra-grupos	9710,000	147	66,054		
Total	10159,493	149			

Los tratamientos con diferencias significativas de severidad de roya en el estrato bajo antes de la aplicación se resumen en la tabla 24, en la cual se observa que el tratamiento uno y el grupo control son estadísticamente diferentes, ya que el valor de P es de 0,035 y presentan una diferencia de medias de 4,240. En la figura 35, se muestra la comparación de severidad de roya entre los tratamientos y el grupo control antes de la aplicación de los inóculos.

Tabla 24. Diferencias significativas de la severidad de la roya, en el estrato bajo, entre los tratamientos y el grupo control a los 0 días.

Categorías de la variable		Diferencia de medias	Sig.
Tratamiento 1	Tratamiento 2	2,080	0,494
	Grupo control	4,240*	0,035
Tratamiento 2	Tratamiento 1	-2,080	0,494
	Grupo control	2,160	0,444

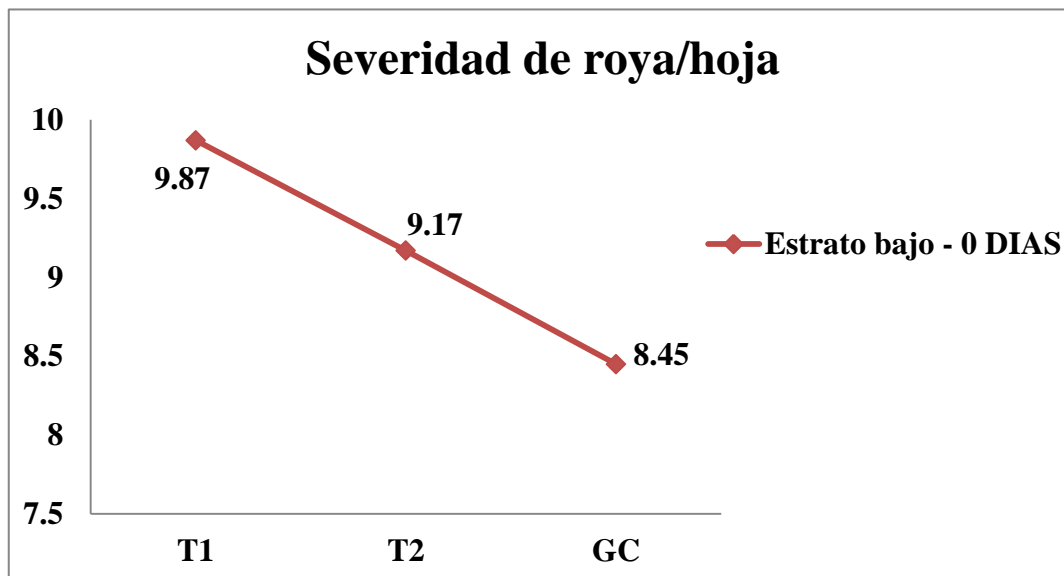


Figura 35. Comparación de los promedios de severidad de la roya, en el estrato bajo, entre los tratamientos y el grupo control a los 0 días.

En la figura 35, se muestra los promedios de severidad de roya en el estrato bajo de los tratamientos y grupo control antes de la aplicación de los inóculos, se visualiza que los promedios generales de número de pústulas por hoja entre los tratamientos uno y dos difieren solamente en 0,7; en cambio, el tratamiento uno y el grupo control difieren en 1,42 por lo que son estadísticamente diferentes, lo cual nos indica que la relación de hoja por pústula no era uniforme entre los tratamientos.

5.6.2 Severidad de la roya en el estrato medio a los 0 días (antes de la aplicación).

En la tabla 25 se muestra el análisis de varianza de severidad de roya en el estrato medio antes de la aplicación de los inóculos, la cual nos indica que el valor de P es de 0,001, por lo que se detecta diferencias significativas en la severidad de los tratamientos y el grupo control.

Tabla 25. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato medio a los 0 días.

	Suma de cuadrados	GL	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	750,893	2	375,447	7,176	0,001
Intra-grupos	7690,680	147	52,318		
Total	8441,573	149			

Los tratamientos con diferencias significativas de severidad de roya en el estrato medio antes de la aplicación se resumen en la tabla 26, en la cual se observa que el tratamiento uno y el grupo control son estadísticamente diferentes, ya que el valor de P es de 0,001 y presentan una diferencia de medias de 5,460. La figura 36 muestra la comparación de la severidad de roya entre los tratamientos y el grupo control antes de la aplicación de los inóculos.

Tabla 26. Diferencias significativas de la severidad de la roya, en el estrato medio, entre los tratamientos y el grupo control a los 0 días.

Categorías de la variable		Diferencia de medias	Sig.
Tratamiento 1	Tratamiento 2	2,320	0,247
	Grupo control	5,460*	0,001
Tratamiento 2	Tratamiento 1	-2,320	0,247
	Grupo control	3,140	0,080

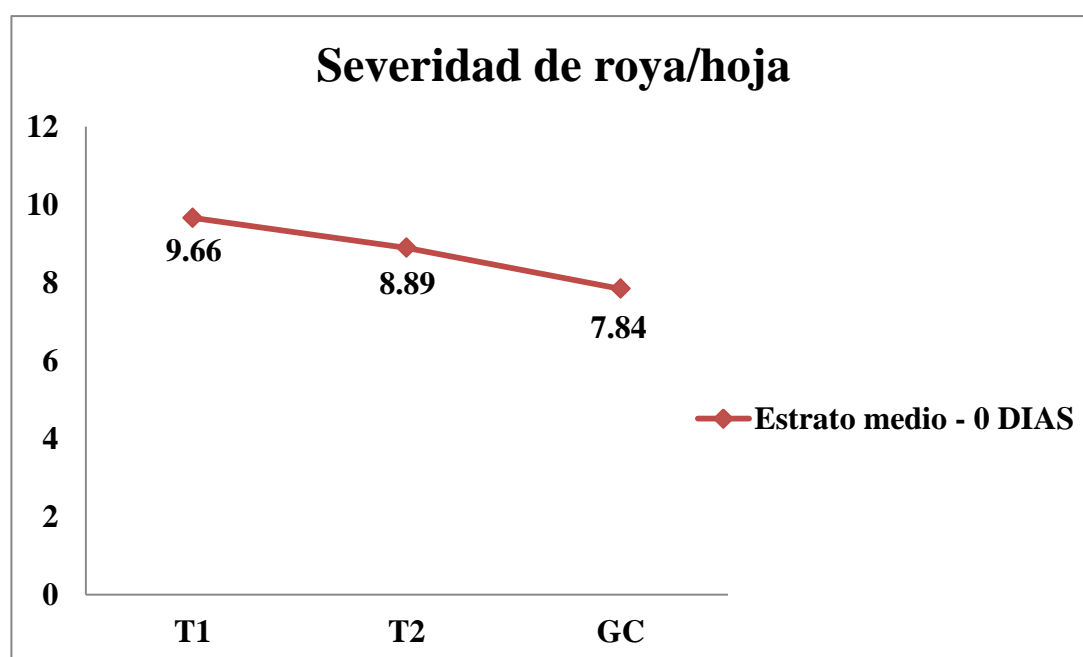


Figura 36. Comparación de los promedios de severidad de la roya, en el estrato medio, entre los tratamientos y el grupo control a los 0 días.

En la figura 36, se muestra los promedios de severidad de roya en el estrato medio de los tratamientos y grupo control antes de la aplicación de los inóculos, se visualiza que los promedios generales de número de pústulas por hoja entre los tratamientos uno y dos difieren solamente en 0,77; en cambio, el tratamiento uno y el grupo control difieren en 1,82 por lo que son estadísticamente diferentes, lo cual nos indica que la relación de hoja por pústula no fue uniforme entre los tratamientos. Asimismo, se observa que el promedio de número de pústulas por hoja para el estrato medio es menor al promedio del estrato bajo en los tratamientos y en el grupo control.

5.6.3 Severidad de la roya en el estrato alto a los 0 días (antes de la aplicación).

En la tabla 27 se muestra el análisis de varianza de severidad de roya en el estrato alto antes de la aplicación de los inóculos, la cual nos indica que el valor de P es de 0,024, un número menor a 0,05, por lo que se detecta diferencias significativas en la severidad de los tratamientos y el grupo control.

Tabla 27. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato alto a los 0 días.

	Suma de cuadrados	GL	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	373,053	2	186,527	3,837	0,024
Intra-grupos	7145,780	147	48,611		
Total	7518,833	149			

Los tratamientos con diferencias significativas de severidad de roya en el estrato alto antes de la aplicación se resumen en la tabla 28, en la cual se observa que el tratamiento uno y el grupo control son estadísticamente diferentes, ya que el valor de P es de 0,017 y presentan una diferencia de medias de 3,860. De igual manera, la comparación de severidad de roya entre los tratamientos y el grupo control antes de la aplicación de los inóculos se muestra en la figura 37.

Tabla 28. Diferencias significativas de la severidad de la roya, en el estrato alto, entre los tratamientos a los 0 días.

Categorías de la variable		Diferencia de medias	Sig.
Tratamiento 1	Tratamiento 2	1,800	0,403
	Grupo control	3,860*	0,017
Tratamiento 2	Tratamiento 1	-1,800	0,403
	Grupo control	2,060	0,305

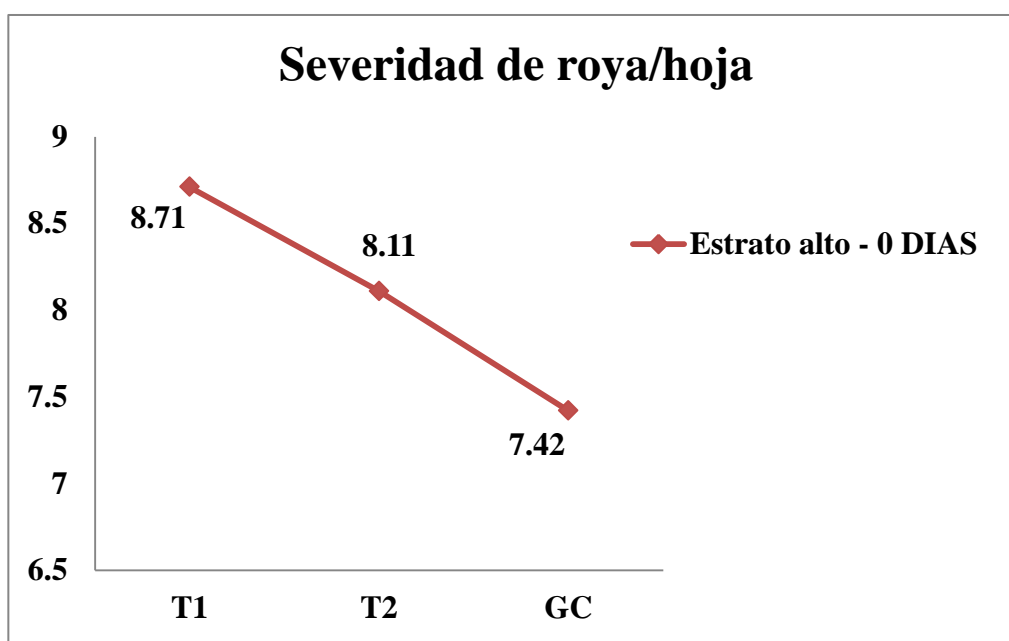


Figura 37. Comparación de los promedios de la severidad de la roya, en el estrato alto, entre los tratamientos a los 0 días.

En la figura 37, se muestra los promedios de severidad de roya en el estrato alto de los tratamientos y grupo control antes de la aplicación de los inóculos, se visualiza que los promedios generales de número de pústulas por hoja entre los tratamientos uno y dos difieren solamente en 0,6; en cambio, el tratamiento uno y el grupo control difieren en 1,29 por lo que son estadísticamente diferentes, lo cual nos indica que la relación de hoja por pústula no fue uniforme entre los tratamientos. Asimismo, se observa que el promedio de número de pústulas por hoja para el estrato alto es menor a los promedios del estrato medio y bajo en los tratamientos y grupo control, esto debido a que la roya tiende a empezar a desarrollarse en las hojas más cercanas al suelo para posteriormente propagarse en el resto del arbusto.

5.6.4 Severidad de la roya en el estrato bajo a los 15 días (después de la aplicación).

El análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato bajo a los 15 días después de la aplicación de los inóculos se resume en la tabla 29, en la cual se indicó que el valor de P es menor a 0,05 por lo que se deduce que existen diferencias significativas en la severidad de la roya de los tratamientos y el grupo control.

Tabla 29. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato bajo a los 15 días.

	Suma de cuadrados	GL	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	975,160	2	487,580	9,246	0,000165
Intra-grupos	7751,700	147	52,733		
Total	8726,860	149			

En la tabla 30 se indican los tratamientos con diferencias significativas de la severidad de la roya en el estrato bajo, en la primera evaluación después de la aplicación. Se registró diferencias significativas entre el tratamiento dos con el tratamiento uno y el grupo control, ya que el valor de P entre estos tratamientos es menor a 0,05. Además, la comparación de la severidad de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 15 días después de la aplicación de los inóculos se muestra en la figura 38.

Tabla 30. Diferencias significativas de la severidad de la roya, en el estrato bajo, entre los tratamientos y el grupo control a los 15 días.

Categorías de la variable		Diferencia de medias	Sig.
Tratamiento 1	Tratamiento 2	4,060*	0,016
	Grupo control	-2,080	0,327
Tratamiento 2	Tratamiento 1	-4,060*	0,016
	Grupo control	-6,140*	0,000

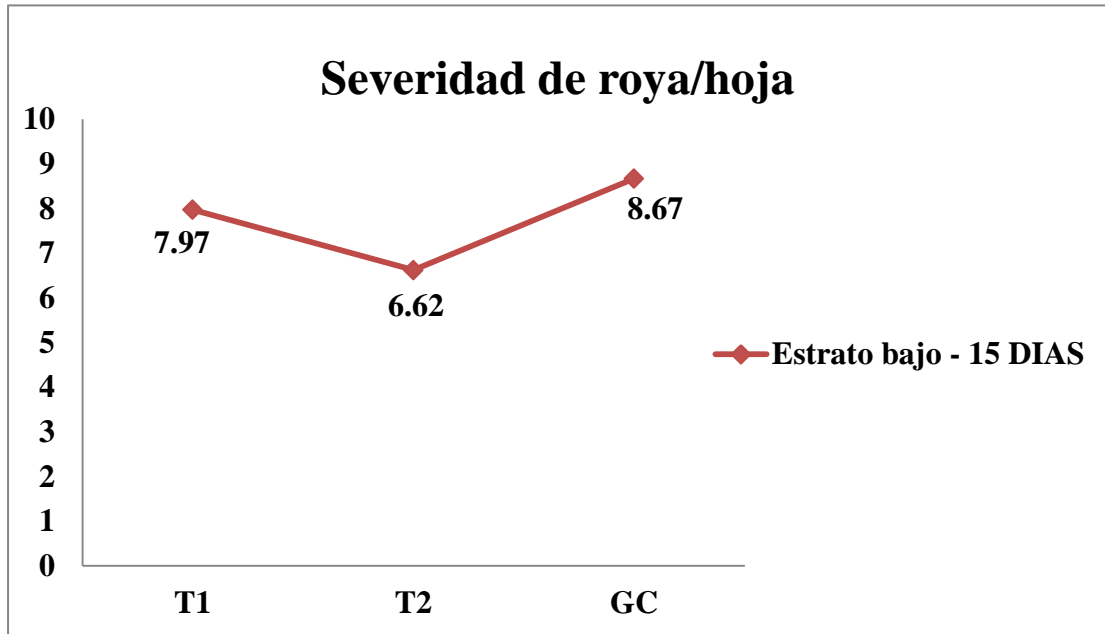


Figura 38. Comparación de los promedios de la severidad de la roya, en el estrato bajo, entre los tratamientos y el grupo control a los 15 días.

La figura 38 presenta los promedios de severidad en el estrato bajo de cada tratamiento y grupo control a los 15 días después de la aplicación, los cuales indican que los tratamientos uno y dos disminuyeron el promedio de número de pústulas por hoja de 9.87 a 7,97 y de 9,17 a 6,62 respectivamente. Asimismo, el grupo control presentó un leve aumento de 0,22 pústulas por hoja, ya que en la evaluación anterior se registró una severidad de 8,45.

5.6.5 Severidad de la roya en el estrato medio a los 15 días (después de la aplicación).

El análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato medio a los 15 días después de la aplicación de los inóculos se resume en la tabla 31, en la cual se indicó que el valor de P es de 0,000001, dato menor a 0,05, por lo que se deduce que existen diferencias significativas en la severidad de la roya de los tratamientos y el grupo control.

Tabla 31. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato medio a los 15 días.

	Suma de cuadrados	GL	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1194,173	2	597,087	15,142	0,000001
Intra-grupos	5796,420	147	39,431		
Total	6990,593	149			

En la tabla 32 se indican los tratamientos con diferencias significativas de la severidad de la roya en el estrato medio, en la primera evaluación después de la aplicación. Se registró diferencias significativas entre el tratamiento uno con el tratamiento dos y el grupo control, ya que el valor de P entre estos tratamientos es menor a 0,05. La comparación de la severidad de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 15 días después de la aplicación de los inóculos se muestra en la figura 39.

Tabla 32. Diferencias significativas de la severidad de la roya, en el estrato medio, entre los tratamientos y el grupo control a los 15 días.

Categorías de la variable		Diferencia de medias	Sig.
Tratamiento 1	Tratamiento 2	4,380*	0,002
	Grupo control	-2,440	0,130
Tratamiento 2	Tratamiento 1	-4,380*	0,002
	Grupo control	-6,820*	0,000

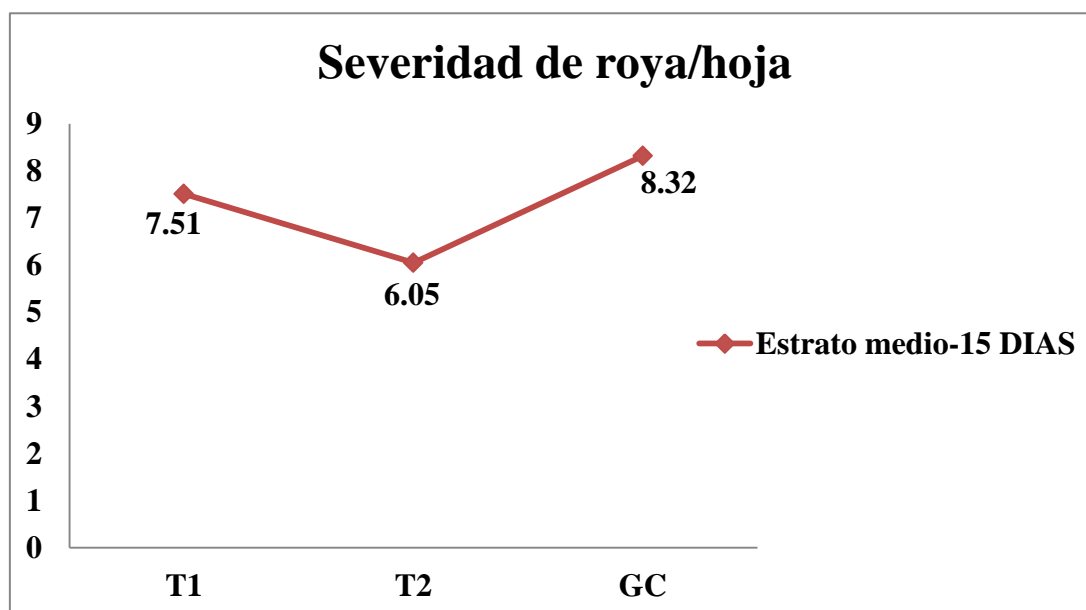


Figura 39. Comparación de los promedios de la severidad de la roya, en el estrato medio, entre los tratamientos y el grupo control a los 15 días.

La figura 39 presenta los promedios de severidad en el estrato medio de cada tratamiento y grupo control a los 15 días después de la aplicación, los cuales indican que los tratamientos uno y dos disminuyeron el promedio de número de pústulas por hoja de 9,66 a 7,51 y de 8,89 a 6,05 respectivamente. Asimismo, el grupo control presentó un aumento de 0,48 pústulas por hoja, ya que en la evaluación anterior se registró una severidad de 7,84.

5.6.6 Severidad de la roya en el estrato alto a los 15 días (después de la aplicación).

El análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato alto a los 15 días después de la aplicación de los inóculos se resume en la tabla 33, en la cual se indicó que el valor de P es de 0,243, dato mayor a 0,05, por lo que se deduce que no existen diferencias significativas en la severidad de la roya de los tratamientos y el grupo control. Además se muestra en la figura 38, la comparación de la severidad de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 15 días después de la aplicación de los inóculos.

Tabla 33. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato alto a los 15 días.

	Suma de cuadrados	GL	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	113,880	2	56,940	1,427	0,243
Intra-grupos	5863,960	147	39,891		
Total	5977,840	149			

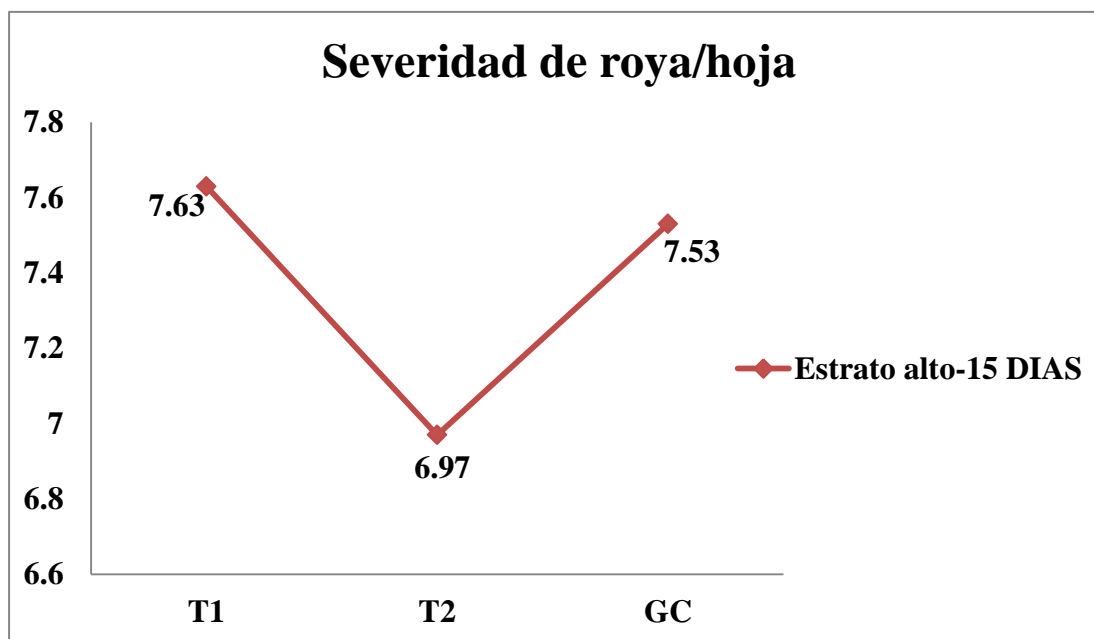


Figura 40. Comparación de los promedios de severidad de la roya, en el estrato alto, entre los tratamientos y el grupo control a los 15 días.

La figura 40 presenta los promedios de severidad en el estrato alto de cada tratamiento y grupo control a los 15 días después de la aplicación, los cuales indican que los tratamientos uno y dos disminuyeron el promedio de número de pústulas por hoja de 8,71 a 7,63 y de 8,11 a 6,97 respectivamente. Asimismo, el grupo control presentó un pequeño aumento de 0,11 pústulas por hoja, ya que en la evaluación anterior se registró una severidad de 7,42.

5.6.7 Severidad de la roya en el estrato bajo a los 30 días (después de la aplicación).

La tabla 34 muestra el análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato bajo a los 30 días después de la aplicación de los inóculos, la cual indica que el valor de P es de 0,000, cantidad menor a 0,05, lo que permite deducir que existen diferencias altamente significativas en la severidad de la roya de los tratamientos y el grupo control.

Tabla 34. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato bajo a los 30 días.

	Suma de cuadrados	GL	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	18386,253	2	9193,127	307,306	0,000
Intra-grupos	4397,540	147	29,915		
Total	22783,793	149			

Los tratamientos con diferencias significativas de severidad de roya en el estrato bajo en la segunda evaluación después de la aplicación de los inóculos se detallan en la tabla 35, en la cual se indica que los dos tratamientos presentan diferencias significativas entre si y de igual manera con el grupo control, por lo que son estadísticamente diferentes. En la figura 41 se muestra la comparación de la severidad de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 30 días después de la aplicación de los inóculos.

Tabla 35. Diferencias significativas de la severidad de la roya, en el estrato bajo, entre los tratamientos y el grupo control a los 30 días.

Categorías de la variable		Diferencia de medias	Sig.
Tratamiento 1	Tratamiento 2	8,26000*	0,000
	Grupo control	-18,24000*	0,000
Tratamiento 2	Tratamiento 1	-8,26000*	0,000
	Grupo control	-26,50000*	0,000

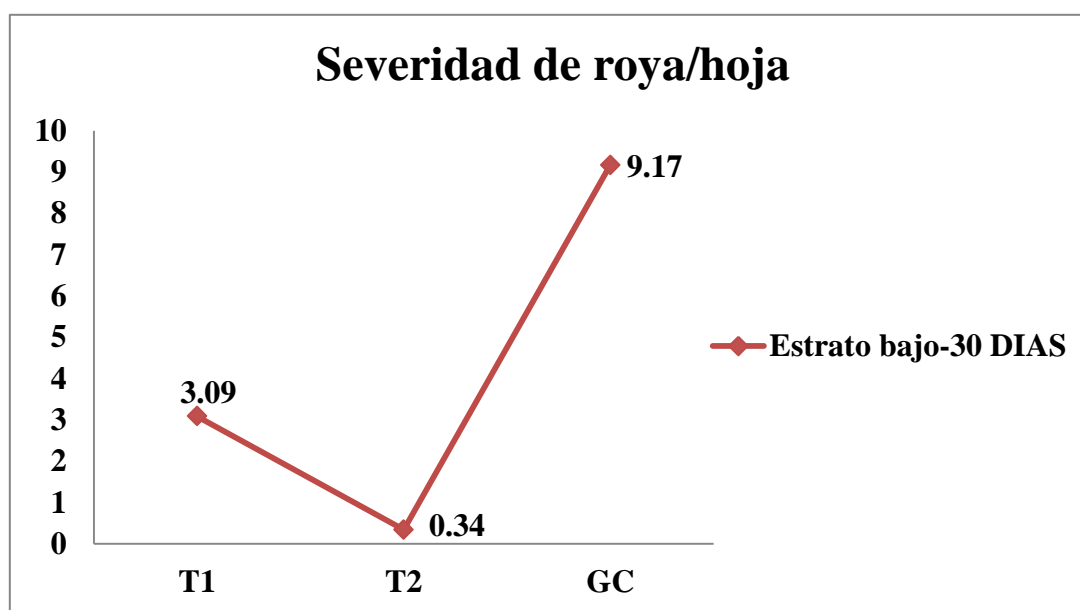


Figura 41. Comparación de los promedios de severidad de la roya, en el estrato bajo, entre los tratamientos y el grupo control a los 30 días.

En la figura 41 se visualiza los promedios de severidad del estrato bajo de cada tratamiento y grupo control a los 30 días después de la aplicación de los inóculos, indicando que los tratamientos uno y dos disminuyeron los promedios de número de pústulas por hoja de 7,97 a 3,09 y de 6,62 a 0,34 respectivamente. Sin embargo, el grupo control presentó un aumento de 0,5, ya que en la evaluación anterior se registró una severidad de 8,67.

5.6.8 Severidad de la roya en el estrato medio a los 30 días (después de la aplicación).

En la tabla 36 se muestra el análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato medio a los 30 días después de la aplicación de los inóculos, el cual indica que el valor de P es de 0,000, número menor a 0,05, lo que permite deducir que existen diferencias altamente significativas en la severidad de la roya de los tratamientos y el grupo control.

Tabla 36. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato medio a los 30 días.

	Suma de cuadrados	GL	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	15955,320	2	7977,660	376,689	0,000
Intra-grupos	3113,147	147	21,178		
Total	19068,540	149			

Los tratamientos con diferencias significativas de severidad de roya en el estrato medio en la segunda evaluación después de la aplicación de los inóculos se detallan en la tabla 37, en la cual se indica que los dos tratamientos presentan diferencias significativas entre si y de igual manera con el grupo control, por lo que son estadísticamente diferentes. Además se muestra en la figura 42, la comparación de la severidad de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 30 días después de la aplicación de los inóculos.

Tabla 37. Diferencias significativas de la severidad de la roya, en el estrato medio, entre los tratamientos y el grupo control a los 30 días.

Categorías de la variable		Diferencia de medias	Sig.
Tratamiento 1	Tratamiento 2	12,30000*	0,000
	Grupo control	-12,96000*	0,000
Tratamiento 2	Tratamiento 1	-12,30000*	0,000
	Grupo control	-25,26000*	0,000

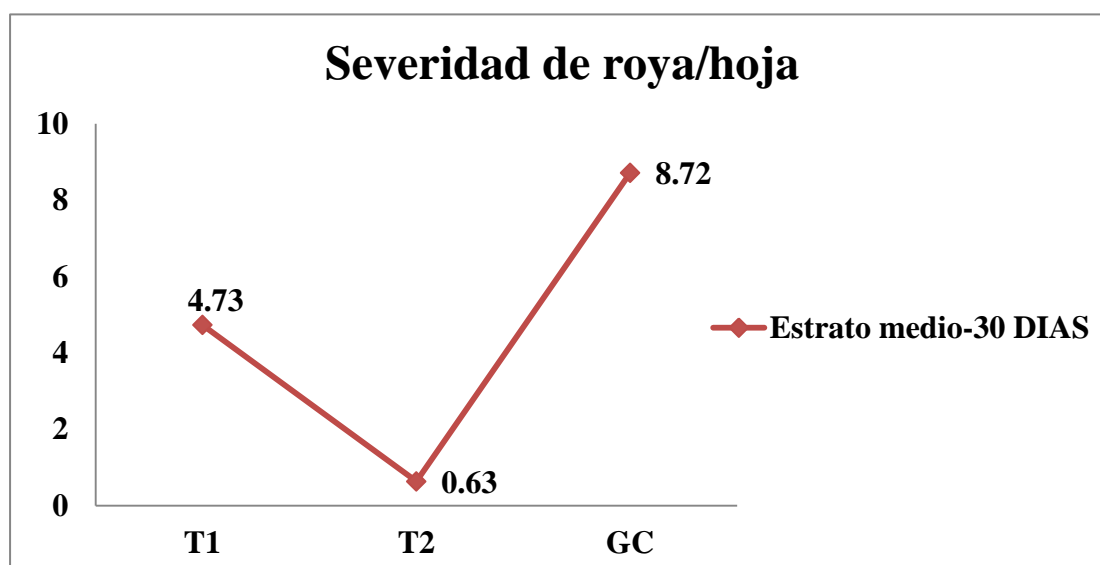


Figura 42. Comparación de los promedios de severidad de la roya, en el estrato medio, entre los tratamientos y el grupo control a los 30 días.

En la figura 42 se visualiza los promedios de severidad del estrato medio de cada tratamiento y grupo control a los 30 días después de la aplicación de los inóculos, indicando que los tratamientos uno y dos disminuyeron los promedios de número de pústulas por hoja de 7,51 a 4,73 y de 6,05 a 0,63 respectivamente. Sin embargo, el grupo control presentó un aumento de 0,4, ya que en la evaluación anterior se registró una severidad de 8,72.

5.6.9 Severidad de la roya en el estrato alto a los 30 días (después de la aplicación).

La tabla 38 muestra el análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato alto a los 30 días después de la aplicación de los inóculos, la cual indica que el valor de P es de 0,000, lo que permite deducir que existen diferencias altamente significativas en la severidad de la roya de los tratamientos y el grupo control.

Tabla 38. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato alto a los 30 días.

	Suma de cuadrados	GL	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3405,813	2	1702,907	59,776	0,000
Intra-grupos	4187,760	147	28,488		
Total	7593,573	149			

Los tratamientos con diferencias significativas de severidad de roya en el estrato alto en la segunda evaluación después de la aplicación de los inóculos se detallan en la tabla 39, en la cual se indica que los dos tratamientos presentan diferencias significativas entre si y de igual manera con el grupo control, por lo que son estadísticamente diferentes. Además se muestra en la figura 43, la comparación de la severidad de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 30 días después de la aplicación de los inóculos.

Tabla 39. Diferencias significativas de la severidad de la roya, en el estrato alto, entre los tratamientos y el grupo control a los 30 días.

Categorías de la variable		Diferencia de medias	Sig.
Tratamiento 1	Tratamiento 2	2,12000	0,119
	Grupo control	-8,88000*	0,000
Tratamiento 2	Tratamiento 1	-2,12000	0,119
	Grupo control	-11,00000*	0,000

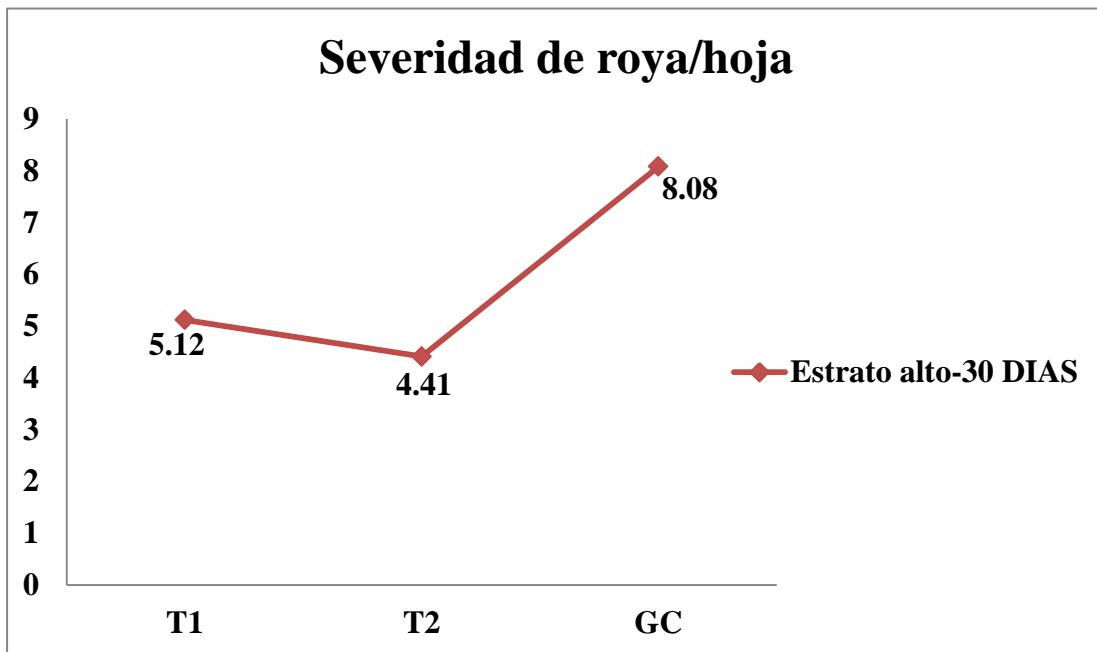


Figura 43. Comparación de los promedios de severidad de la roya, en el estrato alto, entre los tratamientos y el grupo control a los 30 días.

En la figura 43 se visualiza los promedios de severidad del estrato alto de cada tratamiento y grupo control a los 30 días después de la aplicación de los inóculos, indicando que los tratamientos uno y dos disminuyeron los promedios de número de pústulas por hoja de 7,63 a 5,12 y de 6,97 a 4,41 respectivamente. Sin embargo, el grupo control presentó un aumento de 0,55, ya que en la evaluación anterior se registró una severidad de 7,53.

5.6.10 Severidad de la roya en el estrato bajo a los 45 días (después de la aplicación).

El análisis de varianza de severidad de roya en el estrato bajo a los 45 días después de la aplicación de los inóculos se detalla en la tabla 40, en la cual se indicó que el valor de P es 0,000 un número menor de 0,05, por lo que se deduce que existen diferencias significativas en la severidad de los tratamientos y el grupo control.

Tabla 40. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato bajo a los 45 días.

	Suma de cuadrados	GL	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	24702,893	2	12351,447	450,487	0,000
Intra-grupos	4030,440	147	27,418		
Total	28733,333	149			

Los tratamientos con diferencias significativas de severidad de roya en el estrato bajo en la tercera evaluación después de la aplicación de los inóculos se detallan en la tabla 41, en la cual se indica que los dos tratamientos presentan diferencias significativas entre si y de igual manera con el grupo control, por lo que son estadísticamente diferentes. Además se muestra en la figura 44, la comparación de la severidad de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 45 días después de la aplicación de los inóculos.

Tabla 41. Diferencias significativas de la severidad de la roya, en el estrato bajo, entre los tratamientos y el grupo control a los 45 días.

Categorías de la variable		Diferencia de medias	Sig.
Tratamiento 1	Tratamiento 2	2,86000*	0,019
	Grupo control	-25,68000*	0,000
Tratamiento 2	Tratamiento 1	-2,86000*	0,019
	Grupo control	-28,54000*	0,000

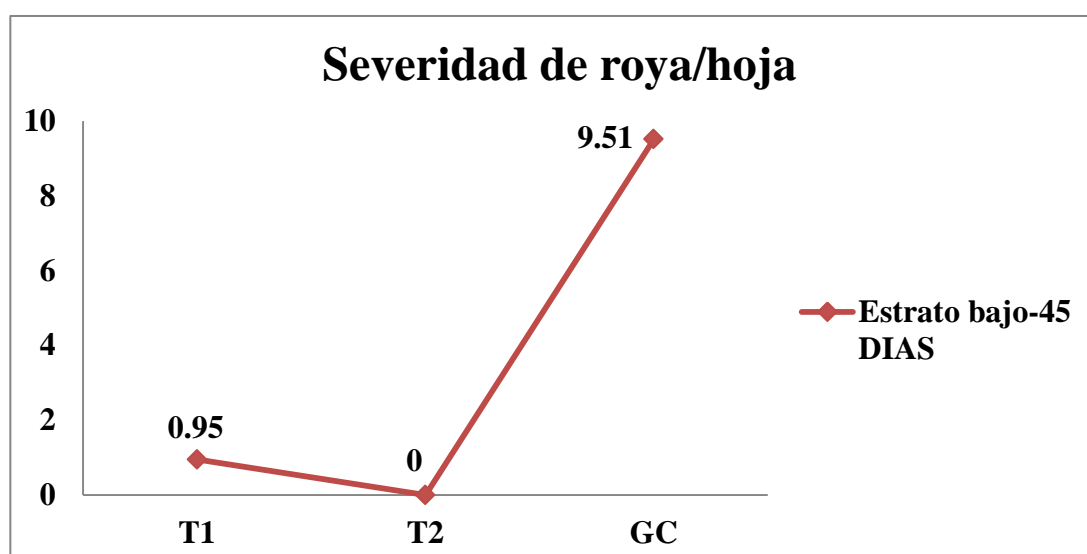


Figura 44. Comparación de los promedios de severidad de la roya, en el estrato bajo, entre los tratamientos y el grupo control a los 45 días.

La figura 44, representa los promedios de severidad en el estrato bajo de cada tratamiento y grupo control a los 45 días después de la aplicación de los inóculos, se visualiza que el tratamiento uno disminuyó el promedio de número de pústulas por hoja a 0,95 y el tratamiento dos a 0, lo cual nos indica que se redujo la severidad de la enfermedad en el estrato bajo 8,92 para el tratamiento uno y para el tratamiento dos se redujo totalmente. En cambio, el grupo control presentó un aumento de 1,06, ya que en la primera evaluación se registró un promedio de severidad de 8,45 pústulas por hoja.

5.6.11 Severidad de la roya en el estrato medio a los 45 días (después de la aplicación).

El análisis de varianza de severidad de roya en el estrato medio a los 45 días después de la aplicación de los inóculos se detalla en la tabla 42, en la cual se indicó que el valor de P es 0,000 un número menor de 0,05, por lo que se deduce que existen diferencias significativas en la severidad de los tratamientos y el grupo control.

Tabla 42. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato medio a los 45 días.

	Suma de cuadrados	GL	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	19893,760	2	9946,880	542,581	0,000
Intra-grupos	2694,880	147	18,333		
Total	22588,640	149			

Los tratamientos con diferencias significativas de severidad de roya en el estrato medio en la tercera evaluación después de la aplicación de los inóculos se detallan en la tabla 43, en la cual se indica que los dos tratamientos presentan diferencias significativas entre si y de igual manera con el grupo control, por lo que son estadísticamente diferentes. Además se muestra en la figura 45, la comparación de la severidad de roya entre los tratamientos y el grupo control a los 45 días después de la aplicación de los inóculos.

Tabla 43. Diferencias significativas de la severidad de la roya, en el estrato medio, entre los tratamientos y el grupo control a los 45 días.

Categorías de la variable		Diferencia de medias	Sig.
Tratamiento 1	Tratamiento 2	6,560*	0,000
	Grupo control	-20,480*	0,000
Tratamiento 2	Tratamiento 1	-6,560*	0,000
	Grupo control	-27,040*	0,000

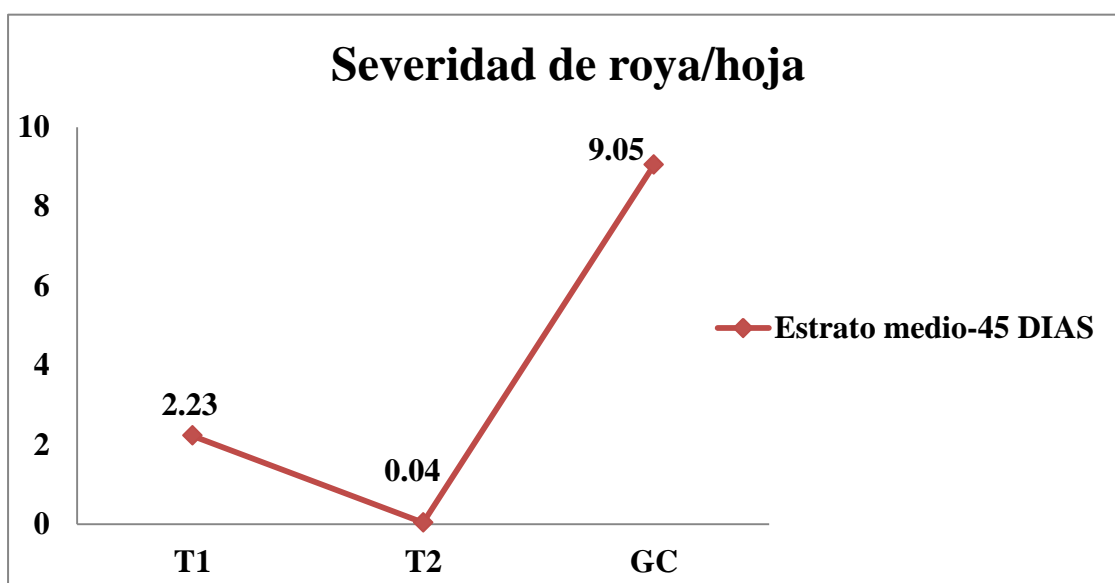


Figura 45. Comparación de los promedios de severidad de la roya, en el estrato medio, entre los tratamientos y el grupo control a los 45 días.

La figura 45, representa los promedios de severidad en el estrato medio de cada tratamiento y grupo control a los 45 días después de la aplicación de los inóculos, se visualiza que el tratamiento uno disminuyó el promedio de número de pústulas por hoja a 2,23 y el tratamiento dos a 0,04, lo cual nos indica que se redujo la severidad de la enfermedad en el estrato medio de 7,43 pústulas por hoja para el tratamiento uno y para el tratamiento dos se redujo de 8,85 pústulas. En cambio, el grupo control presentó un aumento de 1,21, ya que en la primera evaluación se registró un promedio de severidad de 7,84 pústulas por hoja.

5.6.12 Severidad de la roya en el estrato alto a los 45 días (después de la aplicación).

El análisis de varianza de severidad de roya en el estrato alto a los 45 días después de la aplicación de los inóculos se detalla en la tabla 44, en la cual se indicó que el valor de P es 0,000 un número menor de 0,05, por lo que se deduce que existen diferencias significativas en la severidad de los tratamientos y el grupo control.

Tabla 44. Análisis de varianza de la severidad de la roya en el estrato alto a los 45 días.

	Suma de cuadrados	GL	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	9620,760	2	4810,380	218,047	0,000
Intra-grupos	3243,000	147	22,061		
Total	12863,760	149			

Los tratamientos con diferencias significativas de severidad de roya en el estrato alto en la tercera evaluación después de la aplicación de los inóculos se detallan en la tabla 45, en la cual se indica que los dos tratamientos presentan diferencias significativas entre si y de igual manera con el grupo control, por lo que son estadísticamente diferentes. Además se muestra en la figura 46, la comparación de la severidad de roya entre los tratamientos y el grupo control a los cuarenta y cinco días después de la aplicación de los inóculos.

Tabla 45. Diferencias significativas de la severidad de la roya, en el estrato alto, entre los tratamientos y el grupo control a los 45 días.

Categorías de la variable		Diferencia de medias	Sig.
Tratamiento 1	Tratamiento 2	3,540*	0,001
	Grupo control	-14,940*	0,000
Tratamiento 2	Tratamiento 1	-3,540*	0,001
	Grupo control	-18,480*	0,000

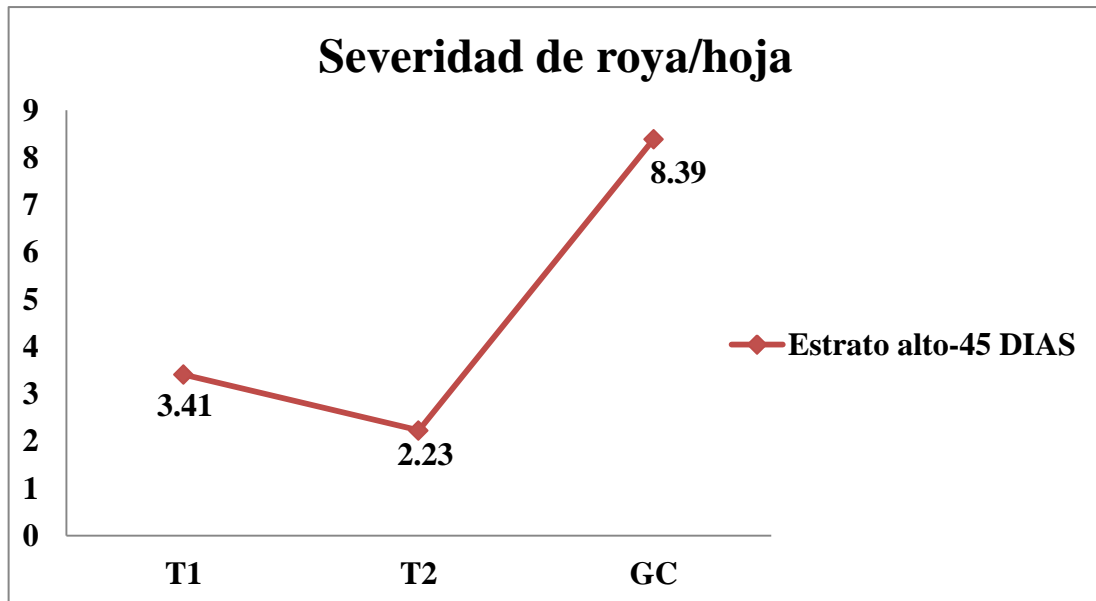


Figura 46. Comparación de los promedios de severidad de la roya, en el estrato alto, entre los tratamientos y el grupo control a los 45 días.

La figura 46, representa los promedios de severidad en el estrato alto de cada tratamiento y grupo control a los 45 días después de la aplicación de los inóculos, se visualiza que el tratamiento uno disminuyó el promedio de número de pústulas por hoja a 3,41 y el tratamiento dos a 2,23, lo cual nos indica que se redujo la severidad de la enfermedad en el estrato alto de 5,3 pústulas por hoja para el tratamiento uno y para el tratamiento dos se redujo de 5,88 pústulas. En cambio, el grupo control presentó un aumento de 0,97, ya que en la primera evaluación se registró un promedio de severidad de 7,42 pústulas por hoja.

5.6.13 Porcentaje de severidad de roya.

En este estudio la severidad de la enfermedad en las plantas de café evaluadas también se midió tomando en cuenta el grado de daño en cada hoja; para ello, se utilizó la escala de severidad para roya citada anteriormente. La comparación de los porcentajes de severidad de roya entre los tratamientos y el grupo control se muestra en la figura 47.

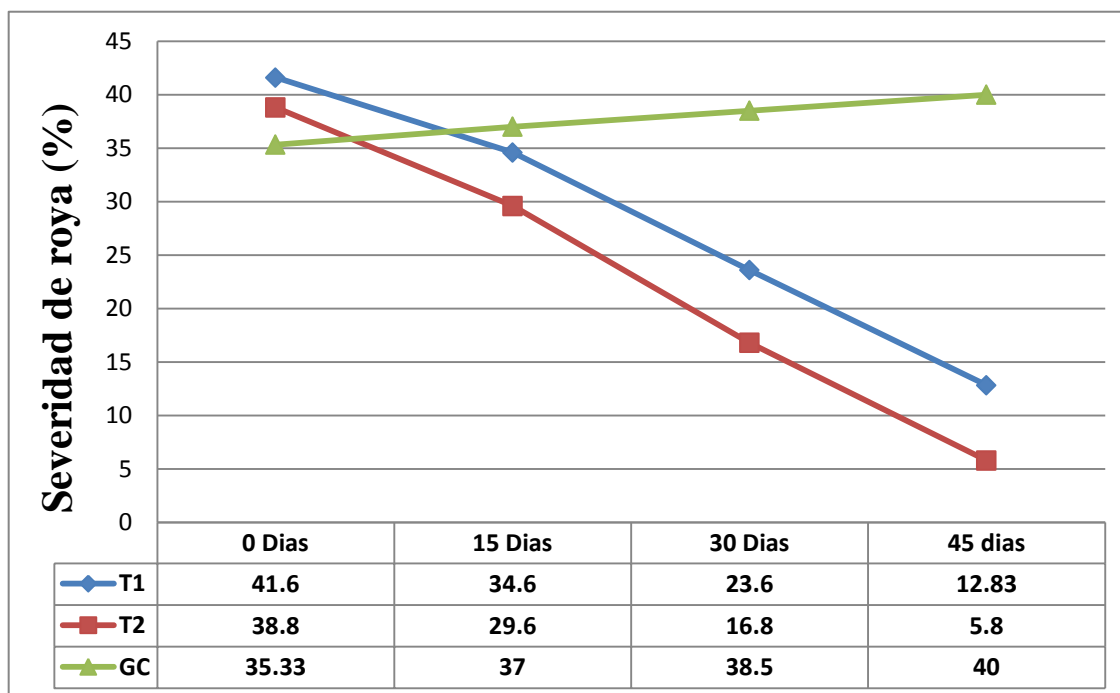


Figura 47. Comparación de los porcentajes de la severidad de roya entre los tratamientos y el grupo control a través del tiempo muestreado.

En la figura 47, se presentan los porcentajes de severidad de cada tratamiento y grupo control por evaluación efectuada, se visualiza una disminución en los tratamientos y un aumento en el grupo control; es decir, en el tratamiento uno se redujo la severidad de un 41,6% a 12,83% y en el tratamiento dos disminuyó de un 38,8% a 5,8%, en cambio el grupo control presentó un aumento de 4.7%. Por lo tanto, la enfermedad disminuyó un 70% en las plantas del tratamiento uno y en las del tratamiento dos disminuyó en un 89%.

5.7 Perfil climatológico de Concepción de Ataco en el período de muestreo.

Los datos de precipitación pluvial, humedad relativa y temperatura del Municipio de Concepción de Ataco durante los meses de abril y mayo del 2017, en los cuales se llevó a cabo la aplicación y evaluación en campo del hiperparásito *Simplificillium lanosoniveum*, fueron proporcionados por el Servicio Nacional de Estudios Territoriales (SNET). No se estableció una relación funcional entre los datos de incidencia y severidad de roya con los factores climáticos debido a que es necesario un monitoreo de

la efectividad del hiperparásito en los brotes de ambas épocas del año para poder establecer la curva de regresión¹.

- Precipitación pluvial.

Los promedios de precipitación pluvial en los días de aplicación y evaluación del efecto de los inóculos, efectuadas entre los meses de abril a mayo de 2017 se muestran en la figura 48.

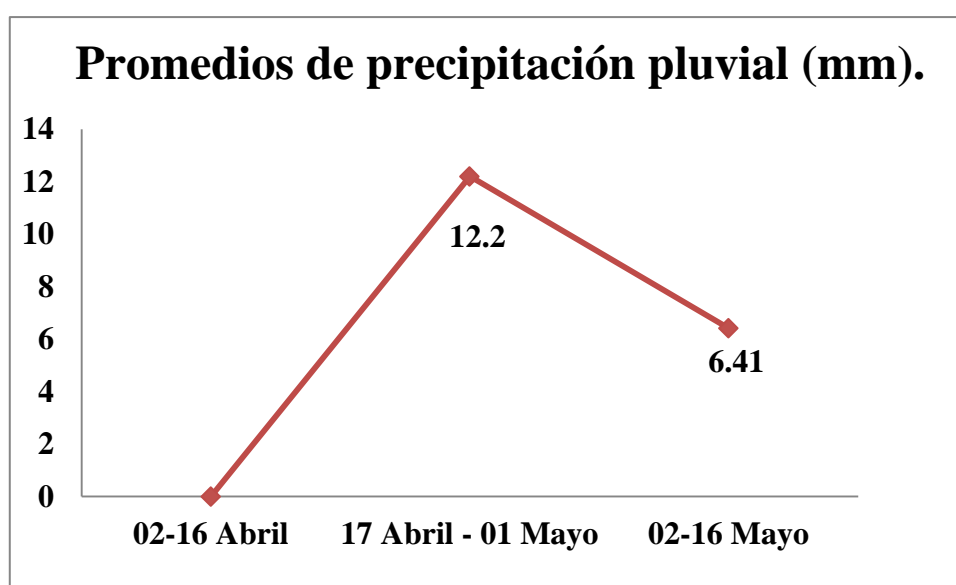


Figura 48. Promedios de precipitación registrada durante las aplicaciones de los inóculos en los meses de abril a mayo de 2017.

En la figura 48 se indican los promedios de precipitación pluvial durante el período de muestreo, se visualiza que en el periodo de la primera aplicación de los inóculos fue nula la presencia de lluvia, en cambio en el periodo de evaluación de la segunda aplicación se registró el mayor promedio 12,2 mm y para el periodo de la tercera aplicación (02-16 de Mayo) se registró menos lluvias por lo que el promedio solo fue de 6,41 mm.

- **Humedad relativa.**

Los promedios de humedad relativa en los días de aplicación y evaluación del efecto de los inóculos, efectuadas entre los meses de abril a mayo de 2017 se muestran en la figura 49.

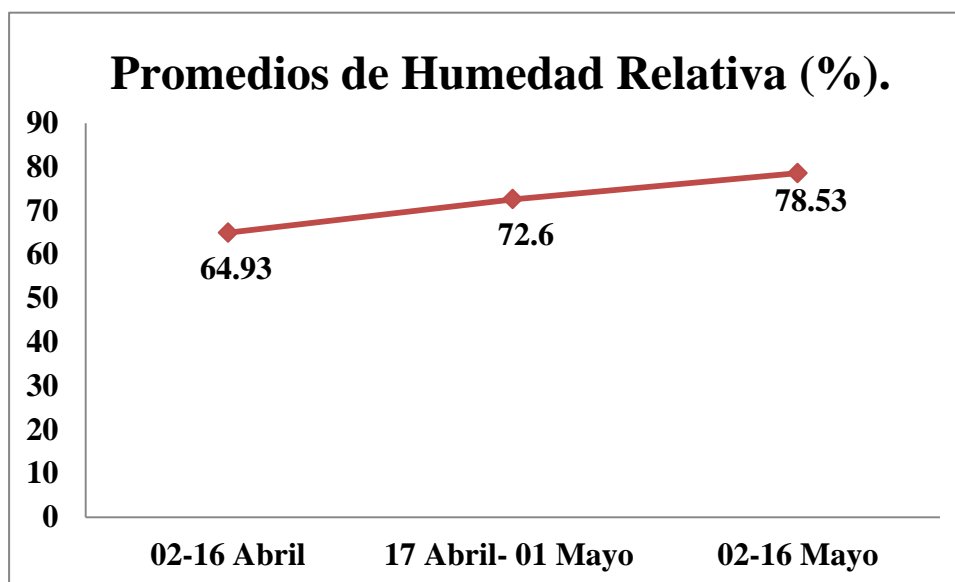


Figura 49. Promedios de humedad relativa registrada durante las aplicaciones de los inóculos en los meses de abril a mayo de 2017.

En la figura 49 se visualiza que la humedad relativa durante el período de muestreo fue aumentando, ya que para el período de la primera aplicación de los inóculos (02-16 de abril) se registró una humedad relativa de 64,93% pero para el período de la tercera aplicación (02-16 de mayo) se registró la mayor humedad relativa del tiempo de muestreo 78,53%.

- **Temperatura.**

Los promedios de temperatura en los días de aplicación y evaluación del efecto de los inóculos, efectuadas entre los meses de abril a mayo de 2017 se muestran en la figura 50.

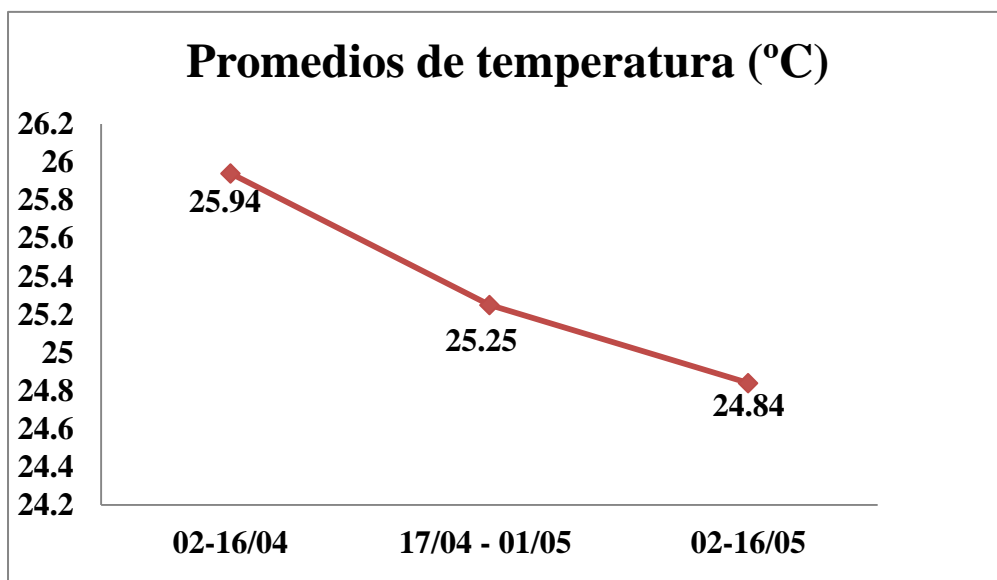


Figura 50. Promedios de temperatura registrada durante las aplicaciones de los inóculos en los meses de abril a mayo de 2017.

En la figura 50 se visualiza que durante el período de muestreo la temperatura fue constante, ya que se registró que durante los 45 días la temperatura fluctuó en el rango de 25,94 y 24,84, registrándose la menor temperatura en el período de la tercera aplicación de los inóculos (02-16/ de mayo).

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La roya del café actualmente se controla principalmente a través de la aplicación de fungicidas de cobre, el uso de cultivares resistentes y métodos culturales como la reducción de la cobertura de sombra. Sin embargo, se ha demostrado que los fungicidas de cobre aumentan la presencia de los ácaros y los minadores de la hoja de café (*P. coffeella*) (Eskes *et al.* 1991), lo que genera preocupaciones sobre sus efectos en la salud humana (Kanoun-Boulé *et al.* 2008; Loland y Singh 2004). Asimismo, la contaminación del ambiente es inevitable y la creación de problemas como la resistencia del patógeno a los fungicidas y la posible aparición de plagas secundarias (González *et al.*, 1995). De igual manera, la resistencia genética frente a la patogenicidad de *Hemileia vastatrix* sigue siendo actualmente un desafío (Brito *et al.* 2010) y se ha demostrado que la reducción de la cobertura de sombra tiene un fuerte y perjudicial efecto sobre la biodiversidad (Perfecto *et al.* 2003).

Por los problemas antes mencionados con los enfoques de control convencionales, ha habido un interés continuo por otras estrategias de control, una de ellas es el control biológico, el cual según Baker 1987 permite reducir la densidad o la actividad del patógeno, a través de mecanismos producidos por una serie de organismos incluyendo a la planta misma. Sin embargo para desarrollar un programa satisfactorio de control biológico es necesario el conocimiento de la biología y las necesidades ecológicas de los patógenos y sus enemigos naturales (Forrer 1979), estos últimos según Andrews 1992, pueden ser la mejor opción para ser usados como agente de control biológico, si poseen la capacidad de colonizar y establecerse en la superficie de la hoja. No obstante, James *et al.* 2016, opina que los mejores micoparasitantes naturales y de alta abundancia para el control de la roya del cafeto son *Lecanicillium lecanii* y *Simplicillium* sp, ya que estos hiperparasitan a las pústulas esporuladas o a las uredosporas maduras aunque no se establecen en el filoplano,

De acuerdo a Jackson (2012) y James *et al.* 2016, *Lecanicillium lecanii* es muy conocido como un atacante de pústulas de roya y un patógeno de insectos plagas del café pero a pesar de reducir dos plagas del café de una sola vez puede no ser el agente ideal para el control biológico de la roya, ya que implica una cantidad de interacciones ecológicas complejas, dependientes de factores climáticos; en cambio *Simplicillium lanosoniveum* no se ha evaluado su viabilidad para el control de dicha enfermedad y

hasta el momento solo ha sido reportado por Zare y Gams (2001) y James *et al.* 2016, como asociado con royas particularmente con la roya del café. Las características morfológicas de dichas especies de hongo se asemejan dando como resultado frecuentes clasificaciones erróneas que suelen ser aclaradas por análisis filogenéticos moleculares (Lim *et al.* 2014). Sin embargo según Zare y Gams (2001) y Sung *et al.* 2007, *Simplicillium* sp. se puede distinguir de *Lecanicillium* sp. por sus conidios corto-elipsoidales y pequeñas, ausencia completa de ramificación verticilada y fiálides individuales que surgen de hifas aéreas postradas. Así mismo, en esta investigación se identificó que *Simplicillium lanosoniveum* posee células conidiógenas largas, estrechas, no segmentadas, siempre solitarias y no verticiladas, lo que corrobora lo descrito por los autores antes mencionados quienes también indicaron que *Simplicillium lanosoniveum* posee conidios pequeños de un tamaño aproximado de 1,5-3,5 x 07-1,5 μm y su forma es bastante variable desde sud-esféricos, ovales o elipsoidales a sub-cilíndricos, lo que tiene relación con lo observado en este estudio, puesto que el tamaño promedio de los conidios obtenido fue de 1.8 μm x 1.5 μm , además se observó una gran variabilidad en la forma, desde esporas sud-globosa, ovales, elipsoidales hasta sub-cilíndricas.

Los hongos entomopatógenos e hiperparásitos en los últimos años se han reproducido en granos de arroz para la obtención de esporas a gran escala y así comercializarlos para el control de plagas y enfermedades respectivamente (Tanada y Kaya 1993; Khachatourians *et al.* 2002). Uno de los hongos que sea reproducido en arroz es *L. lecanii* y de acuerdo a Cortez (2007) la producción conidial por gramo ronda los $265.4 \pm 1 \times 10^6$ conidios, lo cual difiere con lo expuesto por Cuellar 2006, quien indicó que en el medio sólido arroz precocido solo obtuvo desarrolló de micelio sin producción de conidios pero en fermentadores con melaza y levadura obtuvo concentraciones entre 11.2×10^3 y 1.8×10^2 conidios/ml. En cambio, en el presente ensayo, se llevó a cabo exitosamente la reproducción masiva de *Simplicillium lanosoniveum* en arroz precocido para la aplicación a plantas de café infectadas con roya, se obtuvo una producción conidial de 2.4×10^7 conidios por mililitro para la dosis de 18 gramos de arroz inoculados por litro de agua y de 3.21×10^7 conidios por mililitro para la dosis de 30 gramos por litro de agua. Por lo tanto, se deduce que la producción de *S. lanosoniveum* en arroz es posible pero debe buscarse otros tipos de medio que permitan mayor estimulación para la producción de conidios.

Cuellar (2006), realizó una evaluación de la eficacia de *Lecanicillium lecanii* como hiperparásito de la roya en cuatro fincas cafetaleras de El Salvador, de acuerdo a los resultados indicó que la enfermedad se redujo un 44.63% a los 15 días de la aplicación manual; es decir, el número de pústulas disminuyó de 390 a 174, las cuales estaban distribuidas en 122 hojas. Al comparar los resultados con los de esta investigación se puede observar la efectividad de *Simplicillium lanosoniveum* como controlador de la roya del café, ya que en el tratamiento uno el número de pústulas se redujo de 4235 a 989, las cuales estaban distribuidas en 150 hojas, lo que indica que la enfermedad disminuyó un 70% y en el tratamiento dos el número de pústulas disminuyó de 3925 a 341, por lo que se concluyó que la enfermedad se redujo en un 89%, esto en un período de 45 días y tres aplicaciones con bomba de mochila.

En el presente estudio se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la hipótesis alternativa debido que el análisis de varianza demostró que luego de cuarenta y cinco días y tres aplicaciones existen diferencias significativas entre los tratamientos, puesto que los datos obtenidos mostraron que el tratamiento dos presentó el mejor control de roya reduciendo el porcentaje de incidencia de 30,45% a 6,85%, el porcentaje de severidad de 38,8% a 5,8% y el promedio de número de pústulas de 8,72 a 0,76; a diferencia del tratamiento uno que mostró una reducción de la enfermedad pero menor que la del tratamiento dos, ya que el porcentaje de incidencia se redujo de 32,35 % a 20,41%, el promedio de número de pústulas de 9,41 a 2,2 y el porcentaje de severidad de 41,6% a 12,83%

Monzón (1997) y Cuellar (2006), exponen que el micelio de *L. lecanii* se observa en las pústulas de roya a los diez días después de la aplicación pero estas son completamente colonizadas a los 15 días, lo cual coincide con el periodo de colonización de *S. lanosoniveum* observado en este ensayo, en donde se evidenció que el micelio blanco característico de *S. lanosoniveum* comienza a desarrollarse levemente sobre el centro o alrededores de las pústulas de roya después de los 10 días de la aplicación, a los trece días de la aspersión el micelio cubre alrededor del 40% al 50 % de la pústula y la colonización completa o a un 90% se observa a los 15 días posteriores a la inoculación. Así mismo, según Vélez (1991) *L. lecanii* se caracteriza por dejar el tejido vegetal necrótico donde se encuentra la pústula, lo que difiere con lo observado en este ensayo para *S. lanosoniveum*, el cual no deja necrosis en la hoja de café y esto de cierta manera

lo corrobora el estudio de Ward (2011), el cual menciona que *S. lanosoniveum* no deja necrosis en la hoja de soja cuando parasita a *P. pachyrhizi*.

Por lo tanto, se evidencia mediante los datos obtenidos que *Simplicillium lanosoniveum* es una alternativa de hiperparasitismo de la roya del café, porque a pesar que el ensayo se realizó en una época (abril-mayo) no favorable al desarrollo de este tipo de microorganismos, por la poca o nula presencia de lluvias, se logró controlar la enfermedad en un porcentaje elevado. Tomando en cuenta también que la roya tuvo un comportamiento muy severo mostrando porcentajes de incidencia y severidad bastante altos y difíciles de controlar, debido posiblemente a que el cultivo se encontraba en condiciones no favorables como: plantas de café no podadas por varios años y que sobre pasan los 25 años, excesiva sombra, no fertilizado y poco o nulo control sobre plagas y enfermedades.

VII. CONCLUSIONES

- La presente investigación es el primer estudio en El Salvador enfocado en la caracterización morfológica de *Simplicillium lanosoniveum* como parte de la microbiota del país y su evaluación en condiciones de campo como controlador biológico de la roya del café.
- El hongo hiperparásito *Simplicillium lanosoniveum* se encuentra presente como un agente de control biológico natural de la roya en la zona cafetalera de Concepción de Ataco; debido a que la temperatura y humedad del lugar alcanza niveles óptimos durante el día y la noche que permiten el desarrollo del mismo, además su crecimiento se ve favorecido por la protección que brindan estos agroecosistemas contra la radiación solar.
- De acuerdo a los resultados se concluye que *Simplicillium lanosoniveum* se puede aislar directamente de las pústulas esporuladas de *H. vastatrix* en época lluviosa, ya que se caracteriza por desarrollar su micelio blanco típico sobre estas.
- El hongo filamentoso *Simplicillium lanosoniveum* se puede aislar y purificar perfectamente en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) y reproducirse en medio de cultivo sólido arroz precocido en un período de 18 días.
- La metodología empleada en este estudio para la reproducción de esporas de *Simplicillium lanosoniveum* en arroz precocido es una nueva alternativa eficaz que permite que el hongo se desarrolle sobre el medio en el mismo período de tiempo y evita la contaminación por bacterias.
- En esta investigación se logró reproducir efectivamente en arroz precocido la cepa de *Simplicillium lanosoniveum*, pues se alcanzaron promedios de concentraciones de 2.4×10^7 conidios/ml para la dosis de dieciocho gramos de arroz inoculados por litro de agua y de 3.21×10^7 conidios/ml para la dosis de 30 gr./lt de agua; por lo que se concluye que es una técnica de producción de esporas sencilla, rápida, efectiva y viable hasta por un período de 5 meses a una temperatura de 4 °C.

- De acuerdo a lo observado en este estudio los conidios de *Simplicillium lanosoniveum* se caracterizan por tener formas muy variables, desde esféricas hasta ovoides, y por ser bastante pequeñas ya que el promedio del tamaño de las esporas medidas fue de 1.8 μm de largo y 1.5 μm de ancho.
- La metodología utilizada en este estudio para medir el aumento o reducción de la severidad e incidencia de roya en las parcelas evaluadas permitió asegurar la efectividad del hiperparásito en el campo.
- El efecto positivo del control de roya con el uso de *Simplicillium lanosoniveum* se evidenció en la reducción de severidad e incidencia en un período de cuarenta y cinco días. En el tratamiento uno la severidad de la roya se redujo un 28,77% y la incidencia un 11,94%, de igual manera en el tratamiento dos hubo una reducción en la severidad de 33% y en la incidencia de 23,60%; en cambio en el testigo a diferencia de los tratamientos se observó un incremento de 4,67% en severidad y un 3,29% en incidencia.
- Se concluye que el tratamiento dos resultó ser más eficaz para el control de la roya del café que el tratamiento uno debido a que mantuvo el nivel de severidad de roya más bajo hasta los cuarenta y cinco días; esto se reflejó en el promedio de número de pústulas por hoja evaluada, el cual se redujo en el tratamiento dos de 8,72 a 0,76 y en el tratamiento uno de 9,41 a 2,2.
- Los datos finales de esta investigación indicaron que la enfermedad con la acción del hiperparásito disminuyó un 70% en las plantas del tratamiento uno y en las del tratamiento dos disminuyó un 89%, lo cual determina la eficacia del hongo nativo *Simplicillium lanosoniveum* para poder ser considerado como estrategia dentro del manejo integrado de la roya del cafeto cuando las pústulas se encuentren en su etapa de madurez y bajo condiciones óptimas de humedad y temperatura.
- Tomando en consideración las hipótesis de esta investigación se acepta la hipótesis alternativa porque el análisis de varianza demostró que existen diferencias significativas entre los tratamientos, debido a que el número de hojas con pústulas y el número de pústulas en cada hoja de las plantas de cafeto del tratamiento dos es

menor al del tratamiento uno, lo cual indica que existe una relación entre la cantidad de inóculo asperjado y la disminución de severidad de roya.

- El hiperparásito *Simplicillium lanosoniveum* como parte del manejo integral de la roya del café es importante aplicarlo a principios de la infección cuando no sobre pase una incidencia mayor al 10%.
- Los resultados obtenidos permiten establecer que el tiempo en que *Simplicillium lanosoniveum* cubre de micelio a las pústulas de *Hemileia vastatrix* es de 15 días.
- En esta investigación no se estableció una relación entre el comportamiento de la enfermedad (incidencia y severidad) y los factores climáticos (precipitación, humedad relativa y temperatura) debido a que es necesario analizar el efecto del hiperparásito en ambas épocas del año.
- De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación se concluye que *Simplicillium lanosoniveum* es una nueva alternativa biológica capaz de controlar la roya eficazmente y así contribuir al mejoramiento de la problemática más grande que enfrenta la caficultura salvadoreña.

VIII. RECOMENDACIONES

- *Simplicillium lanosoniveum* se encuentra en forma natural parasitando a la roya del cafeto, por lo que se recomienda realizar más aislamientos de micelios existentes en pústulas y evaluarlos mediante ensayos de campo y laboratorio, determinando así la efectividad de hiperparasitismo que presenten.
- La colecta de *Simplicillium lanosoniveum* u otro hiperparásito se debe realizar en el brote de roya de la época lluviosa, debido a que estas condiciones de humedad les favorece a su desarrollo.
- Se recomienda siempre identificar hasta especie los microorganismos evaluados como hiperparásitos de la roya para así contribuir al enriquecimiento de la ciencia.
- En próximos estudios probar otros métodos de reproducción de *Simplicillium lanosoniveum* para determinar que método es más eficaz y factible en cuanto a producción de esporas.
- De acuerdo a los resultados de esta investigación se recomienda incluir al hongo *Simplicillium lanosoniveum* como parte del manejo integrado de la roya del cafeto combinado con prácticas culturales y con el hiperparásito *Trichoderma harzianum*, ya que este último actúa como preventivo debido a ocupa a la hoja de cafeto como hospedero eliminando así al fitopatógeno en cuestión desde la etapa de infección.
- La aplicación de *Simplicillium lanosoniveum* para el control de la roya del café debe realizarse cuando se produce la infección inicial y debe asperjarse de preferencia por la tarde a partir de las dieciséis horas.
- En futuros estudios comparar, en condiciones de campo, la eficacia para controlar la roya de *Simplicillium lanosoniveum* con otras especies antagonicas y productos químicos.

- Realizar estudios enfocados en el monitoreo de la eficacia de *Simplicillium lanosoniveum* en brotes de roya de época seca y lluviosa, esto debido al carácter policíclico y bianual de la roya, determinando así el efecto de factores climáticos sobre la colonización de la roya por dicho hiperparásito.

- Evaluar y describir el mecanismo o proceso de colonización de las uredosporas de *Hemileia vastatrix* por el hiperparásito *Simplicillium lanosoniveum* a través de la técnica de micrografía.

- Estudiar la fisiología de *Simplicillium lanosoniveum* para poder describir con mayor exactitud la coevolución que existe entre dicho microorganismo y *Hemileia vastatrix*.

- Tomar en cuenta los problemas sociales de la comunidad donde se establezca el área de estudio para evitar posibles riesgos y atrasos en la investigación.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aizpurua I., A.; Besga S., G.; Domingo U., M. y Amenabar A., R. 1996. Normas para el muestreo de hojas en frutales. Revista SUSTRAI, España. Número 40, páginas 36-38.
- Alcaldía Municipal de Concepción de Ataco 2002. Tomo I. Diagnóstico: esquema de ordenamiento territorial [Internet]. [Citado 2016 Agosto 15]. Disponible en la web:http://portal.ut.edu.co/academico/images/archivos/Fac_Forestal/Documentos/TRABAJOS_ESP_IMPACTO_AMBIENTAL/trabajo%20final%20distrito%20de%20riego%20Reparado.pdf
- Alcaldía Municipal de Concepción de Ataco 2012. Plan de Desarrollo Municipal [Internet]. [Citado 2016 Agosto 15]. Disponible en la web: goo.gl/JRKh5K
- Alfonsi, E. L.; Fahl, J. I.; Carelli, M. L. C. e Fazuoli, L. C. 2005. Crescimento, fotossíntese e composição mineral em genótipos de *Coffea* com potencial para utilização como porta-enxerto. Revista Bragantia. Brasil. Volume 64, numer 1, pages 1-13.
- Alvarado D., D. J.; Evangelista M., R. E. y Mejía F., K. L. 2004. Identificación de territorios de café (*coffea arabica*) de calidad en El Salvador. Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador. 99 p.
- Alvarado S., M. y Rojas C., G. 1994. *El cultivo y el beneficio del café*. Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia. 160 p.
- American Phytopathological Society (APS) 2011. Coffee rust (*Hemileia vastatrix*) [Internet]. [Citado 2018 enero 17]. Disponible en la web: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/CoffeeRust.aspx>
- Andrews, J. H. 1992. Biological control in the phyllosphere. Annual Review of Phytopathology. Volume 30, pages 603-635.

- Anthony, F.; Astorga, C. y Berthaud, J. 1999. Capítulo 11. Los recursos genéticos: las bases de una solución genética a los problemas de la caficultura latinoamericana. *Desafíos de la caficultura en Centroamérica* (1ª edición). Costa Rica: IICA. 369-406 p.
- Anthony, F.; Astorga, C.; Topart, P.; Bertrand, B. & Lashermes, P. 2002. La caracterización de las variedades de café (*Coffea arabica*) por los marcadores moleculares: mito o realidad. *Boletín PROMECAFE* no. 93. 9-13 p.
- Arauz, L. (1ª edición) 1998. *Fitopatología un enfoque agroecológico*. San José, Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica. 467 p.
- Arcila P., J.; Farfán V., F.; Moreno B., A.; Salazar G., L.F. e Hincapié G., E. 2007. *Sistemas de producción de café en Colombia*. Colombia: Blanecolor Ltda.
- Asociación Nacional del Café (Anacafé) (2ª edición) 2002. *Manual de caficultura*. Guatemala. 169 p.
- Asociación Nacional del Café (Anacafé) 2006. *Guía técnica de caficultura*. Guatemala. 213 p.
- Asociación Nacional del Café (Anacafé) 2013. *El cafetal: la revista del caficultor*. [Internet]. [Citado 2016 Junio 12]. Disponible en la web: http://www.anacafe.org/glifos/images/c/c2/2013_36_EL_Cafetal.pdf
- Avelino, J; Muller, R. A.; Cilas, C. et Velasco, H. 1991. Développement de la rouille orangée dans des plantation en cours de modernisation plantées de variétés naines dans le Sud-Es du Mexique. *Magazine Café Cacao Thé*. Volume 35, le numéro1, pages 21 - 24.
- Avelino, J.; Muller, R.; Eskes, A.; Santacreo, R. y Holguin, F. 1999. Capítulo 6. La roya anaranjada del cafeto: mito y realidad. *Desafíos de la caficultura en Centroamérica*. (1ª edición). Costa Rica: IICA. 99 p.
- Avelino, J. y Rivas P., G.G. 2013. *La roya anaranjada del cafeto versión 1* [internet]. [Citado 2016 junio 12]. Disponible en la web: https://hal.archives-ouvertes.fr/file/index/docid/1071036/filename/LA_ROYA_ANARANJADA_D_EL_CAFETO_V1.pdf

- Baiswar P., S. V.; Ngachan, S. V. and Rymbai, H. 2014. *Simplicillium lanosoniveum*, a hyperparasite on *Aecidium elaeagni- latifoliae* in India. Journal Australasian Plant Disease Notes. India. Volume 9, pages 144.
- Baker, K. F. 1987. Evolución de los conceptos de control biológico de patógenos de plantas. Estados Unidos. Volumen 25, páginas 67-85.
- Barquero Miranda, M. (3ª edición) 2013. *Recomendaciones para el combate de la roya del café (Hemileia vastatrix Berk et Br.)*. Costa Rica: Instituto del Café de Costa Rica (ICAFE). 73 p.
- Barreno, E. y Pérez Ortega, S. 2003. II. Glosario. Líquenes de la reserva natural de Muniellos. Consejería de Medio Ambiente, ordenación del territorio e infraestructuras del principado de Asturias y KRK ediciones. Universidad de Valencia, España. 52 pp.
- Barrera J., Y.I. y Menjívar C., J.E. 2004. Reproducción masiva de tres cepas de *Verticillium sp.* hiperparásito de la “roya del café” (*Hemileia vastatrix*), en fermentadores artesanales a tres concentraciones diferentes de melaza. Tesis para optar al título de Licenciada en Biología. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador. 60 p.
- Beaker S., M. 1978. Lucha contra la roya del café en Centroamérica. Revista de Información Agropecuaria. Santo Domingo Dom. Volumen 26, número 1, páginas 30-34.
- Bonilla, G. (2ª Edición) 1992. *Estadística II: métodos prácticos de inferencia estadística*. El Salvador: UCA. 357 pp.
- Bowden, J.; Gregory, P. H., and Johnson, C. G. 1971. Possible wind transport of coffee leaf rust across the Atlantic ocean. Journal Nature. Volume 229, pages 500-501.
- Brito, G. G.; Caixeta, E. T.; Gallina, A. P.; Zambolim, E. M.; Zambolim, L.; Diola, V. and Loureiro, M. E. 2010. Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. Journal Euphytica. Volume 173, pages 255–264.
- Butler, E. J. 1918. *Fungi and disease in plants*. United Kingdom: Spink and Co.

- Calderón E., G. C. 2012. Epidemiología de la roya del café causada por *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., en la región central y sur occidental de Guatemala, C.A. Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 118p.
- Campo Espinoza, F. M. 2012. Hongos antagonistas y entomopatogenos [internet]. [Citado 2018 agosto 26]. Disponible en la web: <http://antagonistas-campoa.blogspot.com/2012/10/entomopatogenos.html>
- Canjura S., E. M. 2000. Reproducción masiva de *Verticillium* sp hiperparásito de la roya del café, *Hemileia vastatrix*. Tesis para optar al título de Master en Ciencias. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (Escuela de Posgrado). Turrialba, Costa Rica. 62 pp.
- Canjura S., E.M.; Sanchez G., V.; Krauss, U. y Somarriba, E. 2002. Reproducción masiva de *Verticillium* sp., hiperparásito de la roya del café, *Hemileia vastatrix*. Revista Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. Costa Rica. Número 66, páginas 13-19.
- Cannell, M. G. R. 1985. Chapter 5: physiology of the coffee crop. Coffee: botany, chemistry and production of beans and beverage (1st edition). England: Croom Helm Ltd. 458 p.
- Cárdenas, S. I. 2007. Caracterización morfológica y agronómica de la colección núcleo de café (*Coffea arabica* L.) del CATIE. Tesis para optar al título de Master en Agricultura Ecológica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (Escuela de Posgrado). Turrialba, Costa Rica. 117p.
- Carvajal, J. F. (2^a edición) 1984. Cafeto cultivo y fertilización. Suiza: Instituto Internacional de la Potasa. 254 p.
- Carvalho, A. 1946. Distribución geográfica y clasificación botánica del genero *Coffea* con referencia especial a la especie *arabica*. Boletín de la Superintendencia de los Servicios del Café. Volumen 21, número 229, páginas 174-180.
- Carvalho, A. and Ferwerda, F. P.1969. Coffee. In OutLines of perennial crop breeding in the Tropics. Países Bajos: H. Veenman & Zonen NV. Wageningen. 308p.

- Castro F., R.; Charles E., H. and Barreto, R. W. 2009. Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. *Tropical Plant Pathology*. Brazil. Volume 34, number 2, pages 108-113.
- Centro de Investigaciones en Café (CICAFÉ) 2013. *Recomendaciones para el combate de la roya del cafeto (Hemileia vastatrix Berk et Br.)*. San José, Costa Rica: Barva.
- Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) 2017. Nucleótido. BancoGen. Secuencia completa del gen ARN ribosomal 5.8S [Internet]. Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU. [Consultado el 22 Jun. 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/937961597/>
- Chen, R. S.; Huang, C. C.; Li, J. C. and Tsay, J. G. 2017. Evaluation of characteristics of *Simplicillium lanosoniveum* on pathogenicity to aphids and in vitro antifungal potency against plant pathogenic fungi. Volume 3, number 1, pages 55-61.
- Chevalier, A. e Dagrón, M. 1928. “Recherches historiques sur les débuts de la culture du caféier en Amérique” dans les Annales de l’Académie des Sciences coloniales. *Annales d’histoire économique et sociale*. Francia. Volume 1, le numéro 4, pages 632-633.
- Chiquillo, K.; Gaitán, N. y Vargas, L. 2013. Descripción de la dinámica agroproductiva comercial del subsector café en El Salvador y aproximación al análisis de equidistribución del ingreso generado, 1990-2011. *Revista Realidad*. El Salvador. Volumen 137, páginas 417- 455.
- Consejo Salvadoreño del Café (CSC). 2013. El cultivo del café en El Salvador [Internet]. [Citado 2016 Junio 12]. Disponible en la web: http://www.consejocafe.org/nuevo_sitio/index.php?option=com_phocadownload&view=category&download=7:cultivo-de-cafe-en-el-salvador-2013&id=3:documentos-internos&Itemid=56.
- Corrales R., M. A. 2013. Impacto económico de la roya (*Hemileia vastatrix*) en la caficultura hondureña. Tesis para optar al título de Ingeniero en Administración en Agronegocios. Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras. 33 p.

- Cortez Madrigal, H. 2007. Producción de *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* en diferentes sustratos y patogenicidad. Revista Agricultura Técnica en México. Volumen 33, número 1, páginas 83-87.
- Cressey, D., 2013. Coffee rust regains foothold. Researchers marshal technology in bid to thwart fungal outbreak in Central America. Journal Nature. Volume 493, pages 587.
- Cristancho, M. 2011. CENICAFÉ, Ciencia, tecnología e innovación para la caficultura colombiana; foros. Disponible en la web: <http://www.cenicafe.org/es/index.php/forums/viewthread/15/#34>
- Cuellar Pérez, A. V. 2006. Aislamiento, reproducción y evaluación del hiperparasitismo del hongo *Verticillium* sp. como controlador biológico de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*). Tesis para optar al título de licenciada en Biología. Universidad de El Salvador. Santa Ana, El Salvador. 54 p.
- DeBach, P. (1ª edition) 1964. *Biological control of insect pests and weeds*. Londres, England: Chapman y Hall. 844 p.
- Dedecca, D. M. 1957. Anatomía e desenvolvimiento ontogenético de *Coffea arabica* L. var. *Typica* Cramer. Revista Bragantia. Brasil. Volume 16, pages 315-355.
- Delgado Madrigal, L. E. 2012. Avance e infestación severa de la roya amarilla (*Hemileia vastatrix*) en café [internet]. [Citado 2016 junio 12]. Disponible en la web: <https://www.engormix.com/agricultura/articulos/roya-en-cafe-t29293.htm>
- Demel, T. 1999. History, botany and ecological requirements of coffee. Revista Walia. Volume 20, pages 28-50.
- Dong, Q. L.; Lin, T. Y.; Xing, X. Y.; Chen, B. and Han, Y. 2013. Identification of a symbiotic fungus from blue-green alga and its extracellular polysaccharide. Journal Letters in Applied Microbiology. Volume 58, pages 303—310.
- Eskes, A.; Mendes, M. and Robbs, C. 1991. Laboratory and field studies on parasitism of *Hemileia vastatrix* with *Verticillium lecanii* and *V. leptobactrum*. Café Cacao Thé. Volume 35, pages 275–282.

- Fageria, N. K. 1992. Maximizing crop yields. Estados Unidos: Marcel Dekker 274 p.
- Federación de Cafeteros de Colombia (5ª edición) 1979. Manual del Cafetero Colombiano. Colombia: Chinchiná. 209 p.
- Feijóo G., J. A. 2014. Los fungicidas sistémicos en la prevención y control de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.), en el Cantón Piñas, Provincia de El Oro. Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Técnica de Machala. Machala. Ecuador. 70 p.
- Finch, L.; Shan Chen, R.; Holly, I.; Matthews, N. Z.; Parks, D. L.; Stanko, L. y Torgerson, J. I. 2007. Glosario Agrícola. Biblioteca Agrícola Nacional, Servicio de Investigación Agrícola y Departamento de Agricultura de EE.UU. Beltsville, Maryland. 275 pp.
- Fischersworing Homberg, B. y RoBKamp Ripken, R. (3ª edición) 2001. *Guía para la caficultura ecológica*. Perú: GTZ. 104 p.
- Flora de Nicaragua 2017. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden [internet]. 4344 Shaw Boulevard-Saint Louis, Missouri 63110 [Citado 2017 Noviembre 22]. Disponible en la web: <http://www.tropicos.org/Name/27900016>
- Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP) 1984. Roya del cafeto [internet]. [Citado 2016 junio 12]. Disponible en la web: [http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd14/texto/royadel c afeto.htm](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd14/texto/royadel_c_afeto.htm).
- Forrer, HR. 1979. Possibilities of the utilization of hiperparasites and application of natural compounds for the control of rusts. IN Lucha contra la roya del café. Informe sobre un seminario de estudios en Paipa, CO. GTZ, Eschborn, DE. p. 63-70.
- French, E. R. y Hebert, T. T. (1ª Edición) 1980. *Métodos de investigación fitopatológica*. Costa Rica: IICA. 287 pp.

Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFÉ). 2006. Especies y variedades del cafeto cultivadas en El Salvador [Internet]. [Citado 2016 junio 10]. Disponible en la web: http://www.procafe.com.sv/menu/gotitas/Varietades_de_Cafeto.htm

Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFÉ) 2013. Avance sobre acciones técnicas para el control de la roya del cafeto [Internet]. [Citado 2016 junio 12]. Disponible en la web: <http://www.procafe.com.sv/menu/Taller%20Roya%208jul13/Presentacion%20roya%20%20de%20julio%202013.pdf>

Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFÉ) 2014. Diagnóstico de la caficultura de El Salvador 2014 [Internet]. [Citado 2016 junio 12]. Disponible en la web: <http://www.procafe.com.sv/menu/ArchivosPDF/2015/Diagnostico%20de%20la%20Caficultura%202014.pdf>

García Rosales, D. A. 2013. “Incidencia y severidad de la roya del café (*Hemileia vastatrix*) y evaluación de alternativas químicas para su control; Finca El Platanar, Chimaltenango”. Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo con Énfasis en Cultivos Tropicales en el Grado Académico de Licenciado. Universidad Rafael Landívar. Escuintla, Guatemala. 61 p.

Gardeners' Chronicle (1^a Edition) 1869. *The Gardeners' Chronicle and agricultural gazette*. England: Missouri Botanical Garden. 1708 p.

Gobierno Regional de San Martín, Ministerio de Agricultura de Perú e Instituto Nacional de Innovación Agraria 2009. Manejo Integrado de la roya amarilla del cafeto [internet]. [Citado 2016 junio 12]. Disponible en la web: <http://www.agrodrasam.gob.pe/sites/default/files/cartilla-roya.pdf>

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

- González, I.; Arias, Y.; Infante, D.; Martínez, B. y Peteira, B. 2014. Inducción de enzimas hidrolíticas en una cepa de *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams en medio líquido. Revista de Protección Vegetal, Cuba. Volumen 29, número 2, páginas 137-140.
- Guerra B., J. O. y Welchez A., J. A. 2013. Evaluación de la efectividad de cuatro fungicidas biológicos en el control del hongo de la roya de café *Hemileia vastatrix*. Tesis para optar al título de Ingeniero. Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras. 30p.
- Guerra M., R.M.; Polanco R., S.C. y Ramírez M., M.A. 2005. Capítulo I: generalidades sobre las fincas del departamento de Santa Ana, la actividad caficultora y el agroturismo [internet]. [Citado 2016 mayo 19]. Disponible en la web: <http://ri.ufg.edu.sv/jspui/bitstream/11592/8159/2/633.73-g934p-capitulo%20i.pdf>
- Hawksworth, D. L.; Kirk, P. M.; Sutton, B. C. & Pegler, D. N. (8ª edition) 1995. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. United Kingdom: CAB International. 650 p.
- Hermann, K. (1ª Edition) 1887. *Kohler's Medicinal Plants*. Germany: Franz Eugen Köhler publisher.
- Huxley, P. A.; Patel, R. Z., Kabaara, A. M. and Mitchell, H. W. 1974. Tracer studies with ³²P on the distribution of functional roots of Arabica coffee in Kenya. Journal Annals of Applied Biology. Kenya. Volume 77; pages 159-180.
- Inforzato R. e Reis, A. J. 1973. Desenvolvimento do sistema radicular em diversas fases do crescimento do cafeeiro. Campinas, Instituto Agronômico, Circular 40, 13 p.
- Instituto Salvadoreño de Investigaciones del Café (ISIC) 1983. *Técnicas modernas para el cultivo del café*. San Salvador, El Salvador. 203 p.
- Jackson, D.; Skillman, J. and Vandermeer 2012. Indirect biological control of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*, by the entomogenous fungus *Lecanicillium lecanii* in a complex coffee agroecosystem. Journal Elsevier. Volume 61, pages 89-97.

- James, T. Y.; Marino, J. A.; Perfecto, I. and Vandermeer, J. 2016. Identification of putative coffee rust mycoparasites via single-molecule DNA sequencing of infected pustules. *Journal Applied and Environmental Microbiology*. U.S.A. Volume 82, number 2, pages 631-639.
- Javed, Z. J. 1987. Capítulo 2: epidemiología y control de la roya del cafeto en Centroamérica. *Plagas y enfermedades de carácter epidémico en cultivos frutales de la región centroamericana (1ª edición)*. Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE. 17-26 p.
- Kanoun-Boulé, M.; De Albuquerque, M. B.; Nabais, C. and Freitas, H. 2008. Copper as an environmental contaminant: phytotoxicity and human health implications. In: Prasad, M. (Ed.), *Trace Elements as Contaminants and Nutrients*. John Wiley and Sons Inc., New York. 653–678 pp.
- Khachatourians, G. G.; Valencia, E. P. and Miranpuri, G. S. 2002. *Beauveria bassiana* and other entomopathogenic fungi in the management of insect pests. In: Opende, K. and Dhaliwal, G. S. (ed.) *Microbial Biopesticides*. New Delhi. p. 279-275.
- Krug, C. A., Mendes, J. E. T. e Carvalho, A. 1939. Taxonomia de *Coffea arabica* L. Descrição das variedades e formas encontradas no Estado de São Paulo. *Bol Téc. do Instituto Agronômico de Campinas*. Brasil. Volume 62, pages 9-57.
- Leguizamón C., J.E.; Vélez A., P.E. y González S., A. 1989. Efecto de extractos metabólicos de *Verticillium lecanii* sobre *Hemileia vastatrix*. *Revista de CENICAFÉ*, Colombia. Volumen 40, número 2, páginas 31-39.
- León, J. (3ª edición) 2000. *Botánica de los cultivos tropicales*. Costa Rica: IICA. 462 p.
- Leppik, E.E. 1970. Genes centers of plants as sources of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*. Volume 8, number 3514, pages 323-344.
- Lim, S. Y.; Sehee, L.; Hyun, G. K. and Jungkwan, L. 2014. Entomopathogenicity of *Simplicillium lanosoniveum* Isolated in Korea. *Journal Mycobiology*. Volume 42, number 4, pages 317-321.

- Loland, J. and Singh, B. 2004. Copper contamination of soil and vegetation in coffee orchards after long-term use of Cu fungicides. *Journal Nutrient Cycling in Agroecosystems*. Volume 69, pages 203–211.
- López B., C.G. 2006. Economía, territorios e identidades en la larga duración: una aproximación al caso salvadoreño [internet]. [Citado 2016 mayo 19]. Disponible en la web: <http://rd.udb.edu.sv:8080/jspui/bitstream/11715/678/1/6.%20Economia,%20territorios%20e%20identidades%20en%20la%20larga%20duracion.pdf>
- López B., D. F. 2010. Efecto de la carga fructífera sobre la roya (*Hemileia vastatrix*) del café, bajo condiciones microclimáticas de sol y sombra, en Turrialba, Costa Rica. Tesis para optar al título de Magister Scientiae en Agroforestería Tropical. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (Escuela de Posgrado). Turrialba, Costa Rica. 117 p.
- McCook, S. 2009. La roya del Café en Costa Rica: epidemias, innovación y medio ambiente, 1950-1995. *Revista de Historia*. Volumen 59-60, páginas 99-117.
- Mendes A. J. T. 1941. Cytological observations in *Coffea*. VI. Embryo and endosperm development in *Coffea arabica* L. *American Journal Botany*. Volume 28, pages 784-789.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) 2012. Clasificación de suelos por división política de El Salvador, C.A. [Internet]. [Citado 2016 Agosto 11]. Disponible en la web: <http://cartografia.mag.gob.sv/index.php/documentacion-tecnica/category/1-documentacion-tecnica?download=2:clasificacion-de-suelos-por-division-politica-de-el-salvador>.
- Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales (MARN) y Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) 2007. Reserva de la Biosfera Apaneca-Ilamatepec, El Salvador, C.A. [Internet]. [Citado 2016 Agosto 11]. Disponible en la web: <http://www.marn.gob.sv/wp-content/uploads/Reserva-Biosfera-Apaneca-Ilamatepec.pdf>

- Monzón Centeno, A. J. 1992. Distribución de *Verticillium* sp. en tres zonas cafetaleras de Nicaragua y evaluación de dos aislamientos del hongo como agente de control biológico de la roya (*Hemileia vastatrix*) del café (*Coffea arabica* L.). Tesis para optar al título de Master. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 66 p.
- Monzón C., A. 1997. Evaluación de dos aislamientos de *Verticillium* sp. como agente de control biológico de la roya (*H. vastatrix*) del café (*Coffea arábica* L.) en condiciones de invernadero. XVIII Simposio latinoamericano de caficultura.
- Organización Internacional del Café y Consejo Salvadoreño del Café 2016. Perfil del país cafetalero El Salvador [Internet]. Consultado el 20 de marzo del 2018. Disponible en la web: <http://www.ico.org/documents/cy2015-16/icc-117-8c-profile-el-salvador.pdf>
- Orozco M., E. F. 2003. Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae*. Tese de doutorado. Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais, Brasil. 147 p.
- Oxfam 2014. Impacto de la roya del café. Evaluación de situación de medios de vida y seguridad alimentaria en familias vulnerables por el impacto de la roya del café [Internet]. [Citado 2016 Junio 12]. Disponible en la web: https://www.oxfam.org/sites/www.oxfam.org/files/file_attachments/ib-impact-coffee-rust-livelihoods-el-salvador-051214-summ-es-1.pdf
- Perfecto, I.; Mas, A.; Dietsch, T. and Vandermeer, J. 2003. Conservation of biodiversity in coffee agroecosystems: a tri-taxa comparison in southern Mexico. *Journal Biodiversity Conservation*. Volume 12, pages 1239–1252.
- Pintureau, B. 2009. Capítulo 9: hiperparasitismo. *Relaciones entre organismos en los sistemas hospederos-parasitoides simbiotes*. Montevideo, Uruguay: Universidad de la Republica, Facultad de Agronomía. 226 p.
- Programa Mundial de Alimentos 2013. Evaluación rápida sobre el efecto de la roya del café en poblaciones vulnerables dependiente del sector en El Salvador [Internet]. [Citado 2016 Junio 12]. Disponible en la web: <http://documents.wfp.org/stellent/groups/public/documents/ena/wfp257856.pdf>

- Ramírez, J. E. 1994. Sistemas y edades de inicio de la poda de cafetos (*Coffea arabica*) cv. Catuaí. *Revista Agronomía Costarricense*. Volumen 18, número 1, páginas 61-65.
- Ramírez, J. E. 1996. Sistemas y edades del inicio de la poda Estudio de sistemas de poda de café por hileras y por lotes. *Revista de Agronomía Costarricense, Costa Rica*. Volumen 20, número 2, páginas 167-172.
- Rayner, R. W. (1ª edición) 1972. *Micología Historia y Biología de la roya del cafeto*. Alemania Occidental: Bayer A. G. 104-200 p.
- Rey, A.; Garea, M. y Lago, J. C. 2007. Glosario Micológico y acepciones complementarias o afines. Agrupación Micológica A zarrota [internet]. [Citado 2018 agosto 26]. Disponible en la web: http://www.azarrota.org/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=36
- Rivas A., E.G.; Rubio M., J.A. y Zetino V., E.R. 2011. Diseño de procedimientos para el costeo de los inventarios, bajo el sistema de inventarios perpetuos, según normas internacionales de información financiera, aplicable a las empresas beneficiadoras de café en el departamento de Santa Ana. Caso práctico: beneficio el manzano. Tesis para optar al título de Licenciado en Contaduría Pública. Universidad de El Salvador. Santa Ana, El Salvador. 267 p.
- Rivillas, C. A.; Leguizamón, J.; Gil, L. F. y Duque, H. 2011. Recomendaciones para el manejo de la roya del cafeto en Colombia. Boletín técnico N° 19 de CENICAFE [internet]. [Citado 2016 mayo 19]. Disponible en la web: <http://cenicafe.org/modules/News/documents/bot019-1.pdf>
- Rodríguez, C. J. 1990. La resistencia genética a la roya del cafeto. 50 años de cenicafé 1938-1988. Conferencias conmemorativas. Centro Nacional de Investigaciones de café “Pedro Uribe Mejía”. Chichinà, CO.p. 207-212.
- Rolz A., C.E.; Leon F., L.R. y Paniagua, O. 2013. Evidencia de antagonismo in vitro de especies de *Trichoderma* contra *Hemileia vastatrix* (roya del café). *Revista de Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala*. Número 25, páginas 61-65.

- Ruiz, G. M. 1994. Contribución del mejoramiento genético al desarrollo de la caficultura colombiana. *Revista Innovación y Ciencia*. Volumen 3, número 2, páginas 1-6.
- Saccas, A. M. et Charpentier, J., 1971. *La rouille des caféiers due à Hemileia vastatrix*. France: IFCC. 123 p.
- Sáiz del Rio, J. F.; Fernández, C. E. and Bellavita, O. 1961. Distribution of absorbing capacity of coffee roots determined by radioactive tracers. *Journal American Society Horticultural Science*. Volume 77, pages 240-244.
- Schierber, E. (1ª edición) 1975. *Situación actual de la roya del cafeto en América latina*. Guatemala: IICA. 37 p.
- Schuppener, H.; Harr, J.; Sequeira, F. and Gonzalez, A. 1977. First occurrence of the coffee leaf rust *Hemileia vastatrix* in Nicaragua, 1976, and its control. *Journal Café Cacao Thé*. Volume 21, number 3, pages 197-202.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) 2013. Ficha técnica: roya del cafeto *Hemileia vastatrix* (Berkeley & Broome). Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Versión del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Distrito Federal, México. 25 p.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) 2016. Ficha técnica N° 40: roya del cafeto *Hemileia vastatrix* (Berkeley & Broome). Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Dirección General de Sanidad Vegetal. Distrito Federal, México. 23 p.
- Shaw, D.E., 1968. Coffee rust outbreaks in Papua from 1892 to 1965 and the 1965 eradication campaign. *Plant Pathology Series*. Volume 2, pages 20-52.
- Smith, R. F. 1985. Chapter 1: a history of coffee. *Coffee: botany, chemistry and production of beans and beverage* (1st edition). England: Croom Helm Ltd. 458 p.
- Subero, L. 2005. La roya el cafeto [Internet]. [Citado 2016 Junio 12]. Disponible en la web: <http://infocafes.com/descargas/biblioteca/136.pdf>

- Sung, G. H.; Spatafora, J. W.; Zare, R.; Hodge, K. T. and Gams W. 2001. A revision of *Verticillium* sect. Prostrata. II. Phylogenetic analyses of SSU and LSU nuclear rDNA sequences from anamorphs and teleomorphs of the Clavicipitaceae. *Journal. Nova Hedwigia*. Volume 72, pages 311–328.
- Sung, G. H.; Hywel J., N. L.; Sung, J. M.; Luangsa A., J. J.; Shrestha, B. and Spatafora, J. W. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Journal Studies in Mycology*. Volume 57, pages 5-59.
- Tanada, Y. ; and Kaya, H. K. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press: San Diego, USA. 666 p.
- Universidad de Alcalá 2004. Métodos de análisis de datos en ecología [Internet]. [Citado 2016 Junio 12]. Disponible en la web: <https://www.uco.es/servicios/informatica/windows/filemgr/download/ecolog/Metodos%20analisis%20datos.pdf>
- Urbina G., C. 2009. Café e identidad nacional en El Salvador. *Revista la Universidad, El Salvador*. Volumen 8, páginas 41-53.
- Valdez Leyva, P. 2009. “Efectos de la luz en el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*”. Tesis para optar al título de Ingeniero Biotecnólogo. Instituto Tecnológico de Sonora. Sonora, México. 48 p.
- Van Driesche, R. G. y Bellows, T. S. 1996. *Parasitoids and Predators of Arthropods and Molluscs*. Biological Control. New York, U.S.A.: Chapman and Hall. p.37-65
- Vargas, A. y Villamizar, D. 2005. Estudio preliminar de la producción, extracción y purificación de T2 toxina por *Fusarium sporotrichioides* NRRL 3299 en dos medios sintéticos. *Microbiólogo Industrial*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá D. C. 172 pp.
- Várzea, V. 2013. Avances del conocimiento sobre las razas de roya del café, con énfasis en la caficultura de Latinoamérica. Turrialba, Costa Rica, CATIE. Presentación power point.

- Vélez Arango, P.E. 1991. Estudio macro y microscópico del efecto de *Verticillium lecanii* sobre el desarrollo de lesiones de la roya del Cafeto. Revista Cenicafé. Volumen 42, número 2, páginas 13-20.
- Virginio F., E. M. y Astorga D., C. (1ª edición) 2015. *Prevención y control de la roya del café Manual de buenas prácticas para técnicos y facilitadores*. Costa Rica: CATIE. 96 p
- Volcy, C. 2008. Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología. Una revisión. Revista Agronomía Colombiana. Volumen 26, número 1, páginas 107-115.
- Waller, J. M. 1972. Coffe rust in Latin America. Journal PANS. Volume 18, number 4, pages 402-408.
- Ward, N. A. 2011. *Simplicillium lanosoniveum* a mycoparasite of *Phakopsora pachyrhizi* and its use as a biological control agent. Thesis for Doctor of Philosophy. Louisiana State University. Louisiana, U.S.A. 139 p.
- Ward, N. A., Schneider, R. W. y Aime, M. C. 2011. Colonization of soybean rust sori by *Simplicillium lanosoniveum*. Journal Elsevier. U.S.A. Volume 4, pages 303-308.
- Ward Gauthier, N.; Maruthachalam, K.; Subbarao, K. V.; Brown, M.; Xiao, Ying; Robertson, C. L. y Schneider, R. W. 2014. Mycoparasitism of *Phakopsora pachyrhizi*, the soybean rust pathogen, by *Simplicillium lanosoniveum*. Journal Elsevier. U.S.A. Volume 76, pages 87-94.
- Wellman, F. L. 1952. Peligro de introducción de la *Hemileia* del café a las Américas. Revista Turrialba. Costa Rica. Volumen 2, número 2, páginas 47-50.
- Zadoks, J.C and Schein, R. D. 1979. *Epidemiology and plant disease management*. New York, USA: Oxford University Press. 427 p.
- Yao, L., Wang, H., Wan, Z., Li, R. and Yu, J. 2015. *Simplicillium lanosoniveum* strain 02502 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Journal Submitted. China.

Zare, R. y Gams, W. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. Nov. Journal Nova Hedwigia. Volume 73, pages 1-50.

X ANEXOS

GLOSARIO.

Células conidiógenas o Fiálides: célula terminal del conidióforo y productora de conidios, en forma de botella que se une por su base en la métula y la cual constituye el soporte de los conidios (Rey *et al.* 2007).

Conidio: espora de origen asexual formada en células conidiógenas (Barreno y Pérez 2003).

Control biológico: consiste en el uso de uno o más organismos benéficos (enemigos naturales) para reducir la densidad de una planta o animal que causa daño al hombre (plagas) (DeBach, 1964).

Espora: célula generativa que reproduce nuevos individuos sin necesidad de fusionarse (Barreno y Pérez 2003).

Esporulación: acción o efecto de producir esporas (Rey *et al.* 2007).

Filoplano: microambiente en la superficie foliar está formado por microorganismos que pueden ser considerados antagónicos a fitopatógenos o inductores de mecanismos de defensa intrínseca de la planta. Esta zona varía en cuanto a cantidades de exudados y estabilidad ambiental, y por tanto, en su capacidad para hospedar organismos biocontroladores (Arauz 1998).

Fitoparásito: organismo que durante toda su vida o una parte de su ciclo biológico, se alimenta a expensas de vegetales (Rey *et al.* 2007).

Fitopatógeno: microorganismos que dañan o causan enfermedades a las plantas (Rey *et al.* 2007).

Halo: capa gelatinosa y transparente, de mayor o menor grosor que rodea el episporio (Barreno y Pérez 2003).

Hifa: filamento microscópico pluricelular del micobionte que unido con otros filamentos forma el cuerpo vegetativo de los hongos llamado micelio (Barreno y Pérez 2003).

Hiperparásito: organismo parásito que vive sobre un hospedero y que a su vez parasita a otra especie. Los hiperparasitoides son a menudo obligados, es decir que se desarrollan necesariamente a partir de un parasitoide. Pero, pueden también ser facultativos, cuando su desarrollo tiene lugar tanto sobre una especie parasitoide como sobre una especie libre (Pintureau 2009).

Hongo antagonista: organismo heterótrofo (falta de fotosíntesis) que posee células quitinizadas normalmente no móviles y que se caracteriza por su escasa toxicidad sobre otros organismos del ambiente, por su actitud para ser tratado industrialmente y ser comercializado como un insecticida (Campo 2012).

Hongo filamentoso: son microorganismos eucarióticos, aerobios facultativos que se reproducen de manera natural por esporas, sexual o asexualmente (Vargas y Villamizar 2005).

Inoculación: transferencia de un patógeno a su planta hospedante o a un órgano de ella (Rey *et al.* 2007).

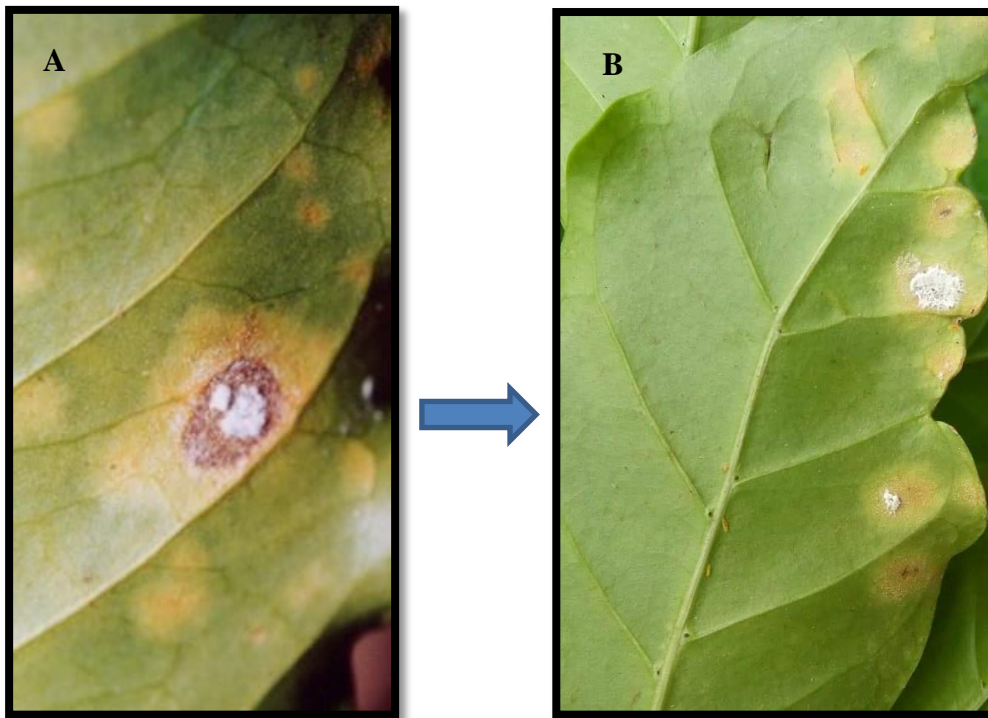
Micoparásito: hongo que parasita a otro hongo (Finch *et al.* 2007).

Patógeno: hongo que vive sobre vegetales o animales, produciéndole enfermedades o incluso la muerte (Rey *et al.* 2007).

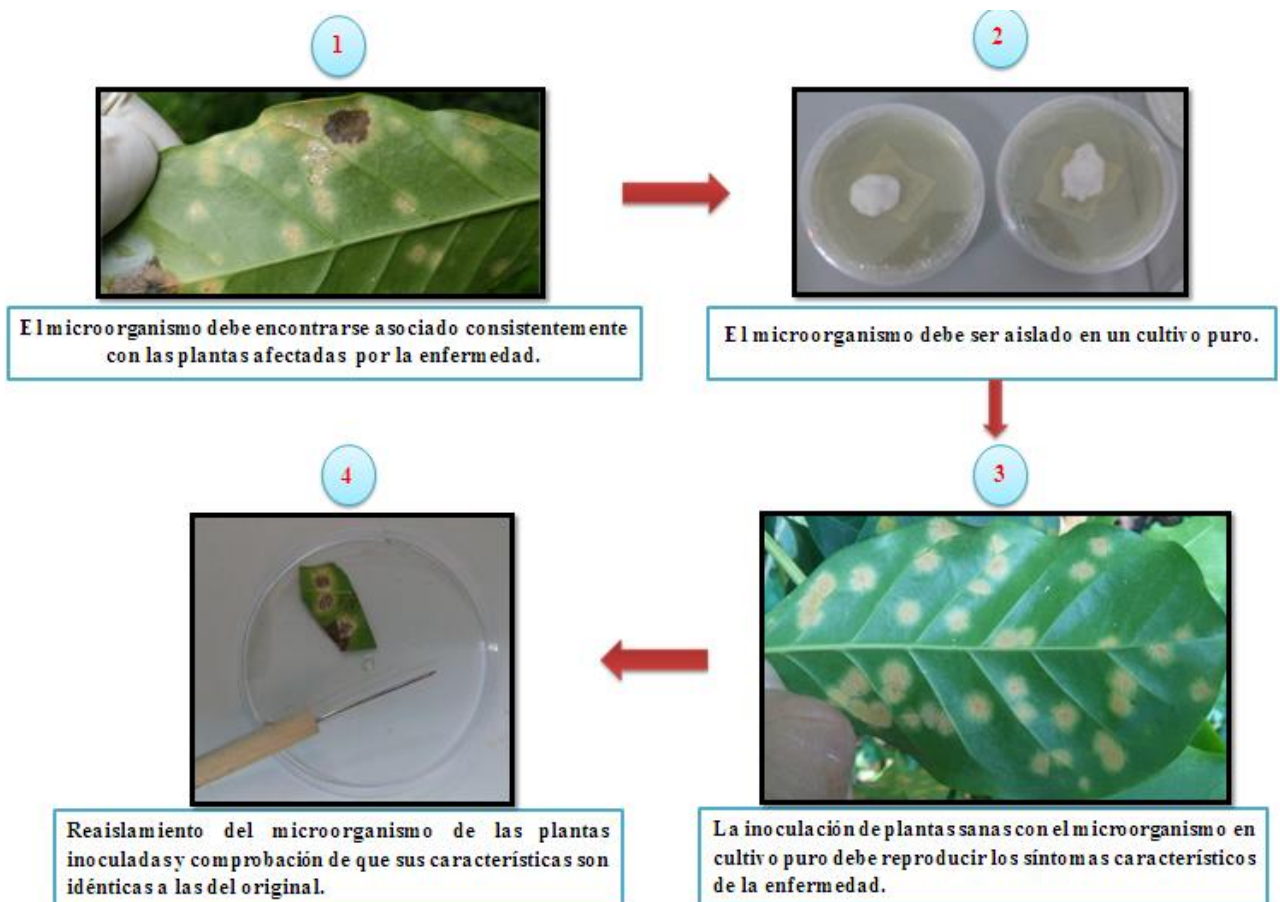
Pústula: pequeña ampolla epidérmica que se forma por fructificaciones de hongos, como los Uredinales, o por las lesiones que estos originan en los tejidos epidérmicos de las hojas. Al desarrollarse la pústula, se rompe la epidermis y las esporas quedan en contacto directo con el exterior (Rey *et al.* 2007).

Soro: acúmulo o masas de esporas en vías de expulsión, como en los hongos Uredinales causantes de royas y tizones (Rey *et al.* 2007).

Uredospora: espora binucleada que se forma en los uredosoros de los hongos del grupo de las royas (Uredinales), capaz de reinfectar al hospedante sobre la cual se originó (Rey *et al.* 2007).



Anexo 2. Fotografías que muestran la diferencia del desarrollo de *L. lecanii* y *S. lanosoniveum* sobre las pústulas de roya. A) *L. lecanii* forma necrosis en el tejido vegetal, tomada por el técnico de PROCAFÉ German Mejía 2004. B) *S. lanosoniveum* colonizando una pústula de roya sin formar necrosis en el tejido vegetal, tomada por Bianca Rosales y Otto Amaya 2017.



Anexo 3. Esquema sobre los Postulados de Koch.



Anexo 4. Proceso de recolección de muestras foliares con el hiperparásito *S. lanosoniveum* cubriendo pústulas de roya.



Anexo 5. Proceso de preparación de los inóculos de *S. lanosoniveum* aplicados a las plantas de café infectadas.

Tratamiento:			Repetición:			
N° de planta	Rama del estrato bajo		Rama del estrato medio		Rama del estrato alto	
	N° de hojas sanas	N° de hojas con roya	N° de hojas sanas	N° de hojas con roya	N° de hojas sanas	N° de hojas con roya
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
..... 50						

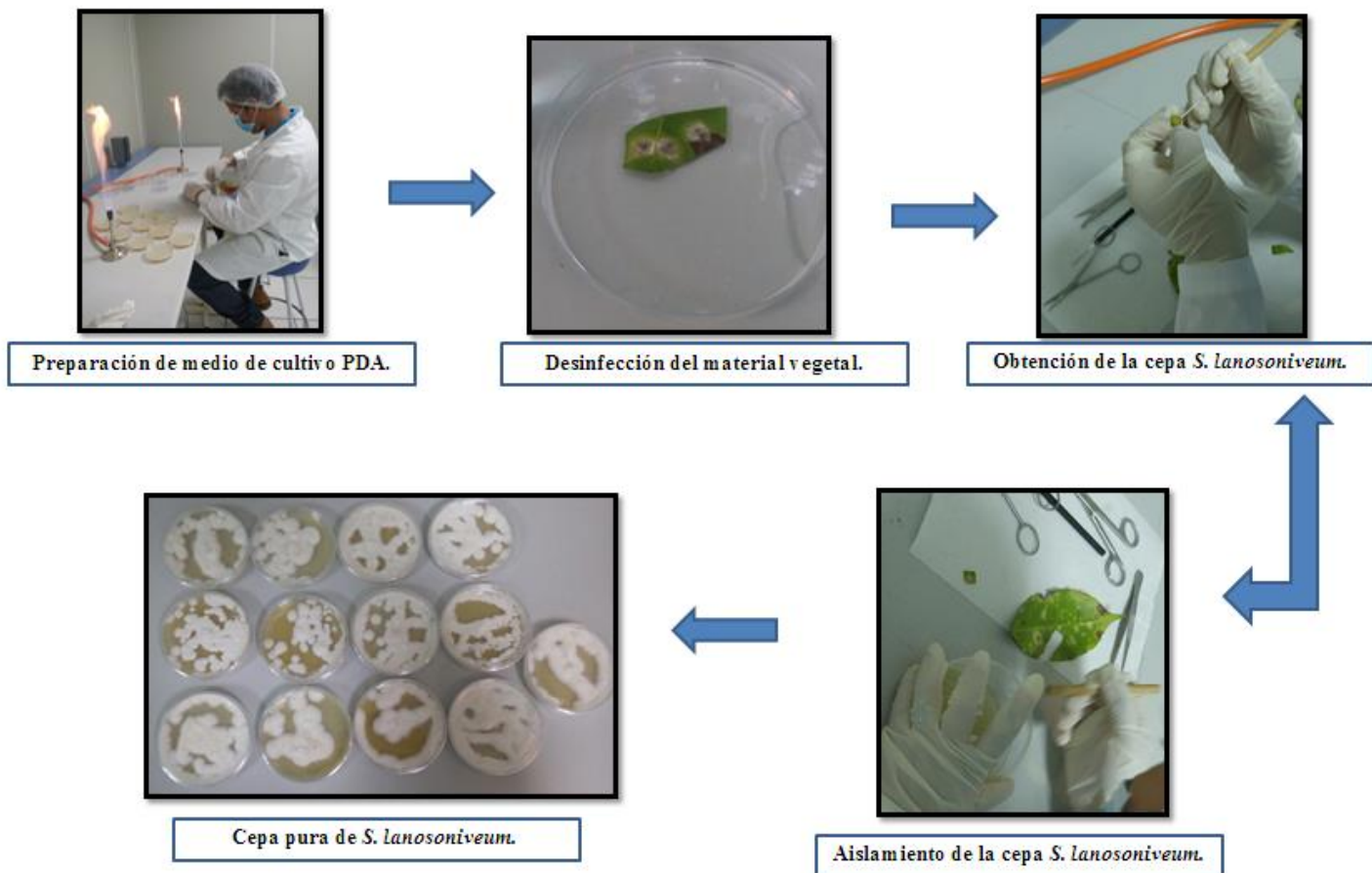
Anexo 6. Formato para evaluación de incidencia de roya por estrato en cada planta.

N° de Planta	Estrato	Hoja 1		Hoja 2		Hoja 3	
		NP	PD	NP	PD	NP	PD
1	bajo						
	medio						
	alto						
2.....50	bajo						
	medio						
	alto						

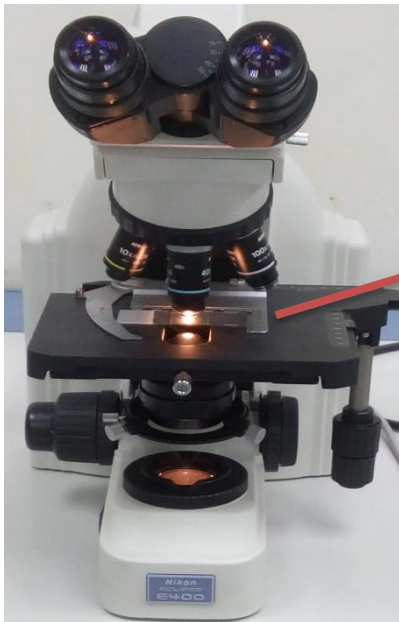
Anexo 7. Formato para evaluación de severidad de roya por número de pústulas y porcentaje de daño en cada hoja seleccionada.



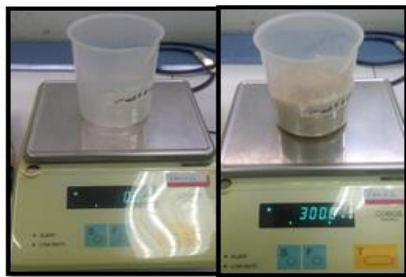
Anexo 8. Selección de plantas, ramas y hojas evaluadas para la determinación de la incidencia y severidad de roya.



Anexo 9. Proceso de aislamiento y purificación de *S. lanosoniveum* en medio de cultivo PDA.



Anexo 10. Identificación del hongo *Simplicillium lanosoniveum* a través de un microscopio de campo claro.



Pesado de los granos de arroz precocido.



Humedecimiento de los granos de arroz con agua destilada.



Colado del arroz.



Disolución del antibiótico en el preparado.



Secado del arroz en papel toalla.



Sellado de las bolsas para autoclavar.

Anexo 11. Proceso de preparación del arroz para la producción de esporas de *S. lanosoniveum*.



Anexo 12. Proceso de inoculación del arroz para la producción de esporas de *S. lanosoniveum*.



Anexo 13. Procedimiento de la suspensión de esporas de *S. lanosoniveum* para el conteo en la cámara de neubauer.



29 de marzo 2017
TM-451A

Srta. Bianca Rosales,
El Salvador.

Características de la muestra:

Género/especie/variedad: hongos

Recolectada por: se ignora

Parte (s) de la planta analizadas: no aplica/aislamientos

Síntomas: se ignoran

Cláusula: ninguna

El análisis del ADN se realizó a partir de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Se utilizaron cebadores universales de la región ribosomal del ITS. Los resultados fueron confirmados mediante electroforesis en gel de agarosa (0.8%). La secuenciación se realizó mediante producto de PCR purificado a una concentración de 50 ng/μl. Los resultados pueden ser enviados como archivos adjuntos al correo electrónico si son solicitados, incluyendo los cromatogramas.

Los resultados según el BLAST (GenBank-NCBI) muestran el siguiente resultado:

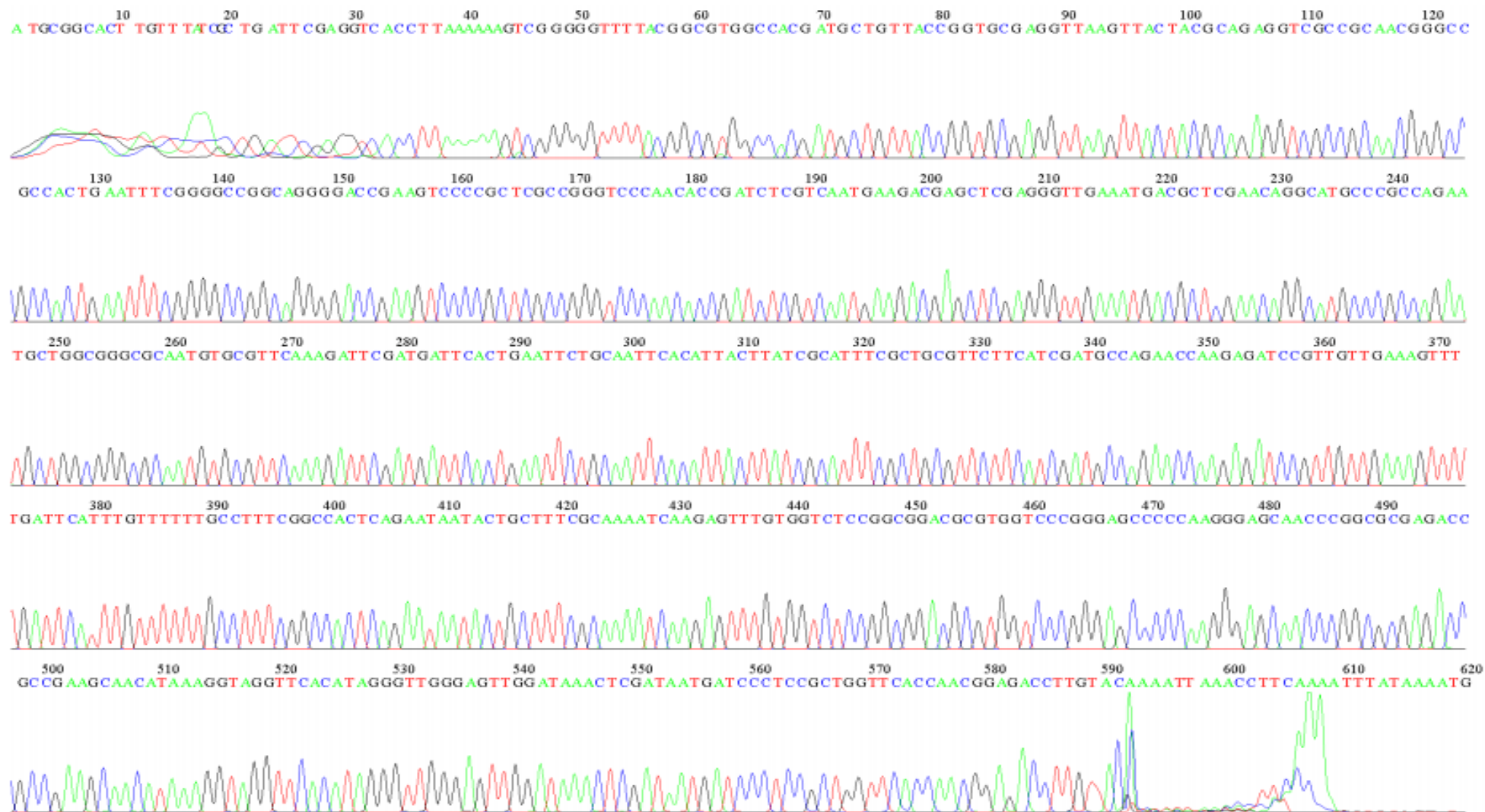
ID: Branca Otto, para un total de 600 bases analizadas, 593 corresponden a un 99% de similitud con muestras de *Simplicillium lanosoniveum* (número de accesión KT878334.1).

Atentamente,

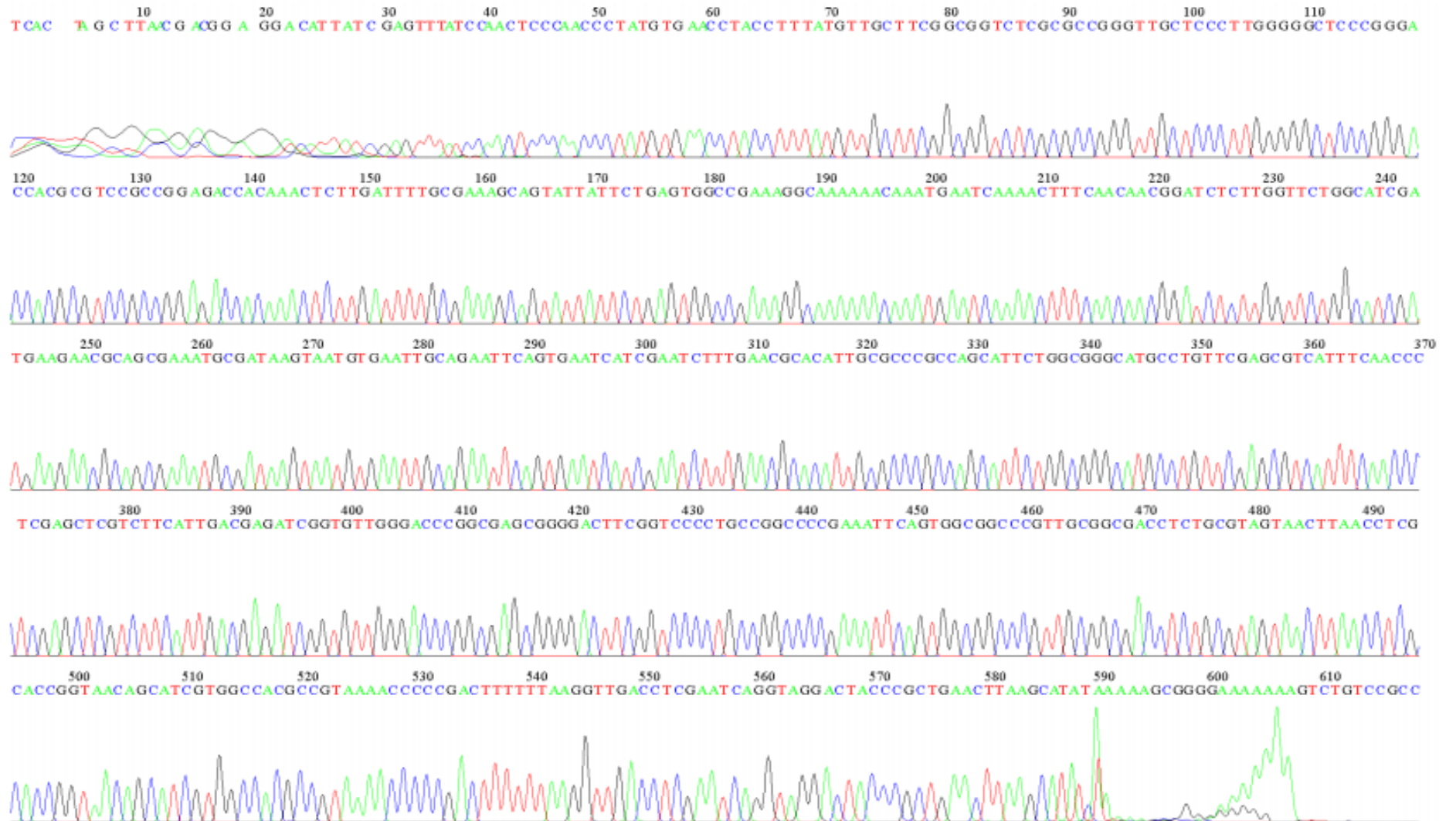


Dra. Mónica Blanco Meneses
Laboratorio de Técnicas Moleculares Aplicadas a la Fitoprotección

Anexo 14. Informe de análisis de ITS (espaciadores internos transcritos) emitido por el Laboratorio de Técnicas Moleculares Aplicadas a la Fitoprotección de la UCR.



Anexo 15. Amplificación del ADN ribosomal con el cebador 4.



Anexo 16. Amplificación del ADN ribosomal con el cebador 5.

Porcentajes de incidencia de roya del tratamiento de 900 gr de arroz inoculados con <i>S. lanosoniveum</i> .									
Nº de planta	Dia 0	Dia 15	Dia 30	Dia 45	Nº de planta	Dia 0	Dia 15	Dia 30	Dia 45
1	24,44	24,44	24,44	24,44	26	32,35	32,35	29,41	26,47
2	25,00	25,00	25,00	25,00	27	32,43	32,43	32,43	29,73
3	25,00	25,00	25,00	19,44	28	33,33	33,33	33,33	33,33
4	25,00	25,00	25,00	22,22	29	33,33	33,33	33,33	27,78
5	25,64	25,64	25,64	20,51	30	33,33	33,33	31,43	19,44
6	25,71	25,71	25,71	20,00	31	34,21	34,21	34,21	28,95
7	25,71	25,71	25,71	17,14	32	34,21	34,21	32,43	28,95
8	25,71	25,71	25,71	22,86	33	34,38	34,38	34,38	21,88
9	26,32	26,32	26,32	26,32	34	34,38	34,38	34,38	28,13
10	27,03	27,03	27,03	24,32	35	34,38	34,38	34,38	31,25
11	28,57	28,57	28,57	28,57	36	35,14	35,14	35,14	29,73
12	28,57	28,57	28,57	22,86	37	35,90	35,90	35,90	33,33
13	29,41	29,41	29,41	29,41	38	36,11	36,11	36,11	25,71
14	29,41	29,41	29,41	14,71	39	36,36	36,36	36,36	30,30
15	29,41	29,41	29,41	26,47	40	36,36	36,36	36,36	30,30
16	29,73	29,73	29,73	29,73	41	36,67	36,67	36,67	26,67
17	30,30	30,30	28,13	21,21	42	36,67	36,67	30,00	23,33
18	30,30	30,30	30,30	21,21	43	37,14	37,14	37,14	34,29
19	31,25	31,25	28,13	25,00	44	37,14	37,14	37,14	31,43
20	31,25	31,25	31,25	25,00	45	37,14	37,14	37,14	34,29
21	31,58	31,58	28,95	23,68	46	38,46	38,46	38,46	34,62
22	31,58	31,58	31,58	25,00	47	39,47	41,03	41,03	38,46
23	32,14	32,14	32,14	28,57	48	40,00	40,00	37,93	38,71
24	32,26	32,26	30,00	19,35	49	40,00	40,00	40,00	25,71
25	32,35	32,35	32,35	30,30	50	44,83	44,83	44,83	37,93

Anexo 17. Datos de la incidencia de roya registrada en el tratamiento de 900 g de arroz inoculados con el hiperparásito en estudio.

Porcentajes de incidencia de roya del tratamiento de 1500 gr de arroz inoculados con <i>S. lanosoniveum</i> .									
Nº de planta	Dia 0	Dia 15	Dia 30	Dia 45	Nº de planta	Dia 0	Dia 15	Dia 30	Dia 45
1	23,08	23,08	7,50	7,50	26	30,56	30,56	16,67	11,11
2	23,68	23,68	7,89	0,00	27	30,56	30,56	19,44	10,81
3	24,32	24,32	10,81	5,41	28	30,56	30,56	16,67	11,11
4	25,71	25,71	11,43	5,71	29	30,56	30,56	16,67	8,33
5	25,71	25,71	8,57	5,71	30	31,25	31,25	15,63	9,38
6	25,71	25,71	14,29	2,86	31	31,43	31,43	20,00	8,57
7	25,71	25,71	14,29	5,71	32	31,43	31,43	14,29	8,57
8	26,32	26,32	10,00	5,00	33	31,43	31,43	17,14	5,71
9	26,32	26,32	21,05	5,26	34	32,14	32,14	14,29	10,71
10	26,47	26,47	17,65	8,82	35	32,26	32,26	22,58	9,68
11	27,03	27,03	18,92	8,11	36	32,35	32,35	14,71	0,00
12	27,27	27,27	15,15	6,06	37	33,33	33,33	20,00	10,00
13	27,50	27,50	17,50	5,00	38	33,33	33,33	21,21	12,12
14	27,78	27,78	19,44	8,33	39	33,33	33,33	18,52	11,11
15	27,78	27,78	5,26	2,63	40	33,33	33,33	16,67	11,11
16	27,78	27,78	11,11	5,56	41	34,29	34,29	20,00	11,43
17	28,21	28,21	17,95	5,13	42	34,48	34,48	20,69	10,34
18	28,57	28,57	20,00	8,57	43	35,14	35,14	21,62	5,41
19	28,95	28,95	13,16	7,89	44	35,29	35,29	26,47	20,59
20	29,03	29,03	12,90	6,45	45	35,48	35,48	19,35	6,45
21	29,41	29,41	11,76	8,82	46	35,71	34,48	17,24	6,90
22	29,73	37,93	13,79	6,90	47	35,90	35,90	17,95	12,82
23	30,00	30,00	10,00	2,50	48	36,11	36,11	19,44	8,33
24	30,00	30,00	13,33	6,67	49	40,00	40,00	36,00	8,00
25	30,23	30,23	18,60	13,95	50	42,31	42,31	26,92	11,54

Anexo 18. Datos de la incidencia de roya registrada en el tratamiento de 900 g de arroz inoculados con el hiperparásito en estudio

Porcentajes de incidencia de roya del Grupo control - 0 gr de arroz inoculados con <i>S. lanosoniveum</i> .									
Nº de planta	Dia 0	Dia 15	Dia 30	Dia 45	Nº de planta	Dia 0	Dia 15	Dia 30	Dia 45
1	23,68	23,68	28,95	31,58	26	29,41	29,41	38,24	38,24
2	23,81	23,81	26,19	26,19	27	29,73	29,73	35,14	35,14
3	24,32	24,32	27,03	28,21	28	30,30	30,00	35,00	35,00
4	24,32	24,32	29,73	29,73	29	30,30	30,30	36,36	36,36
5	25,00	25,00	27,78	27,78	30	30,30	30,30	30,30	30,30
6	25,00	25,00	25,00	25,00	31	30,56	30,56	30,56	30,56
7	25,00	25,00	27,78	30,56	32	30,77	30,77	38,46	41,03
8	25,64	25,64	25,64	25,64	33	30,77	30,77	38,46	43,59
9	25,71	25,71	28,57	28,57	34	31,25	31,25	31,25	31,25
10	25,71	28,57	34,29	37,14	35	31,43	31,43	31,43	31,43
11	26,32	26,32	26,32	26,32	36	31,43	31,43	34,29	37,14
12	26,32	26,32	31,58	31,58	37	31,43	31,43	37,14	40,00
13	26,83	26,83	30,23	30,23	38	31,58	31,58	34,21	36,84
14	27,27	27,27	28,57	28,57	39	31,58	31,58	31,58	31,58
15	27,27	27,27	30,30	30,30	40	32,35	32,35	35,29	35,29
16	27,50	27,50	30,00	35,00	41	32,43	32,43	32,43	32,43
17	28,13	28,13	31,25	31,25	42	32,50	32,50	32,50	35,00
18	28,13	28,13	31,25	34,38	43	33,33	33,33	33,33	33,33
19	28,21	28,21	30,77	33,33	44	34,29	34,29	34,29	34,29
20	28,57	28,57	31,43	34,29	45	35,48	35,48	38,71	38,71
21	28,57	28,57	28,57	31,43	46	36,11	36,11	36,11	38,89
22	28,57	28,57	34,29	34,29	47	36,11	36,11	36,84	36,84
23	28,95	28,95	28,95	31,58	48	37,93	37,93	37,93	37,93
24	28,95	29,73	37,84	37,84	49	38,46	38,46	38,46	38,46
25	29,41	29,41	29,41	29,41	50	42,31	42,31	42,31	42,31

Anexo 19. Datos de la incidencia de roya registrada en el grupo control.

Promedios de severidad de roya del tratamiento de 900 gr de arroz inoculados con <i>S. lanosoniveum</i> .									
Nº de planta	Dia 0	Dia 15	Dia 30	Dia 45	Nº de planta	Dia 0	Dia 15	Dia 30	Dia 45
1	8,11	6,89	3,33	1,56	26	9,22	8,11	4,67	2,11
2	10,78	9,22	4,78	2,33	27	12,22	9,56	5,67	3,00
3	8,22	7,22	4,00	1,78	28	8,89	7,33	5,11	2,22
4	7,44	6,44	3,22	1,67	29	11,56	8,11	5,00	2,78
5	9,33	7,67	4,11	2,56	30	10,11	7,67	5,00	2,56
6	10,67	8,78	5,11	2,67	31	11,67	9,78	5,56	2,78
7	6,56	5,44	2,89	1,44	32	7,00	5,44	2,67	1,00
8	10,89	9,11	5,22	2,89	33	5,44	4,56	2,56	1,00
9	10,78	8,78	5,44	3,44	34	6,67	4,78	2,33	0,67
10	10,33	9,00	4,78	2,22	35	10,11	8,22	4,22	2,00
11	12,67	10,11	5,89	3,89	36	8,78	6,89	3,56	1,56
12	6,22	5,78	3,22	2,11	37	10,00	8,00	5,33	2,56
13	8,56	7,33	3,67	2,33	38	13,44	11,00	5,22	2,89
14	10,11	8,67	5,11	2,56	39	10,11	8,78	5,11	2,89
15	9,56	7,00	4,22	2,00	40	9,56	8,00	4,78	2,67
16	9,89	8,56	4,67	2,11	41	8,89	7,78	4,11	1,11
17	7,56	6,00	3,56	1,22	42	10,33	9,33	5,22	2,56
18	11,00	8,78	4,89	2,89	43	7,78	6,00	3,22	1,89
19	8,67	7,22	4,11	2,00	44	7,44	6,00	3,44	2,00
20	7,89	6,00	3,67	2,44	45	13,78	11,33	6,44	3,44
21	6,44	4,67	2,89	1,00	46	6,78	5,78	3,00	1,67
22	7,00	5,89	3,11	1,78	47	12,33	9,89	5,11	2,67
23	11,11	9,56	5,44	2,56	48	6,22	4,44	2,33	1,44
24	8,44	6,78	3,56	1,78	49	12,11	10,33	5,44	2,67
25	13,00	10,33	6,44	3,67	50	8,89	6,78	3,33	0,89

Anexo 20. Datos de la severidad de roya registrada en el tratamiento de 900 g de arroz inoculados con el hiperparásito en estudio.

Promedios de severidad de roya del tratamiento de 1500 gr de arroz inoculados con <i>S. lanosoniveum</i> .									
Nº de planta	Día 0	Día 15	Día 30	Día 45	Nº de planta	Día 0	Día 15	Día 30	Día 45
1	8,333	6,56	2,00	0,78	26	8,556	6,89	2,67	0,89
2	9,222	7,11	2,22	0,67	27	9,556	7,44	2,44	0,78
3	7,667	5,67	2,56	1,00	28	10,78	8,00	2,56	1,33
4	12,33	9,67	3,11	1,33	29	6,667	5,56	1,44	0,00
5	8,111	5,78	1,33	0,89	30	7	6,22	1,44	0,33
6	8,333	6,11	1,33	0,56	31	11,56	8,78	2,44	1,00
7	10,56	7,89	2,00	1,00	32	6,778	5,33	1,33	0,89
8	11,67	8,89	2,11	1,00	33	7,556	5,56	1,89	0,89
9	6	5,11	0,89	0,89	34	9,778	7,56	2,11	0,67
10	7,667	5,56	1,22	0,56	35	6,444	5,11	1,00	0,78
11	8,889	7,00	1,67	0,44	36	12,11	8,78	2,00	1,00
12	9,889	7,67	2,00	1,00	37	5,333	3,78	0,78	0,33
13	8,778	6,11	1,33	1,11	38	8,222	6,22	1,44	0,67
14	7	5,11	1,22	0,33	39	8	6,11	1,11	0,44
15	10,33	7,67	1,78	0,44	40	9,111	6,67	1,78	0,33
16	8,556	6,44	2,00	1,00	41	10,67	8,22	2,22	0,67
17	8,889	6,78	2,00	1,00	42	5,333	3,78	1,44	0,44
18	7,222	5,22	1,22	0,44	43	8,444	6,56	2,44	1,56
19	7,778	6,00	1,89	0,67	44	7,222	5,11	2,00	0,78
20	6,556	5,11	2,22	1,22	45	5,444	3,44	1,22	1,11
21	7,556	6,44	2,56	1,00	46	9,333	6,33	2,00	0,89
22	12	8,78	2,78	0,56	47	9,111	6,44	1,56	0,78
23	7	4,33	0,89	0,00	48	9	6,33	1,44	0,89
24	9,889	8,00	1,33	0,89	49	11,22	8,11	2,00	0,67
25	9,778	7,11	1,78	0,33	50	12,89	8,78	1,56	0,67

Anexo 21. Datos de la severidad de roya registrada en el tratamiento de 1500 gr de arroz inoculados con el hiperparásito en estudio.

Promedios de severidad roya del grupo control - 0 gr de arroz inoculados con <i>S. lanosoniveum</i> .									
Nº de planta	Día 0	Día 15	Día 30	Día 45	Nº de planta	Día 0	Día 15	Día 30	Día 45
1	7,67	7,78	8,22	8,67	26	9,11	9,44	9,89	10,22
2	9,78	10,33	10,56	10,89	27	9,33	9,56	9,89	10,22
3	7,67	7,78	8,33	8,67	28	11,89	12,33	12,89	13,33
4	5,00	5,00	5,44	5,78	29	6,89	6,89	7,56	7,78
5	5,22	5,33	5,78	6,00	30	6,67	6,78	7,56	7,78
6	9,56	10,00	10,44	10,56	31	12,00	12,44	12,89	13,33
7	7,67	7,89	8,33	8,56	32	5,67	5,78	6,22	6,56
8	5,78	5,89	6,22	6,67	33	6,67	6,89	7,56	7,89
9	11,78	12,11	12,78	13,11	34	6,78	6,89	7,44	7,78
10	5,89	6,22	6,56	6,78	35	5,33	5,33	5,78	6,11
11	9,89	10,33	10,89	11,33	36	7,33	7,56	7,89	8,22
12	6,22	6,33	6,78	7,00	37	7,78	8,11	8,44	8,89
13	5,11	5,33	5,78	6,00	38	6,78	7,00	7,56	7,78
14	9,78	10,22	10,56	10,89	39	7,00	7,22	7,67	8,11
15	6,89	7,22	7,44	7,56	40	6,78	7,11	7,67	7,89
16	10,33	10,89	11,44	11,89	41	9,89	10,22	10,78	11,22
17	8,22	8,33	9,11	9,33	42	8,00	8,33	8,78	9,11
18	10,00	10,44	11,00	11,44	43	6,00	6,22	6,56	6,67
19	6,56	6,78	7,33	7,78	44	7,56	7,89	8,33	8,67
20	8,78	9,11	9,44	9,89	45	7,11	7,33	7,78	8,00
21	8,00	8,22	8,67	9,00	46	10,44	10,89	11,67	12,11
22	8,44	8,67	9,22	9,67	47	7,00	7,33	7,78	8,22
23	6,78	7,00	7,67	7,89	48	9,22	9,67	10,33	10,67
24	11,00	11,44	12,22	12,67	49	7,00	7,11	7,56	7,67
25	6,78	7,22	7,44	7,78	50	8,22	8,33	8,78	9,33

Anexo 22. Datos de la severidad de roya registrada en el grupo control.