

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



“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”

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

YOLANDA IVETTE BARRERA JIMÉNEZ
JENNY ELIZABETH MENJÍVAR CRUZ

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, DICIEMBRE DE 2004

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



“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”

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:
YOLANDA IVETTE BARRERA JIMÉNEZ
JENNY ELIZABETH MENJÍVAR CRUZ

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

ASESORAS:

M. Sc. EVELYN MARINA CANJURA SARAVIA

M. Sc. RHINA ESMERALDA ESQUIVEL VÁSQUEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, DICIEMBRE DE 2004

JURADO EXAMINADOR

ASESORA:

M. Sc. EVELYN MARINA CANJURA SARAVIA

ASESORA:

M. Sc. RHINA ESMERALDA ESQUIVEL VÁSQUEZ

JURADO:

M. Sc. MARÍA OFELIA GONZÁLEZ

JURADO:

LIC. MARINA ESTELA DE TOBAR

CIUDAD UNIVERSITARIA, DICIEMBRE DE 2004

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

Dra. María Isabel Rodríguez
RECTORA

Lic. Pedro Rosalío Escobar
FISCAL

M. Sc. José Héctor Elías Díaz
DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

M. Sc. Ana Martha Zetino Calderón
DIRECTORA DE LA ESCUELA DE BIOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, DICIEMBRE DE 2004

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso, por las tantas bendiciones recibidas y permitirme alcanzar otro de mis sueños.

A mis padres, por que cada una de sus palabras y ejemplos han iluminado mis pasos.

A mis hermanas, compañeras incondicionales de risas, sueños, ilusiones, llantos y logros.

A la memoria de mi abuelo, Koky. Huella imborrable en todos los que te conocimos.....

Y demás familia y amigos, este logro también es suyo.

Yolanda Ivette

A Dios todo poderoso, por haberme bendecido e iluminado en la culminación de esta anhelada meta.

A mis padres, Ana Daysi y Reinaldo Antonio, en quienes siempre encontré apoyo, por mantener en mí siempre su esperanza y por haberles cumplido el sueño de verme graduada.

A mi hijo, David Alejandro, con todo mi amor por ser la luz y el motor de mi vida.

A David Elías, por su amor, comprensión y decidido apoyo incondicional.

A mis hermanos, con mucho cariño por compartir mis ilusiones y para que no abandonen sus aspiraciones.

Y demás familia y amigos, que comparten conmigo este triunfo.

Jenny Menjívar

AGRADECIMIENTOS

A nuestra asesora *M. Sc.* Evelyn Marina Canjura Saravia, por toda la confianza depositada y los conocimientos transmitidos para la elaboración de esta investigación.

A nuestra profesora y asesora *M. Sc.* Rhina Esmeralda Esquivel, por su apoyo, enseñanza y orientación hacia la culminación de este trabajo.

A nuestras observadoras *M. Sc.* María Ofelia González y Lic. Marina Estela de Tobar, por sus observaciones acertadas.

Un agradecimiento especial a todo el Personal Administrativo, Técnico, Investigativo y de Apoyo que labora en la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFE), por su apoyo incondicional.

Al Dr. Sergio Lombardo Gil, por habernos aconsejado y haber depositado confianza y paciencia en la realización de este estudio.

A la Lic. Martha Lidia Reyes de Amaya, encargada del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales por brindarnos todo lo necesario para realizar la fase de laboratorio.

A nuestro compañero y amigo Ernesto Galdamez Lúe por su apoyo y paciencia esenciales en nuestro trabajo.

A las fincas San Jorge, Santiago de María y Los Carlos, por habernos brindado la fuente de investigación para realizar el presente estudio.

Al Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), por abrirnos sus puertas, en especial a todo el personal de la Biblioteca Orton porque estuvieron siempre atentos a brindarnos todo el apoyo necesario.

A la Dra. Ulrike Krauss y M. Sc. Martijn Ten Hoopen, por sus sugerencias y enseñanzas brindadas.

A Maybelline Escalante, Lorena Orozco y Emilce Echeverría, por recibirnos con los brazos abiertos.

Queremos agradecer muy profundamente a nuestro amigo Hernán Soto y a su apreciable familia, por abrirnos las puertas de su casa, ustedes también hicieron posible este sueño.

Las Autoras

Quiero agradecer a esa persona que ha sabido ser más que mi amigo, compañero y apoyo incondicional: Hugo. Gracias por estar allí cuando más necesito y por ser participe de mis sueños. A la Familia Menjívar Cruz por su amistad y confianza durante toda mi carrera. A mi tía Mandy por su apoyo incondicional.

Yolanda Barrera

Agradezco muy profundamente a la Familia Barrera Jiménez por su confianza y consejos brindados. Un especial agradecimiento a Carmen Elena Sánchez de Elías y José Armando Elías, no solo por su amistad, si no también por todo el apoyo y confianza que me han brindado; Además quiero agradecer muy especialmente a mi hermano Hugo Menjívar, por su oportuna ayuda en el trayecto de este estudio ya que su colaboración fue clave para llegar a la meta.

Jenny Menjívar

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE ANEXOS	iii
RESUMEN	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	3
2.1 Origen y distribución geográfica del café (<i>Coffea arabica</i>).....	3
2.2 Cultivo del café	4
2.2.1 Cultivo del café en El Salvador.....	5
2.3 La Roya del café (<i>Hemileia vastatrix</i> BERK. & BR.).....	6
2.3.1 Control de la roya del café (<i>Hemileia vastatrix</i> BERK. & BR.)..	9
2.3.2 Resistencia genética	10
2.3.3 Control biológico.....	11
2.4 <i>Verticillium lecanii</i> (Zimn.) Viegas.....	12
2.4.1 Modo de acción de <i>Verticillium Lecanii</i>	14
2.4.2 Reproducción <i>In vitro</i>	16
2.5 Reproducción de hongos en fermentadores artesanales	18
2.6 Formulación de agentes de control biológico	19
III. OBJETIVOS	21
IV. METODOLOGÍA	22
4.1 Localización.....	22
4.2 Aislamiento de <i>Verticillium sp</i>	22
4.3 Reproducción de conidias de <i>Verticillium sp.</i> en el fermentador.	23
4.3.1 Preparación del sustrato.....	23

4.3.2 Inoculación de Verticillium sp. en los fermentadores	24
4.4 Evaluación de la producción de conidias en el fermentador a tres diferentes concentraciones de melaza	24
4.5 Tratamientos	25
4.6 Diseño experimental.....	25
4.7 Modelo estadístico.....	26
4.8 Variable de respuesta.....	26
4.9 Análisis de resultados.....	26
V. RESULTADOS.....	28
5.1 Reproducción masiva de tres cepas de Verticillium sp. en diferentes concentraciones de melaza en el fermentador	28
5.2. Parámetros de la curva Gompertz.....	30
5.2.1 Nivel inicial de conidias	30
5.2.2 Nivel final de conidias.....	30
5.2.3 Tiempo en días del punto de inflexión	30
5.2.4 Medida de la pendiente en el punto de inflexión	31
VI. DISCUSIÓN	33
6.1 Parámetros de las curvas Gompertz	33
6.1.1 Nivel final de conidias.....	33
6.1.2 Tiempo en días del punto de inflexión	34
6.1.3 Medida de la pendiente en el punto de inflexión	35
VII. CONCLUSIONES	36
VIII. RECOMENDACIONES.....	37
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
ANEXOS	

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Ubicación geográfica y características climáticas de tres zonas cafetaleras de El Salvador, 2004	22
Cuadro 2. Separación de medias del tiempo (días) del punto de inflexión mediante la prueba de Tukey para tres cepas de Verticillium sp	31
Cuadro 3. Separación de medias de la medida de la pendiente en el punto de inflexión mediante la prueba de Tukey para tres cepas de Verticillium sp	32

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Hoja con pústulas de roya (Foto tomada por German Mejía, PROCAFE, 2004).....	7
Figura 2. Conidióforos de <i>Verticillium lecanii</i> vistos al microscopio compuesto (foto tomada del Commonwealth Mycological Institute (1979) citado por Canjura (2000))	13
Figura 3. Hojas de café con pústulas de roya hiperparasitadas por <i>Verticillium sp.</i> ; se observan las pústulas cubiertas por micelio blanco típico de <i>Verticillium sp.</i> (Tomada por German Mejía, PROCAFE, 2004)	15
Figura 4. Fermentador artesanal para reproducción masiva de <i>Verticillium sp.</i> (Canjura, 2000)	19
Figura 5. Curva de crecimiento biológico con tendencia sigmoideal de tipo Gompertz de cuatro parámetros.....	27
Figura 6. Concentración de conidias/ml de tres cepas de <i>Verticillium sp.</i> obtenidas en fermentadores artesanales a tres concentraciones diferentes de melaza (8g/L, 4g/L y 0.5g/L) durante un período de 15 días	29

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza del nivel final de conidias con datos transformados (Log Y) de la interacción de tres cepas de ***Verticillium sp.***, a tres concentraciones diferentes de melaza y sus tres repeticiones.

Anexo 2. Análisis de varianza del tiempo (días) del punto de inflexión de tres cepas de ***Verticillium sp.***, a tres concentraciones diferentes de melaza y sus tres repeticiones.

Anexo 3. Análisis de varianza de la pendiente en el punto de inflexión de tres cepas de ***Verticillium sp.***, a tres concentraciones de melaza y sus tres repeticiones.

RESUMEN

El trabajo se realizó en dos fases en las instalaciones de la Fundación Salvadoreña para investigaciones de Café (PROCAFE), Santa Tecla, Dpto. de La Libertad, El Salvador; en la primera fase se recolectaron y aislaron tres cepas de *Verticillium sp.*, provenientes de tres sitios representativos de la caficultura salvadoreña: Santiago de María, Chalchuapa y Ataco; en la segunda se evaluó la reproducción masiva del hongo hiperparásito en fermentadores artesanales.

Las cepas de *Verticillium sp.* se cultivaron durante dos semanas en medio de papa dextrosa agar acidificado (PDAA); luego se inocularon en los fermentadores artesanales utilizando como sustrato un litro de agua destilada, melaza (a tres concentraciones 8.0 g/L, 4.0 g/L y 0.5 g/L), 1.12 ml de Bayfolan forte y 20 gotas de ácido láctico, durante un período de 15 días. Se construyeron nueve curvas del tipo Gompertz de cuatro parámetros, para observar el crecimiento biológico de las cepas; seguidamente se realizó el análisis de varianza de los parámetros que componen las curvas y así determinar las mejores cepas y los niveles de melaza.

El análisis de varianza demostró que no hubo diferencias significativas entre cepas para el nivel final de conidias; el máximo valor alcanzado para las tres cepas fue de hasta 10^{10} conidias/mililitro.

De igual forma no se encontraron diferencias significativas entre concentraciones de melaza para el parámetro tiempo (días) para alcanzar el punto de inflexión.

Se observaron diferencias significativas en cepas y en la interacción cepa-concentración de melaza para el parámetro tiempo (días) para alcanzar el punto de inflexión; la cepa de Santiago de María fue la que más se demoró en alcanzar dicho punto (26.8 días), comparada con la cepa Chalchuapa que lo logró en 2.1 días; siendo la cepa Ataco la que logró alcanzarlo en un tiempo intermedio (14.0 días).

Se observaron diferencias significativas en cuanto a la medida de la pendiente en el punto de inflexión; donde la cepa de Ataco presentó un mayor porcentaje en el valor de la pendiente (4.28) contra la cepa Chalchuapa (0.15) y Santiago de María que fue la que presentó decremento de concentración de conidias/ml (-0.24).

Se concluyó que todas las cepas de *Verticillium sp.* se lograron reproducir en forma satisfactoria en fermentadores artesanales; por lo tanto, dichas cepas pueden ser consideradas para su reproducción a través de fermentadores artesanales.

Las curvas de crecimiento biológico para las cepas de Santiago de María y Chalchuapa, referentes a la concentración 0.5 g de melaza/L no presentaron un comportamiento típico de crecimiento biológico en la interacción cepa-concentración debido a la mala toma de datos y a la falta de nutrientes en el fermentador, por lo tanto esta concentración no puede ser tomada en cuenta para la reproducción del hiperparásito.

I. INTRODUCCIÓN

El café fue por décadas uno de los principales rubros de las economías centroamericanas; su influencia en la formación de los tejidos económicos y sociales en la región ha sido sin duda muy importante y aun hoy el desempeño del sector cafetalero incide sensiblemente en el comportamiento general en las economías del área (Flores, *et al*, 2002).

Durante los últimos años el cultivo del cafeto ha venido declinando debido a factores externos, en los que converge el crecimiento del área cultivada y producción mundial, que ha llegado a niveles mayores al consumo cuyo efecto son los precios deprimidos, debido a la oferta mundial excesiva. Sin embargo, a pesar de la etapa crítica a la que se enfrenta, continúa y continuará siendo de vital importancia para la sostenibilidad de El Salvador (Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café, 2001).

La producción cafetalera de El Salvador, además de estar inmersa en la crisis presenta grandes problemas en los que sobresalen los altos costos de producción y los bajos precios que se pagan al productor, estos problemas se agudizan debido a la incidencia de plagas y enfermedades (Monzón, 1992).

Una de las enfermedades más serias del cafeto es la roya del café ***Hemileia vastatrix*** Berkeley & Broome (Monzón, 1992), la cual causa grandes pérdidas en el rendimiento, debido a que su ataque provoca una fuerte defoliación prematura de la planta. La enfermedad no mata los árboles directamente, pero puede llegar a hacerlo si no es tratada a tiempo (Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 1988).

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

Dentro de las prácticas de manejo han cobrado importancia aquellas que aprovechan al máximo los factores naturales de control y se complementa con el uso de fungicidas en los momentos más oportunos (Ministerio de Agricultura, Ganadería y alimentación, 1983). Entre los agentes naturales de control contra la roya del café más común es, un hongo hiperparásito del género **Verticillium**, que se presenta naturalmente en los cafetales, es de apariencia algodonosa, de color blanco y se observa sobre las pústulas de la roya (Canjura, 2000).

En estudios recientes, se ha podido reproducir **Verticillium sp.** a nivel de laboratorio en concentraciones altas a través de fermentadores artesanales (Canjura, 2000), comparado por la reproducción en otros medios líquidos, sólidos y semi sólidos los cuales no lograron incrementar los niveles de conidias (Leguizamón *et al.*, 1989; Monzón, 1992; Rivas *et al.*, 1996).

En El Salvador, no se han documentado estudios sobre control biológico de la roya del cafeto, por lo que sería de mucho valor aprovechar al máximo aquellos organismos que se presentan de forma natural colaborando a la situación que enfrenta la caficultura salvadoreña.

Por lo tanto, esta investigación se realizó con el propósito de reproducir en forma masiva cepas de **Verticillium sp.** en fermentadores artesanales con sustrato a base de melaza y Bayfolán forte y evaluar cuál mezcla de los ingredientes permite obtener la mayor concentración de conidias/mililitro al final de la evaluación.

II. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 ORÍGEN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL “CAFÉ” (*Coffea arabica*)

El género ***Coffea*** pertenece al Orden Rubiales y a la Familia Rubiaceae, que incluye más de 500 géneros y cerca de 8 000 especies. El género ***Coffea*** fue propuesto por Linné en 1735, quien más tarde en 1753 describió la especie (Albarrán, 1999).

Entre las especies económicamente más importantes de la familia Rubiaceae se encuentran ***Coffea canephora***, ***C. liberica*** y ***C. arabica***, siendo ésta última la más importante (Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 1988).

Los árboles de café silvestres son componentes naturales de los bosques tropicales de África. En el sur de Etiopía, Sudán y Norte de Kenia, coincide la observación de que son el centro de diversidad de ***C. arabica*** y se considera a Yemen como el centro secundario de origen; en esta región existe un número de variantes, que fueron consideradas para dar lugar a las subespecies (Albarrán, 1999).

A finales del siglo VI la especie ***C. arabica*** pasó a Yemen, al sur de la península arábiga, donde seis centurias después comenzó a usarse como bebida, luego de tostado y molido. El cultivo se comercializó en el siglo XV. Posteriormente, el café fue llevado a la India y Java. En 1714 los holandeses lo trasladaron a Surinam, de este lugar pasó a Cayena, Brasil, Colombia y Venezuela (Ospina-Machado, 1995).

En 1720 los franceses, de las mismas plantas de Java, transportaron semillas a Martinica, de donde llegó a Guadalupe, Las Antillas y América Central; en el siglo XVIII, el cultivo de café se propagó en América Tropical y parte de la Subtropical en donde comenzó a ser un renglón comercial importante desde principios del siglo XIX (Ospina-Machado, 1995).

2.2 CULTIVO DEL CAFETO

El 80% de la producción mundial, corresponde a la especie ***C. arabica*** la cual se cultiva en Centroamérica, Colombia, Brasil, India, y en África (Fondo Nacional de Investigaciones agropecuarias, 1988).

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

En América Latina, el cultivo del café se inició en la primera mitad del siglo dieciocho y poco tiempo después tomó importancia en los países situados entre el Trópico de Cáncer y el de Capricornio (Jiménez, 1997).

En la actualidad, el café sigue siendo uno de los principales productos de exportación en América Central, lo cual la convierte en la tercera región cafetalera en el mundo (Bertrand y Rapidel, 1999).

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

Por lo tanto, es necesario realizar más investigaciones América Central, para incrementar la eficiencia y sostenibilidad del sistema de cultivo dentro de la finca y en el contexto internacional (Bertrand y Rapidel, 1999).

2.2.1 Cultivo del Cafeto en El Salvador

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

El sector ha sido golpeado por la crisis de los años ochenta, la caída de los precios internacionales y por fenómenos naturales, principalmente, El Niño en 1997 y los terremotos de Enero y Febrero de 2001 (Flores *et al.*, 2002).

Sin embargo, a pesar de la crisis en la que se encuentra inmersa la caficultura; para el nuevo milenio sigue teniendo importancia estratégica como generadora de empleos rurales en El Salvador. En la cosecha 1999/2000, se contrataron 39.6 millones de jornales los cuales equivalen a 158 400 empleos permanentes sólo en el sector agrícola. Desde el punto de vista ambiental, contribuye a la protección de los ecosistemas, ya que la mayor parte de la poca cobertura vegetal del país se debe al sistema de cultivo bajo sombra del café, participa con 2.5% del PIB y aporta casi 20% al PIB agrícola. Por lo cual, cualquier factor o agente que ponga en peligro a la caficultura, reviste gran importancia para el país (Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café, 2001; Flores *et al.*, 2002).

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

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

2.3 LA ROYA DEL CAFETO (*Hemileia vastatrix* BERK. & BR.)

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

Hemileia vastatrix, se detectó por primera vez a principios de 1869 en una plantación de la isla asiática de Ceilán, hoy Sri Lanka. A partir de Ceilán, se fue dispersando rápidamente a toda Asia y al mismo tiempo fue reportada en países de África oriental y más tarde llegó a África occidental (Avelino *et al.*, 1999; citado por Canjura, 2000). Apareció por primera vez en América en 1970, donde se sugiere que las uredosporas fueron transportadas por los vientos Alisios desde África del Este hasta Brasil (Ruiz, 1994). En Centro América, se reportó por primera vez en Nicaragua, en la región de Carazo en 1976. Luego se detectó en 1979 en la zona oriental de El Salvador y a finales de 1980 la enfermedad se había diseminado a las regiones central y occidental de El Salvador (Javed, 1987).

Los síntomas empiezan como manchas redondas muy pequeñas, color amarillo claro, en el envés de la hoja. Luego las manchas crecen rápidamente hasta alcanzar un centímetro de diámetro y se cubren de un polvo amarillo o anaranjado, formado por las esporas del hongo; en el haz, la posición de cada pústula se manifiesta como mancha clorótica de igual tamaño, que pueden llegar a unirse y provocar ataques severos (López, 1994) (Ver Figura 1).



Figura 1. Hoja con pústula de roya de café (Tomada por German Mejía, PROCAFE, 2004)

Las esporas de la roya del cafeto son más o menos reniformes y fuertemente abultadas en la parte convexa. Son suaves en la parte cóncava. La germinación de las uredosporas (esporas), se forman en uno o más tubos germinativos. Estos son incapaces de penetrar directamente a través de la epidermis de la hoja, crecen y se ramifican en la superficie de las hojas hasta que encuentran un estoma. Inmediatamente después, el patógeno forma un apresorio del cual la hifa penetra dentro de la cámara subestomática. El agente causal *Hemileia vastatrix* coloniza intercelularmente el tejido esponjoso de la hoja. Un tejido fungoso compacto se desarrolla debajo del estoma. Este tejido fungoso da crecimiento a una esterigma (pequeña hifa recta), en la cual las esporas nacen y, eventualmente, en la superficie se incrusta una masa de esporas formando una pústula característica del color anaranjado brillante (Javed, 1987).

El ciclo de vida de *H. vastatrix*, comienza con la disseminación de las uredosporas, ésta a su vez se desarrolla en tres fases: liberación, dispersión y depositación. La siguiente etapa viene dada por la germinación, la cual determina el grado de infección de la enfermedad (Javed, 1987).

Cuando las uredosporas germinan producen un tubo germinal, el cual, cuando entra en contacto con los estomas de las hojas forma un apresorio que penetra en ellos y entonces es cuando comienza la tercera etapa, seguida de la colonización de la hoja por las hifas (primer signo visual). La siguiente etapa es la esporulación, período en el cual emerge el esporóforo para producir nuevas uredosporas infecciosas (Javed, 1987).

La etapa más importante en el ciclo de vida de la roya es el tiempo que transcurre entre la germinación y la esporulación la cual se denomina "período de latencia", pues mientras más corto sea este período, mayor posibilidad habrá de que se repita el ciclo, a causa de ello la epidemia será más severa (Velasco, 1979; Avelino *et al.*, 1999; citado por Canjura, 2000).

Con la presencia de agua, las esporas de Roya son capaces de germinar en cinco horas; la temperatura óptima para la germinación de uredosporas es entre los 18°C y 25°C (Javed, 1987), con temperaturas superiores a 28°C e inferiores a 15°C la germinación disminuye. Con humedades relativas entre 95% y 98% se presenta menor germinación de uredosporas (Cadena, 1982). Así mismo, la germinación y el crecimiento del tubo germinativo disminuye cuando hay mayor exposición a la luz solar (CENICAFE, 1988). Las uredosporas viejas presentan niveles más bajos de germinación que las jóvenes (Cadena, 1982). La diseminación de las uredosporas corresponde al viento y otros factores como organismos de la clase insecta (López, 1994).

El inóculo residual, la densidad del follaje y de frutos, y la distribución de la lluvia son factores que determinan la tasa de crecimiento de la epidemia y su severidad (Javed, 1987).

2.3.1 Control de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br)

El control de la roya del café, ha sido principalmente dirigido al uso de fungicidas, el cual ha sido exitoso cuando se ha hecho en forma adecuada, aunque aumenta los costos de producción (Bertrand y Rapidel, 1999). En El Salvador se han empleado satisfactoriamente fungicidas a base de cobre (protectivos), fungicidas sistémicos (terapéuticos) y mezclas de fungicidas cúpricos y sistémicos, pero su alto costo los ha hecho difíciles de acceder por la mayoría de los productores (Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café, 1997; Avelino *et al.*, 1999; citado por Canjura, 2000).

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

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

El cultivo del café actualmente se encuentra inmerso en una crisis muy profunda; desde el apareamiento de la roya del cafeto su control se ha realizado por medio de compuestos químicos, pero debido a dicha crisis, el presupuesto de las fincas para prevenir plagas y enfermedades se ha visto reducido, por lo que incurrir en grandes gastos agobia a los caficultores.

Flores *et al* (2002), propone a muchos pequeños caficultores organizados, enfrentar un mercado deprimido mediante el cultivo orgánico y una de sus variantes, el ecológico; ya que obtiene en promedio precios sensiblemente superiores al mismo tipo de café cultivado de manera tradicional con uso intensivo de agroquímicos.

Por lo anteriormente expuesto, a El Salvador le conviene cambiar las prácticas de cultivo tradicional a las prácticas de cultivos orgánicos que resultan más rentables, de bajo costo y amigables con el ambiente; es necesario invertir en investigaciones sobre control biológico y prácticas orgánicas.

2.3.2 Resistencia genética

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

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).

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

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

Para las investigaciones en mejoramiento genético el Instituto Salvadoreño de Investigaciones del Café, ISIC, usó material procedente del Centro de Investigaciones sobre la Roya en Oeiras, Portugal, en visitas que técnicos del ISIC realizaron a dicho Centro (Echeverri, 1980).

Las evaluaciones de este material introducido demostraron que el híbrido de Timor, el cuál tiene resistencia frente a todas las razas de la roya, mostró una adaptación negativa a las condiciones de El Salvador, mientras ya su cruzamiento con Caturra, el Catimor ha presentado una buena adaptación principalmente en alturas mayores a 1 000 msnm. Sin embargo, esta variedad hasta 1978 se encontraba a nivel experimental (Beker, 1978; Echeverri, 1980).

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

2.3.3 Control Biológico

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

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

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

2.4 *Verticillium lecanii* (Zimn.) Viegas

Verticillium lecanii es un hongo que a través del tiempo, se le ha conocido con los nombres de *Cephalosporium lecanii* Zimmermann (1898), *Oospora necans* Saccardo & Trotter (1906), *Cephalosporium coccorum* Petch (1925), *Cephalosporium longisporum* Petch (1925), *Cephalosporium aphidicola* Petch (1931), *Cephalosporium dipterigenum* Petch (1931), *Cephalosporium muscarium* Petch (1931), *Cephalosporium thripidum* Petch (1931), *Cephalosporium nodulosum* Petch (1939), *Verticillium hemileiae* Bouriquet (1939), *Cephalosporium lanoso-niveum* van Beyma (1942), *Cephalosporium subclavatum* Petch (1942) (Commonwealth Mycological Institute, 1979; citado por Canjura, 2000).

Actualmente se conoce como *V. lecanii* (Zimn.) Viegas, es un hongo imperfecto que pertenece al orden de los Moniliales que poseen conidias libres, ovoides, hialinas y unicelulares (Bigre *et al.*, 1990 citado por Canjura, 2000). Las conidias se forman independientemente, en pares o en grupos de tres o cuatro en conidióforos pobremente desarrollados (ver Figura 2). Las conidias varían mucho en tamaño, dependiendo de la raza y la edad del cultivo. En cultivos sumergidos se forman blastosporas. (Commonwealth Mycological Institute, 1979; citado por Canjura, 2000).



Figura 2. Conidióforos de *Verticillium lecanii* vistos al microscopio compuesto (Foto tomada del Commonwealth Mycological Institute (1979), citado por Canjura (2000)).

Verticillium lecanii, crece bien en medio de cultivo a base de agar Malta, harina de avena o papa dextrosa agar en los cuales se desarrolla un micelio delgado blanco o crema, con menos color o de color amarillo en el inverso del cultivo. Las hifas son de una a dos micras de ancho (Commonwealth Mycological Institute, 1979; citado por Canjura, 2000).

La germinación de esporas así como el crecimiento de los aislamientos requiere de temperaturas de 20°C a 25°C, declina poco a poco a temperaturas mayores de 25°C, y se detiene a temperaturas mayores de 30°C; la esporulación cesa a los 30°C, (Hall, 1981; citado por Canjura, 2000).

El hongo *V. lecanii* se ha encontrado en áreas tropicales y subtropicales, parasitando insectos, royas y otros hongos superiores; es un habitante común del suelo, donde sobrevive saprofiticamente en restos de plantas y otros tipos de materia en descomposición (Rivas *et al.*, 1996). No obstante, ha sido informado principalmente como un hongo entomopatógeno muy importante para controlar plagas fundamentales de cultivos, tales como áfidos y escamas y se han observado epizootias en las regiones tropicales y subtropicales (Monzón, 1992), así como en las moscas blancas *Trialeurodes vaporariorum* Westwood y *Bemisia tabaci* Gennadius (Romero y Carrión, 1995). En Nueva Guinea se ha encontrado en escamas (coccidos) del café y en una palomilla (Lepidóptera) (Shaw; 1988; citado por Canjura, 2000).

Verticillium lecanii, se ha registrado en varios países como hiperparásito de royas en diferentes cultivos. En café se ha encontrado hiperparasitando en forma natural, pústulas esporuladas de roya, en donde se observa un crecimiento blanco del hiperparásito sobre las uredosporas que avanza hacia los bordes y deja en el centro solo tejido necrótico (Vélez-Arango, 1991). Sin embargo, el porcentaje de parasitismo natural ha sido bajo para ejercer un buen control (Gonzalez y Martínez, 1996; Shaw, 1988; citado por Canjura, 2000).

2.4.1 Modo de acción de *Verticillium Lecanii*

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



Figura 3. Hojas de café con pústulas de roya hiperparasitadas por *Verticillium sp.*; se observan las pústulas cubiertas por micelio blanco típico de *Verticillium sp.* (Foto tomada por German Mejía, PROCAFE, 2004).

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

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

Vélez-Arango (1991), observó que al asperjar extracto metabólico de *V. lecanii* sobre uredosporas de *H. vastatrix*, éstas presentaron cambios morfológicos tales como la desintegración, pérdida del contenido, anomalías en las paredes como pérdida de las estructuras equinuladas, pérdida de la

turgencia y cambios relacionados con tinción al ser coloreadas con azul de lactofenol. Además, observó que al asperjar las hojas de café con cultivo licuado del hiperparásito, se formó micelio alrededor de las uredosporas en el punto de entrada del estoma.

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

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

Canjura (2000), constató también la capacidad de *V. lecanii* de hiperparasitar pústulas de roya, al asperjar directamente sobre inóculos naturales de roya, conidias del hongo hiperparásito reproducidas a través de fermentadores artesanales.

2.4.2 Reproducción *In vitro*

Varios trabajos se han realizado con el propósito de obtener en el laboratorio concentraciones altas de estructuras infectivas de *Verticillium sp.* en forma rápida y a bajo costo.

En 1978, Da Silva y Ferraz citado por Canjura (2000), determinaron que la temperatura óptima de crecimiento y esporulación es alrededor de 20°C y 30°C tanto en medio líquido como en medio sólido. Estos autores cultivaron *V.*

lecanii en medio sólido papa dextrosa agar donde se observó abundante crecimiento vegetativo, con una esporulación mínima, sin embargo cuando adicionaron al medio un 2% del peso de uredosporas de ***H. vastatrix***, se observó una abundante producción de conidias.

En otros trabajos como los elaborados por Carrión (1988), se inoculó el hongo en medio de papa dextrosa agar a temperatura de 25°C, luego se inoculó en 300 g de semillas de trigo, las cuáles se colocaron al medio ambiente en frascos; en estas condiciones la cepa demoró aproximadamente 15 días en colonizar completamente el trigo. Eskes *et al.* (1991), citado por Canjura (2000), obtuvieron concentraciones de 10^6 y 10^7 conidias/mililitro en medio papa dextrosa agar. Leguizamón *et al.* (1989), obtuvieron un buen crecimiento de ***V. lecanii*** en caldo papa dextrosa, el inóculo inicial fue obtenido de medio de cultivo papa dextrosa agar, el caldo se mantuvo en alternancia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a 22°C.

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

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

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

En trabajos más recientes, Canjura (2000), reprodujo el hiperparásito en papa dextrosa agar acidificado durante quince días; luego lo inoculó en fermentadores artesanales con medio a base de melaza (120g/L, 80g/L, 40g/L y 8g/L) y levadura (5g/L) en un litro de agua destilada; en este medio alcanzó una concentración de hasta 10^9 conidias/ml, luego de dos semanas.

2.5 REPRODUCCIÓN DE HONGOS EN FERMENTADORES ARTESANALES

El uso de fermentadores es un método simple y de bajo costo que ha sido utilizado para el cultivo de bacterias y hongos entre ellos especies de *Trichoderma*, para aplicación en cultivo de cacao, y de *Verticillium*, en el cultivo del café, como alternativa de control biológico para producir agentes de biocontrol (Canjura, 2000).

El fermentador se compone de un recipiente de vidrio o plástico que se llena con agua destilada, melaza y levadura, debe tener un tubo largo que llegue hasta el fondo del recipiente y poseer en el extremo externo del tubo un filtro de 0.2 μm para hacer pasar aire estéril por medio de un burbujeador conectado al mismo. Un segundo tubo debe ser insertado para liberar aire que se produce dentro del recipiente con los sustratos y posee también un filtro de 0.2 μm en el extremo externo, para evitar la contaminación con bacterias (Hebbar & Lumsden, 1999; Canjura, 2000) (Ver Figura 4).

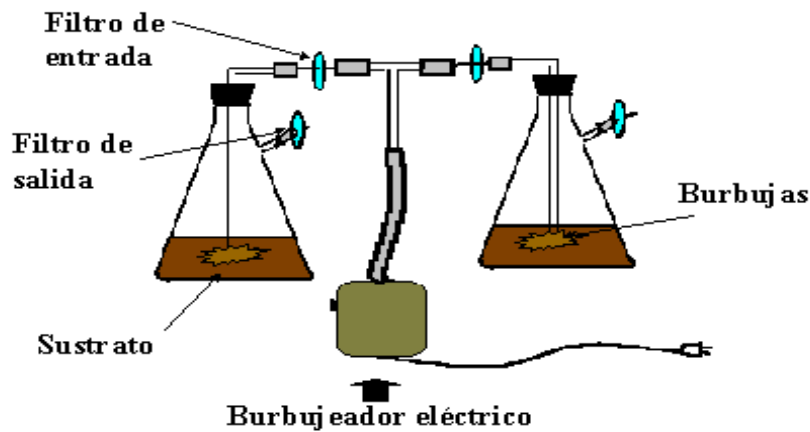


Figura 4. Fermentador artesanal para reproducción masiva de *Verticillium sp.* (Canjura, 2000).

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

En investigaciones más recientes, Canjura (2000), asperjó la mezcla obtenida de los fermentadores directamente sobre pústulas de roya.

2.6 FORMULACIÓN DE AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO

La formulación de microorganismos es un proceso que mezcla uno o varios ingredientes con el microorganismo, para dar como resultado un preparado cuyo objetivo es el de brindar una forma económica y de fácil utilidad de un principio activo, con viabilidad prolongada, que contribuya a incrementar su efectividad. También permite realizar la aplicación del producto de una manera más fácil, aumentando la persistencia, humectabilidad y adhesividad a la planta o al insecto (Carballo, 1998; citado por Canjura, 2000).

Sin embargo este proceso solo se justifica si se cuenta con un mercado potencial y el producto final presenta facilidad de preparación y aplicación, estabilidad durante el transporte y almacenaje, viabilidad abundante de propágulos, buena tabla de vida, y un costo aceptable. La tecnología de formulación no es fácil, por lo que ha enfrentado una serie de problemas importantes y complejos relacionados con el crecimiento de los agentes de control biológico de plagas (Lewis y Papavizas, 1991 citado por Canjura, 2000).

Stirling *et al.* (1998); citado por Canjura, (2000), realizaron una investigación para desarrollar una formulación granulada de ***Verticillium chlamyosporium*** Goddard, un parásito de huevos del nemátodo nodulador de la raíz ***Meloidogyne javanica***. La formulación contenía una cantidad mínima de sustratos orgánicos (kaolina y goma arábica) requeridos para establecer el hongo en el suelo y pudo ser almacenada por 12 meses a una temperatura de 25°C. La formulación granular de ***V. chlamyosporium*** fue incorporada al suelo en un cultivo de tomate, en donde se observó un incremento de la densidad poblacional del hongo después de 7-14 semanas de la aplicación, y un parasitismo entre 37 y 82% de la primera generación de huevos producida por el nemátodo.

En una investigación realizada por Verhaar *et al.* (1999), citado por Canjura, (2000), se estudió la eficacia de ***V. lecanii*** en adición de formulaciones en aceite para el biocontrol del “Mildiú polvoriento del melón”, ***Sphaerotheca fuliginea***. Los autores probaron tres formulaciones de esporas de ***V. lecanii*** en aceite; una en aceite de maní y dos emulsiones invertidas con aceite de parafina. El mejor desarrollo de esporas de ***V. lecanii*** fue observado en la formulación en aceite de maní, mostrando un mejor control del mildiú. Además, dicha formulación redujo significativamente la dependencia a la humedad relativa de ***V. lecanii***, uno de los principales problemas con los que se ha enfrentado a nivel de campo.

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL:

- Reproducir en forma masiva tres cepas de ***Verticillium sp.*** a tres concentraciones diferentes de melaza, en fermentadores artesanales.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Encontrar la mejor concentración de melaza (8g, 4g y 0.5g de melaza) para el sustrato de los fermentadores con la cuál se obtengan la mayor concentración de conidias/mililitro de ***Verticillium sp.***
- Determinar el tiempo en que las cepas de ***Verticillium sp.*** alcanzan su mayor producción de conidias.
- Contribuir a la ciencia y al conocimiento del control biológico de la roya del café.

IV. METODOLOGÍA

4.1 LOCALIZACIÓN

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales propiedad de la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFÉ), ubicada en Nueva San Salvador, departamento de La Libertad, a 13°14' latitud norte y 89° 17' longitud oeste, a una altura de 955 msnm y una temperatura de 26.5 °C (Cáceres, 1995).

4.2 AISLAMIENTO DE *Verticillium* sp.

Se visitaron tres fincas de sitios representativos de la caficultura salvadoreña con el fin de obtener el inóculo de *Verticillium* sp. en campo. Las tres zonas seleccionadas fueron: Chalchuapa, Santa Ana; Ataco, Ahuachapán y Santiago de María, Usulután. Las características de las zonas se pueden observar en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Ubicación geográfica y características climáticas de tres zonas cafetaleras de El Salvador/2004.

ZONAS CAFETALERAS	DISTANCIA DE PROCAFE (Km)	T °C	LATITUD NORTE	LONGITUD OESTE	ALTITUD (msnm)	TIPO DE CULTIVO
Chalchuapa, Sta. Ana	103	25.5	13° 58.9'	89° 32.9'	1100	Tradicional*
Ataco, Ahuachapán	73	24.5	13° 56.6'	89° 51.6'	1200	Tradicional*
Santiago de María, Usulután	155	25	13°29.1'	88°28.3'	1150	Tradicional*

*Bajo sombra

En las tres fincas seleccionadas, se tomaron muestras de hojas con pústulas de roya donde se observó el crecimiento blanco típico de *Verticillium sp.*, luego, fueron trasladadas al laboratorio de PROCAFE, donde se tomó una porción del micelio blanco observado sobre las pústulas de roya y se cultivaron en 27 Cajas de Petri (9 por cada cepa escogida) con medio papa dextrosa agar acidificado (PDAA).

En dichas Cajas de Petri creció un micelio blanco, característico de *Verticillium sp.* (Commonwealth Mycological Institute, 1979; citado por Canjura, 2000) durante un período de quince días.

4.3 PRODUCCIÓN DE CONIDIAS DE *Verticillium sp.* EN EL FERMENTADOR.

El sustrato utilizado para la producción de conidias de *Verticillium sp.*, en el fermentador, estuvo constituido por 1.0 L de agua destilada, tres concentraciones de melaza: 8.0 g, 4.0 g y 0.5 g, 20 gotas de ácido láctico con el fin de disminuir la contaminación por bacterias (Canjura; Krauss, com. Pers.), y 1.12 mililitros de Bayfolan forte, como fuente de Nitrógeno (Martijn Hoopen, com. Pers.).

4.3.1 Preparación del sustrato

Se colocaron 27 fermentadores con el sustrato antes descrito (sin adicionar las 20 gotas por litro de ácido láctico) a un autoclave durante 20 minutos a 121 °C y a 125 libras de presión.

Luego dentro de una cámara de flujo laminar, se dejaron enfriar los fermentadores con los sustratos y se agregó el ácido láctico.

4.3.2 Inoculación de *Verticillium* sp. en los fermentadores

Se preparó una solución de 0.5 ml de Tween 80 (detergente) por litro de agua destilada, luego se llevó a un autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 20 minutos. Seguidamente dentro de una cámara de flujo laminar se adicionó 20 mililitros de la solución obtenida anteriormente a cada una de las 27 cajas de petri con el hongo crecido durante 15 días, y se realizó un raspado del micelio.

La suspensión obtenida de los raspados por cepa se colocó en un Beaker de 500 mililitro. Seguidamente se tomó 1 mililitro de cada suspensión y se colocó en un Hematómetro para ser observada en un microscopio compuesto y así obtener la concentración de conidias/mililitro, la cual se realizó con ayuda de un contómetro manual. La concentración obtenida del raspado fue: para Santiago de María 2.3×10^7 conidias /mililitro, Chalchuapa 1.9×10^7 conidias /mililitro y para Ataco 2.7×10^7 conidias /mililitro; luego se inoculó 20 mililitros de raspado a cada fermentador de tal manera que la concentración inicial dentro de los sistemas fue: para los de Santiago de María de 1.0×10^6 conidias /mililitro, para los de Chalchuapa de 1.2×10^6 conidias /mililitro y para los de Ataco 1.2×10^6 conidias/mililitro.

Una vez inoculado el sustrato, se colocó una manguera autoclavable que conectó el tubo de entrada de aire con un burbujeador eléctrico para pecera (ver Figura 4), con el fin de suministrar oxígeno al hongo dentro del fermentador. Este sistema se mantuvo en evaluación durante 15 días.

4.4 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CONIDIAS EN EL FERMENTADOR CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MELAZA

Se realizaron evaluaciones cada dos días durante un período de quince días, para lo cual se tomó un mililitro de sustrato de cada fermentador (27 en total), y se observó a través de un microscopio compuesto (como se explicó en 4.3.2) para calcular la concentración de conidias/mililitro alcanzadas en el fermentador.

4.5 TRATAMIENTOS

Se realizaron 9 combinaciones, que resultaron del producto de tres cepas y tres concentraciones de melaza; las concentraciones utilizadas fueron las siguientes:

A. Tres cepas de *Verticillium sp.*

Cepa 1: Proveniente de Santiago de María

Cepa 2: Proveniente de Chalchuapa

Cepa 3: Proveniente de Ataco

B. Tres concentraciones de melaza:

Concentración 1: 8.0 g/L de agua destilada (100%)

Concentración 2: 4.0 g/L de agua destilada (50%)

Concentración 3: 0.5 g/L de agua destilada (6.25%)

Se escogió la concentración uno como el 100% de esta investigación debido a que un estudio realizado por Canjura (2000), se observó que la concentración de melaza de 8.0 g/L fue la mejor para reproducir *Verticillium sp.* ya que concentraciones más altas no incrementaron la concentración de conidias en dicho estudio. Por lo tanto, en la actual investigación se propuso que al disminuir la concentración de melaza recomendada por Canjura (2000) en un 50% y 6.25% la concentración de conidias aumentará en el fermentador.

4.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento tuvo un Diseño Completamente al Azar con tratamientos de arreglo factorial (3 x 3), dando como resultado 9 combinaciones con tres repeticiones.

4.7 MODELO ESTADÍSTICO

El modelo estadístico Fue:

$$Y_{(ij)} = \mu + A_{(i)} + B_{(j)} + AB_{(ij)} + E_{(ij)}$$

donde:

- $Y_{(ij)}$ = Variable aleatoria de respuesta
- μ = Media general
- $A_{(i)}$ = Efecto de la i-ésima cepa de *Verticillium sp.*
- $B_{(j)}$ = Efecto del j-ésimo nivel de melaza
- $AB_{(ij)}$ = Efecto de la interacción entre $A_{(i)}$ y $B_{(j)}$
- $E_{(ij)}$ = Error

4.8 VARIABLE DE RESPUESTA

Concentración de conidias/mililitro de *Verticillium sp.*

4.9 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Con los datos obtenidos se construyeron 27 curvas de crecimiento biológico (una por cada tratamiento y sus tres repeticiones) con tendencia sigmoideal del tipo Gompertz, de cuatro parámetros, mediante el programa Sigma Plot 8.02. La ecuación de la curva de crecimiento fue la siguiente (Canjura, 2000):

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

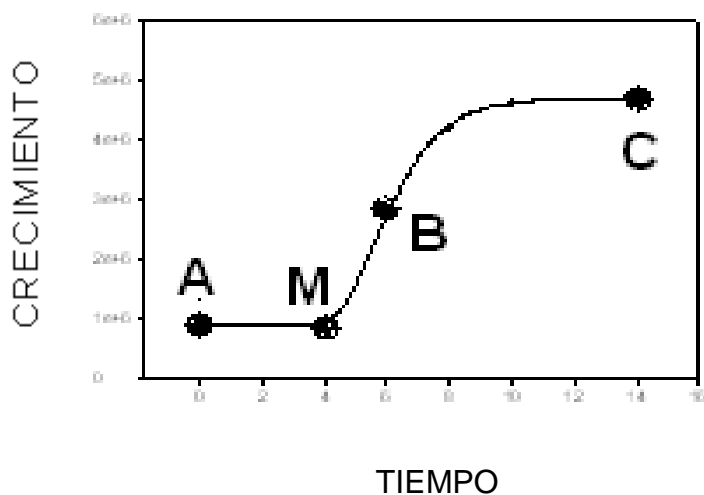


Figura 5. Curva de crecimiento biológico con tendencia sigmoide del tipo Gompertz, de cuatro parámetros.

Donde:

Y = Concentración de conidias/ml.

A = Nivel inicial de conidias/ml.

C = Nivel final de conidias/ml.

X = Tiempo (días).

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

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

Los parámetros evaluados fueron: Nivel final de conidias (C), tiempo (días) del punto de inflexión (M) y la pendiente en el punto de inflexión (B). el nivel inicial de conidias se determinó como cero (A = 0).

Los parámetros se analizaron mediante Análisis de Varianza para estimar si hubo diferencias significativas. Luego se realizó la prueba de Tukey para separar las diferencias de medias de los parámetros de las curvas, mediante el programa The SAS System 6.12.

V. RESULTADOS

5.1 REPRODUCCIÓN MASIVA DE TRES CEPAS DE *VERTICILLIUM* SP. EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MELAZA EN EL FERMENTADOR

Las curvas de concentración de conidias obtenidas en los 27 fermentadores (interacción de tres cepas, con sus tres concentraciones de melaza y sus tres repeticiones) se presentan en la Figura 6.

Se pudo observar en todas la curvas una tendencia sigmoideal del tipo Gompertz de cuatro parámetros característico de curvas de crecimiento de biológico (Canjura Coms. Pers. 2003), a excepción de las cepas provenientes de Santiago de María y Chalchuapa cuando crecieron en medio de cultivo con la concentración más baja de melaza (0.5g/L). Para estos dos casos específicos, también fue notorio el mayor margen de error de los puntos que constituyen las curvas.

Concentración de conidias/mililitro

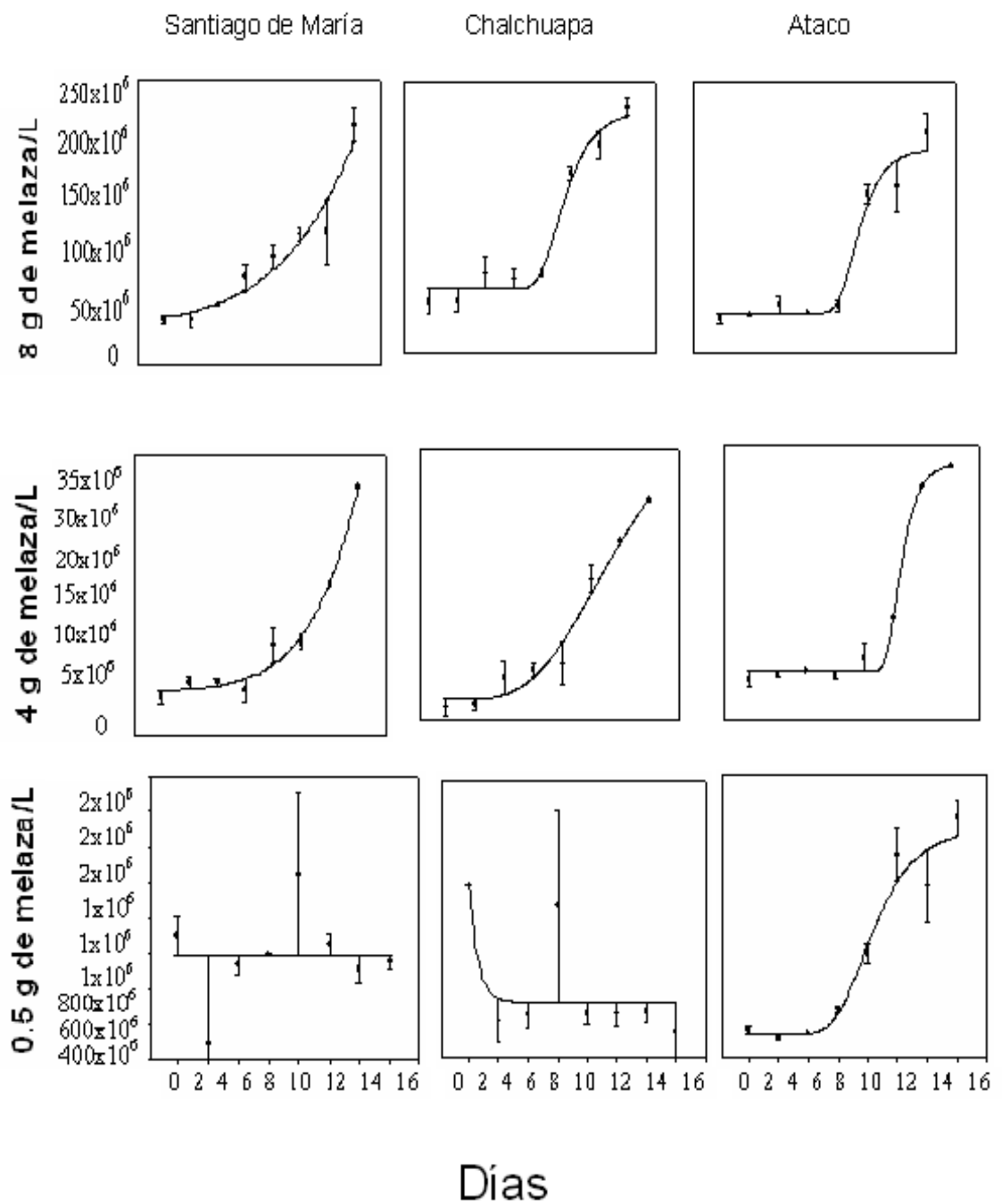


Figura 6. Concentración de conidias/mililitro de tres cepas de *Verticillium sp.* (Santiago de María, Chalchuapa, Ataco) obtenidas en fermentadores artesanales a tres concentraciones diferentes de melaza (8.0 g/L, 4.0 g/L y 0.5 g/L), durante un período de 15 días.

5.2. PARÁMETROS DE LA CURVA GOMPERTZ

5.2.1 Nivel inicial de conidias

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

5.2.2 Nivel final de conidias

La prueba de normalidad en el análisis de varianza del nivel final de conidias, parámetro C, indicó una homogeneidad intermedia (W : Normal 0.542). Debido a que los datos de la prueba de normalidad presentaron cantidades altas se decidió realizar la transformación logarítmica para normalizar la curva. El análisis de varianza con los datos transformados ($\log Y$) (W : Normal 0.905) indicó que no existen diferencias significativas (a un nivel de significancia de $P < 0.05$) entre las cepas evaluadas ($P = 0.6285$), entre las dosis de melaza ($P = 0.2341$) y en la interacción cepa-concentración de melaza ($P = 0.1578$) (Anexo 1).

5.2.3 Tiempo en días del punto de inflexión

El análisis de varianza del tiempo (días) del punto de inflexión (Anexo 2), indicó que existen diferencias significativas (a un nivel de significancia de $P < 0.05$) entre las cepas estudiadas ($P = 0.0166$) y en la interacción de cepa-concentración de melaza ($P = 0.0465$). Las diferentes concentraciones de melaza no presentaron diferencias significativas ($P = 0.0608$). La separación de medias del tiempo (días) del punto de inflexión mediante la prueba de Tukey (Cuadro 2); demostró que la cepa proveniente de la cepa Santiago de María demoró mucho más tiempo (26.84 días) en alcanzar el punto de inflexión, comparada con la cepa de Chalchuapa y ataco las cuales demoraron 2.11 y 14.04 días en alcanzar dicho punto, respectivamente. Básicamente fueron las cepas provenientes de Santiago de María y Chalchuapa las que difirieron entre sí.

Cuadro 2. Separación de medias del tiempo (días) del punto de inflexión mediante la prueba de Tukey para tres cepas de *Verticillium sp.*

CEPA	Media	N
Santiago de María	26.838 a	9
Ataco	14.037 ab	9
Chalchuapa	2.107 b	9

N = número de observaciones.

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

En cuanto a la interacción entre cepa-concentración de melaza; es evidente que la diferencia significativa se deba a problemas en el conteo de la concentración de conidias y, principalmente, a la falta de nutrientes en el fermentador en la concentración 0.5g/L de melaza para las cepas provenientes de Chalchuapa y Santiago de María.

5.2.4 Medida de la pendiente en el punto de inflexión

El análisis de varianza de la pendiente del punto de inflexión (Anexo 3), demostró que existen diferencias significativas (a un nivel de significancia $P < 0.05$) entre las cepas evaluadas ($P = 0.0210$). En este sentido la separación de medias de la medida de la pendiente en el punto de inflexión mediante la prueba de Tukey (Cuadro 3), demostró que la cepa Ataco (4.289) es la que difirió de la cepa Chalchuapa (0.154) y Santiago de María (-0.244); estas dos últimas se comportaron de manera similar.

Cuadro 3. Separación de medias de la medida de la pendiente en el punto de inflexión mediante la prueba de Tukey para tres cepas de *Verticillium* sp.

CEPA	Media	N
Ataco	4.289 a	9
Chalchuapa	0.154 b	9
Santiago de María	-0.244 b	9

N = número de observaciones.

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

No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de melaza ($P = 0.4096$) ni entre la interacción cepa-concentración de melaza ($P = 0.7898$).

VI. DISCUSIÓN

Como se puede observar en las Figura 6, las curvas de la concentración de conidias/ml para el caso de la cepa Ataco para las tres concentraciones (8.0 g/L, 4.0 g/L y 0.5 g/L de melaza); presentaron una tendencia Sigmoidal del tipo Gompertz de cuatro parámetros característico de curvas de crecimiento biológico (Canjura, Coms. Pers. 2003). Para el caso de las cepas Santiago de María y Chalchuapa solamente en la concentración 0.5 g/L de melaza (menor concentración de melaza) no reflejaron el crecimiento típico de las curvas Gompertz; debido a problemas en el conteo de concentración de conidias y a la escasez de nutrientes dentro del fermentador.

6.1 PARÁMETROS DE LAS CURVAS GOMPERTZ

6.1.1 Nivel final de conidias

El análisis de varianza del nivel final de conidias con los datos transformados (Log Y) (W: Normal 0.905) indicaron que no existen diferencias significativas (a un nivel de significancia de $P < 0.05$) entre las cepas evaluadas ($P = 0.6285$), ni entre las dosis de melaza ($P = 0.2341$) ni en la interacción cepa-concentración de melaza ($P = 0.1578$) (Anexo 1).

El factor cepa es en el cual se esperaba diferencias significativas dado que son organismos diferentes; pero, al final del período de evaluación las cepas en estudio presentaron una concentración de conidias/mililitro homogénea y esta homogeneidad pudo deberse a que las tres cepas poseen características genéticas similares, por lo que el efecto de la melaza no influyó grandemente en ellas; Diferente a lo reportado por Canjura, 2000, que sí encontró diferencias significativas en su investigación.

Se encontraron concentraciones entre 1.18×10^{10} conidias/mililitro (cepa Ataco) y 7.45×10^{10} conidias/mililitro (cepa Chalchuapa), y este fenómeno se dio independientemente de las diferentes dosis de melaza. Estas concentraciones son mayores a las reportadas por Canjura (2000), en su estudio (5.45×10^9 conidias/mililitro), se presume que el incremento de la concentración se deba al uso del Bayfolan forte en el sustrato lo que resulta más efectivo que la levadura utilizada por Canjura, (2000).

6.1.2 Tiempo en días del punto de inflexión

El análisis de varianza del tiempo (días) del punto de inflexión indicó que existen diferencias significativas entre las cepas estudiadas y en la interacción entre cepa-concentración (Ver 5.2.3). Es decir que las cepas provenientes de Santiago de María y Ataco demoraron más tiempo para llegar al punto de inflexión en el experimento (26.84 días y 14.04 días respectivamente), mientras que la cepa proveniente de Chalchuapa lo alcanzó en un tiempo más corto (2.11 días) y esta rapidez o lentitud se debió al efecto combinado de las cepas con la melaza. La demora en las cepas Santiago de María y Ataco puede ser compensada con el alto nivel de conidias/mililitro obtenidas en el fermentador, pero implicaría una mayor inversión de tiempo y dinero para lograrlo.

En cuanto a la interacción entre cepa-concentración de melaza para el tiempo (días) del punto de inflexión; es evidente que la diferencia significativa se deba a problemas en el conteo de la concentración de conidias y a la falta de nutrientes en el fermentador. Por tal razón como se muestra en la Figura 6 el comportamiento de la concentración de conidias/mililitros cuando hay 0.5 g/L de melaza en el sustrato para las cepas Chalchuapa y Santiago de María no es propio de una curva del tipo Gompertz.

6.1.3 Medida de la pendiente en el punto de inflexión.

El análisis de varianza de la medida de la pendiente en el punto de inflexión demostró que existen diferencias significativas entre las cepas estudiadas ($P=0.0210$) (a un nivel de significancia de $P<0.05$); es decir que las cepas llegaron al punto de inflexión con una tasa de incremento diferente. Esto difiere a lo reportado por Canjura (2000), donde no hubo diferencias significativas.

La separación de medias para la medida de la pendiente en el punto de inflexión mediante la prueba de Tukey (Cuadro 3), reflejó que las cepas provenientes de Santiago de María y Chalchuapa alcanzaron el punto de inflexión con una tasa de incremento similar (-0.244 y 0.154 respectivamente). Los promedios de las pendientes en las cepas Santiago de María y Chalchuapa presentaron una tasa de crecimiento baja; este fenómeno se debió a problemas en la toma de datos en el conteo de concentración de conidias y a la escasa cantidad de nutrientes en el fermentador en la concentración 0.5 g/L de melaza (Ver Figura 6); lo que permitió que se observara un crecimiento atípico de las curvas de crecimiento biológico para dichas cepas. Para el caso de la cepa Ataco, reflejó que existe una diferencia significativa entre ésta y las cepas Santiago de María y Chalchuapa; este fenómeno se debió a que en la concentración 0.5 g/L de melaza, no presentó los problemas mencionados para las otras cepas. Es decir; que al poseer pendientes mayores, con esta cepa se pueden obtener mayores concentraciones de conidias/mililitro comparada con las otras cepas y un tiempo más aceptable.

En este trabajo de investigación se utilizó Bayfolan forte como fuente principal de Nitrógeno (Com. pers. Hoopen, 2003) dentro del fermentador dando mejores resultados (1×10^{10} conidias/mililitro) con respecto a los reportados por Canjura (2000), quien obtuvo concentraciones de 1×10^9 conidias/mililitro utilizando levadura como fuente de nitrógeno en el fermentador. Según Hoopen (Com. pers., 2003) usar Bayfolan forte en fermentadores artesanales es un buen sustituto de la levadura, pues añade otros nutrientes al sustrato y eleva las concentraciones de conidias/mililitro.

VII. CONCLUSIONES

Todas las cepas de *Verticillium sp.* estudiadas se lograron reproducir en fermentadores artesanales de forma satisfactoria alcanzando concentraciones de 1×10^{10} conidias/mililitro.

La reducción de la concentración de melaza no afectó la producción final de conidias de las tres cepas evaluadas.

En el tiempo en días del punto de inflexión el análisis de varianza indicó que existen diferencias significativas entre las cepas estudiadas y en la interacción entre cepa-concentración. Es decir que las cepas provenientes de Santiago de María y Ataco demoraron más tiempo para llegar al punto de inflexión en el experimento (26.84 días y 14.04 días respectivamente), mientras que la cepa proveniente de Chalchuapa lo alcanzó en un tiempo más corto (2.11 días).

El análisis de varianza de la medida de la pendiente en el punto de inflexión demostró que existen diferencias significativas entre las cepas estudiadas; es decir que las cepas provenientes de Santiago de María y Chalchuapa (con una tasa de incremento del -0.244 y 0.154 respectivamente) difirieron significativamente de la cepa Ataco, que alcanzó el punto de inflexión con una tasa de incremento del 4.289.

Bayfolan Forte es una muy buena fuente de Nitrógeno, porque añade otros nutrientes a la mezcla contenida en los fermentadores, lo que favoreció la producción de conidias/mililitro a gran escala en esta investigación.

VIII. RECOMENDACIONES

Continuar con más estudios de reproducción masiva de otras cepas de ***Verticillium sp.*** en el país.

Estudiar el hiperparasitismo de cepas de ***Verticillium sp.*** en campo.

La reducción de la concentración de melaza no afectó la producción final de conidias de las tres cepas evaluadas. Por lo que se recomienda utilizar la concentración de 4.0 g/L de melaza, por que disminuye los costos de producción y presenta menos problemas en el laboratorio (crecimientos atípicos como con la concentración 0.5 g/L de melaza).

Para evitar el sesgo en la toma de datos se recomienda que sea un evaluador (a) el que realice el conteo de conidias/mililitro en todo el experimento.

IX. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

- Albarrán R, JG. 1999. Influencia de los factores químicos y físicos Sobre la regeneración de embriones somáticos de *Coffea arabica* en Biorreactor Simplificado. Tesis de Maestría. Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 100 pp.
- Andrews, JH. 1992. Biological control in the phyllosphere. Annual Review of Phytopathology 30: 603-635.
- Arias, S. 1988. Los subsistemas de agro exportación de El Salvador. El Café, El Algodón y El Azúcar, El Salvador. Talleres Gráficos UCA. 416pp.
- Baker, KF. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 25: 67-85.
- Beker S, M. 1978. Lucha contra la Roya del Cafeto en Centro América. IN Agroconocimiento Revista de Información Agropecuaria, 26: 30-34 Santo Domingo Dom.
- Bertrand, B; Rapidel, B. 1999. Desafíos de la caficultura en Centro America. Ed. B Bertrand; B Rapidel. San José, CR. IICA. PROMECAFE. CIRAD. IRD. CCR. FRANCIA. 496 p.
- Blakeman, JP. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. Annual Review of Phytopathology 20: 167-192.

- Cáceres G, EA. 1995. Evaluación de la influencia de *Trichoderma hamatum* en el control de *Rhizoctonia solani* y su utilización en la prevención del mal del talluelo en “Café” (*Coffea arábica*), “tomate” (*Lycopersicum lentum*), “chile dulce” (*Capsicum annum*). Tesis para optar al grado de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Universidad de El Salvador. 49p.
- Cadena G, G. 1982. Biología de *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. Roya del cafeto *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Manizales, CO. p. 1-26.
- Canjura S, EM, 2000. Reproducción Masiva de *Verticillium sp.* Hiperparásito de roya del café, *Hemileia vastatrix*. Tesis de Maestría. Turrialba, CR. CATIE. 62p.
- Carrión, G. 1988. Estudios sobre control biológico de la roya del cafeto por *Verticillium lecanii* en México. Micología Neotropical Aplicada. 1: 79-86.
- CENICAFE, 1988. La Roya de Cafeto *Hemileia vastatrix* Berk. Y Br. Revista de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Segunda Edición, Manizales, Caldas, Colombia. 174-185p.
- De Bach, P. 1992. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. Compañía Editorial Continental. Decimacuarta reimpresión. MX. 929 p.
- Echeverri, JH. 1980. Fitomejoramiento Genético del Café con énfasis en resistencia a la Roya (*Hemileia vastatrix*) en México y Centro América. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas (IICA) Programa Cooperativo regional para la protección y modernización de la caficultura en México, Centro América y Panamá (PROMECAFE), San José, CR. 93p.

- Flores, M; Bratescu, A; Martínez, JO; Oviedo, J; Acosta, A. 2002. Centro América: El impacto de la caída de los precios del café. Unidad de desarrollo agrícola. Unidad de desarrollo económico. Naciones Unidas (CEPAL) México DF: 60p.
- Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. 1988; Estación experimental Tachira. Paquete tecnológico para la producción de café. Maracay, VE. 192p. (Serie paquetes tecnológicos N° 6).
- Ferrer, 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.
- Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFE) 2001. Boletín estadístico de la caficultura Salvadoreña año 2001. Nueva San Salvador, SV. 20p.
- Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFE) 1997. Manual del caficultor salvadoreño año1997. Nueva San Salvador, SV. 164p.
- Gautier, P. 1999. El comercio internacional del café y sus perspectivas. Seminario Regional sobre situación actual del beneficiado de café: revisión y avances tecnológicos del proceso. Memoria. CICAPE, CR. p. 169- 176.
- González, E; Martínez, MA; Martínez, B. 1995. Efectividad *in vitro* de ***Verticillium lecanii*** (Zimm.) Viegas frente a ***Planococcus*** sp. Revista de Protección Vegetal 10: 265-268.

- González, E; Martínez, B. 1996. Efectividad *in vitro* de dos cepas de ***Verticillium lecanii*** (Zimn) Viegas frente a ***Hemileia vastatrix*** Berk. & Br. Revista de Protección Vegetal 11(3): 173-177.
- Hebbar, PK; Lumsden, RD. 1999. Formulation and fermentation of biocontrol agents of cacao fungal pathogens: example of ***Trichoderma*** species. Research Methodology in Biocontrol of Plant Diseases: with special reference to fungal diseases of cocoa. Workshop Manual. Ed. U Krauss; P Hebbar. Workshop Manual. CATIE, Turrialba, CR. p. 63-68.
- Javed Z, J. 1987. Epidemiología y control de la roya del cafeto en Centroamérica. Plagas y enfermedades de carácter epidémico en cultivos frutales de la región centroamericana. CATIE, CR. p. 17-26 (Serie técnica. Informe técnico no. 110).
- Jiménez C, A. 1997. Aporte de la caficultura al desarrollo de América Latina. *In*. Memorias XVIII Simposio Latinoamericano de Caficultura. IICA, PROMECAFE. San José, CR. p. 3-11.
- Leguizamón C, J; Vélez A, P; González C, A.1989. Efecto de extractos metabólicos de ***Verticillium lecanii*** sobre ***Hemileia vastatrix***. Cenicafé 40 (2): 31-39.
- López A, R; Chamorro T, G; Gallo C., A. 1990. Aspectos económicos de la roya del cafeto. 50 años de CENICAFE 1938-1988. Conferencias conmemorativas. Chinchiná, CO. p. 91-96.
- López, L. 1994. Uso de entomopatógenos y parasitoides como control biológico de plagas y enfermedades en el cultivo del café. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, CR. 54-56p.

- Monzón C, A. 1992. Distribución de **Verticillium sp.** en tres zonas cafetaleras de Nicaragua y evaluación de dos aislamientos del hongo como agente de control biológico de la roya (**Hemileia vastatrix**) del cafeto (**Coffea arabica** L.). Tesis de Maestría. Turrialba, CR. CATIE. 66 p.
- Monzón C, A. 1997. Evaluación de dos aislamientos de **Verticillium sp.** como agente de control biológico de la roya (**H. vastatrix**) del cafeto (**Coffea arabica** L.) en condiciones de invernadero. XVIII Simposio Latinoamericano de caficultura. Memorias. CR. 327-338 p.
- Ospina- Machado, JE; Aldana, A. 1995. Producción Agrícola, Editorial Terranova, Bogotá, CO. (2): 552 p.
- Rivas Z, S; Leguizamón C, J; Ponce D, C. 1996. Estudio histológico, anatómico y morfológico de **Verticillium lecanii** y **Talaromyces wortmannii** con **Hemileia vastatrix**. Cenicafé. 47 (1): 16-31.
- Rivillas O, CA; Leguizamón C, JE; Gil V, LF. 1999. Recomendaciones para el manejo de la roya del cafeto en Colombia. Cenicafe. Boletín Técnico no.19. 36 p.
- Rodrigues 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". Chinchiná, CO. p. 207-212.
- Romero, A; Carrión, G.1995. Patogenicidad de **Verticillium lecanii** sobre la roya del fríjol en condiciones de invernadero. Fitopatología 30 (1): 30-34.
- Ruiz, GM. 1994. Contribución del mejoramiento genético al desarrollo de la caficultura colombiana. Innovación y Ciencia. 3 (2): 1-6.
- Schieber, E. 1977. Impacto Económico de la roya del cafeto en Latino América *in* Contribuciones del IICA al conocimiento de la roya del cafeto. San José, CR. p. 17-20.

Velasco, JD. 1979. Anotaciones sobre la Biología de los diferentes tipos de Royas. Editorial Universitaria. Facultad de Ciencias y Humanidades, Departamento de Biología. Universidad de El Salvador. 122 pp.

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

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

COMUNICACIONES PERSONALES.

Canjura S, EM. 2003. Asesora de Trabajo de Graduación. Técnica Investigadora de la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFE) para el año 2003. PROCAFE. Final 1ra Av. Nte. Santa Tecla. La Libertad, El Salvador.

Hoopen, M. 2003. Investigador Asociado. DGIS-CABI-CATIE. Unidad de Fitoprotección. Departamento de Agricultura Ecológica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Sede Central. P.O.Box.18 CATIE 7170. Turrialba, Costa Rica.

Krauss., U. 2003. Profesora Investigadora. Asistente Fitopatología. Unidad de Fitoprotección. Área de Agricultura Tropical Sostenible. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Sede Central. CATIE 7170. Turrialba, Costa Rica.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza del nivel final de conidias con datos transformados (Log Y) de la interacción de tres cepas de *Verticillium sp.*, a tres concentraciones diferentes de melaza y sus tres repeticiones.

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Pr>F</i>
Cepa	2	12.649	6.324	0.48	0.6285
Melaza	2	41.815	20.907	1.58	0.2341
Interacción Cepa*Melaza	4	99.781	24.945	1.88	0.1578

$$R^2 = 0.392$$

$$C.V. = 19.683$$

$$W \text{ Normal} = 0.905$$

*Significativo $P < 0.05$

Anexo 2. Análisis de varianza del tiempo (días) del punto de inflexión de tres cepas de *Verticillium sp.*, a tres concentraciones diferentes de melaza y sus tres repeticiones.

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Pr>F</i>
Cepa	2	2753.5940	1376.7970	5.19	0.0166*
Melaza	2	1742.6283	871.3141	3.28	0.0608
Interacción Cepa*Melaza	4	3180.2932	795.0733	3.00	0.0465*

$$R^2 = 0.6165$$

$$C:V: = 113.6799$$

*Significativo $P < 0.05$

Anexo 3. Análisis de varianza de la pendiente en el punto de inflexión de tres cepas de *Verticillium sp.*, a tres concentraciones diferentes de melaza y sus tres repeticiones.

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Pr>F</i>
Cepa	2	113.4051	56.7025	4.83	0.0210*
Melaza	2	22.0512	11.0256	0.94	0.4096
Interacción Cepa*Melaza	4	19.9006	4.9751	0.42	0.7898

$R^2 = 0.4234$

C.V. = 244.9179

*Significativo $P < 0.05$