



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMIA

Maestría en Sanidad Vegetal

Trabajo de tesis

Aislados nativos de *Lecanicillium* sp para el manejo de la roya *Hemileia vastatrix* (Berk & Broome) en el cultivo de café (*Coffea arábica* L)

Autor

Ing. Santos David Romero

Asesor

PhD. Arnulfo Monzón Centeno

Managua, Nicaragua

Mayo, 2020



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMIA

Maestría en Sanidad Vegetal

Trabajo de tesis

Aislados nativos de *Lecanicillium* sp para el manejo de la roya *Hemileia vastatrix* (Berk & Broome) en el cultivo de café (*Coffea arábica* L)

Autor

Ing. Santos David Romero

Asesor

PhD. Arnulfo Monzón Centeno

Tesis sometida a la consideración del Honorable Tribunal Examinador como requisito final para optar al grado de:
Maestro en Ciencias en Sanidad Vegetal

Managua, Nicaragua

Mayo, 2020

Hoja de aprobación del Tribunal Examinador

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable Tribunal Examinador designado por el Decanato de la Facultad de Agronomía como requisito final para optar al título profesional de:

Maestro en Ciencias en Sanidad Vegetal

Miembros del Tribunal Examinador

Dr. Ulises Blandón D.

Presidente

MSc. Isaías Sánchez G.

Secretario

María del Rosario Chavarría S.

Vocal

Lugar y fecha: Managua, 14 de mayo 2020

DEDICATORIA

A Jehová

A mi familia, en especial mis hijas Kerstin Sanaris Romero Aráuz y Gabriela Alejandra Romero Aráuz

Ing. Santos David Romero

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Jehová por la vida y salud brindada durante este trabajo.

A mi asesor Dr. Arnulfo Monzón por su apoyo durante el transcurso de la investigación.

Al Dr. Ulises Blandón Díaz.

Al MSc. Markelyn José Rodríguez Zamora por su apoyo incondicional durante el transcurso de este trabajo.

A la familia Mairena de la finca agroturística La Hermandad en especial a Marvin Antonio Mairena por haberme apoyado en la realización de la etapa de campo.

Al programa de Maestría en Sanidad Vegetal de la Universidad Nacional Agraria y equipo de docentes que forman parte de la maestría.

Ing. Santos David Romero

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN	2
II. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos	3
III. MARCO DE REFERENCIA	4
IV. MATERIALES Y METODOS	8
4.1. Ubicación del estudio	8
4.2. Diseño metodológico	8
4.2.1. Recolección de muestras de campo	8
4.2.2. Aislamiento de <i>Lecanicillium</i> sp y de <i>H. vastatrix</i>	9
4.2.3. Caracterización de aislados nativos de <i>Lecanicillium</i> sp	10
4.3. Parasitismo <i>in vitro</i> de <i>Lecanicillium</i> sp sobre <i>H. vastatrix</i>	13
4.4. Parasitismo de <i>Lecanicillium</i> sp sobre pústulas de <i>H. vastatrix</i> en condiciones de laboratorio	14
4.5. Efecto de aislados de <i>Lecanicillium</i> sp sobre la roya en condiciones de campo	15
4.5.2. Variables evaluadas	17
4.5.3. Análisis de los datos	17
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
5.1. Características microscópicas y macroscópicas de <i>Lecanicillium</i> sp	19
5.2. Potencial de producción masiva	29
5.2.1. Rendimiento de aislados de <i>Lecanicillium</i> sp en sustrato a base de soya	30
5.2.2. Rendimiento de aislados de <i>Lecanicillium</i> sp en sustrato de arroz	31
5.2.3. Rendimiento de aislados de <i>Lecanicillium</i> sp en sustrato a base de sorgo	33
5.3. Parasitismo de <i>Lecanicillium</i> sp en condiciones <i>in vitro</i>	34
5.4. Parasitismo <i>in vitro</i> de <i>Lecanicillium</i> sp sobre pústulas de <i>H. vastatrix</i>	36
5.5. Efecto de aislados de <i>Lecanicillium</i> sp sobre la incidencia de roya	38
5.6. Parasitismo de aislados de <i>Lecanicillium</i> sp sobre <i>H. vastatrix</i> en condiciones de campo	39
5.6.1. Parasitismo de aislados de <i>Lecanicillium</i> sp sobre <i>H. vastatrix</i> en diferentes fechas	40
5.6.2. Parasitismo de aislados de <i>Lecanicillium</i> sp en pústulas de <i>H. vastatrix</i>	41
5.6.3. Parasitismo de aislados de <i>Lecanicillium</i> sp sobre <i>H. vastatrix</i> en pústulas en diferentes fechas	42

VI. CONCLUSIONES	45
VII. RECOMENDACIONES	46
VIII. LITERATURA CITADA	47
IX. ANEXOS	52

INDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Localidades de las muestras para la obtención de <i>Lecanicillium</i> sp, en el periodo comprendido 2013-2014	9
2. Tratamientos aplicados en campo para determinar la efectividad de diferentes aislados de <i>Lecanicillium</i> sp sobre <i>H. vastatrix</i>	15
3. Porcentaje de viabilidad de conidias de aislados de <i>Lecanicillium</i> sp en tres fechas de muestreo mediante prueba de Tukey	22
4. Parasitismo in vitro de aislados nativos de <i>Lecanicillium</i> sp sobre uredosporas de <i>H. vastatrix</i>	35
5. Medias comparativas del parasitismo in vitro de aislados nativos de <i>Lecanicillium</i> sp sobre uredosporas de <i>H. vastatrix</i> en pústulas	37

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Estructuras reproductivas de <i>Lecanicillium</i> sp	20
2. Colonias de <i>Lecanicilium</i> sp en en diferentes medios de cultivos	23
3. Crecimiento radial de aislados de <i>Lecanicillium</i> sp a los 20 días después de inoculación, en tres medios de cultivo, a 24°C, con 10 horas luz y 14 horas de oscuridad	24
4. Crecimiento radial (mm) de diferentes aislados de <i>Lecanicillium</i> sp en diferentes horas en medio de cultivo Extracto de Malta Agar	26
5. Crecimiento radial (mm) de diferentes aislados de <i>Lecanicillium</i> sp en diferentes horas en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar	27
6. Crecimiento radial (mm) de diferentes aislados de <i>Lecanicillium</i> sp en diferentes horas en medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar	28
7. Crecimiento radial de aislados de <i>Lecanicillium</i> sp cada 48, en medios de cultivo SDA, a 24°C, con 10 horas luz y 14 horas de oscuridad	29
8. Rendimiento promedio de aislados nativos de <i>Lecanicillium</i> sp a los 20 días incubación en el sustrato a base soya. Líneas de barras indican el error estándar	30
9. Rendimiento promedio de aislados nativos de <i>Lecanicillium</i> sp a los 20 días incubación en el sustrato a base arroz. Líneas de barras indican el error estándar	32
10. Rendimiento promedio de aislados nativos de <i>Lecanicillium</i> sp a los 20 días incubación en el sustrato a base sorgo. Líneas de barras indican el error estándar	33
11. Prueba de parasitismo in vitro de <i>Lecanicillium</i> sp sobre <i>Hemileia vastatrix</i>	36
12. Incidencia de roya en cinco fechas en cafetos bajo sombra. Líneas sobre los puntos indican el error estándar	38
13. Porcentaje de parasitismo de aislados de <i>Lecancillium</i> sp en hojas. Líneas sobre las barras indican el error estándar	40
14. Incidencia de pústulas parasitadas en condiciones de campo mediante aplicaciones de aislados nativos de <i>Lecanicillium</i> sp con muestreos y aplicaciones cada 15 días. Líneas sobre los puntos indican el error estándar	41
15. Porcentaje de parasitismo de aislados de <i>Lecancillium</i> sp en pústulas. Líneas sobre las barras indican el error estándar	42
16. Parasitismo de aislados de <i>Lecancillium</i> sp en pústulas en diferentes fechas. Líneas sobre los puntos indican el error estándar	43

INDICE DE ANEXOS

ANEXO	PÁGINA
1. Metodología de medición del crecimiento radial de aislados de <i>Lecanicillium</i> sp. descrita por (French y Hebert, 1982)	52
2. Diseño de campo de diferentes tratamientos	52
3. Distribución del azar de sitios para el muestreo de incidencia de roya , parasitismo de roya en diferentes fechas, parasitismo en hojas y pústulas	53
4. Análisis de varianza para la variable de viabilidad de aislados de <i>Lecanicillium</i> sp en diferentes horas	53
5. Análisis de varianza para la variable del crecimiento radial de aislados de <i>Lecanicillium</i> sp en medio de cultivo EMA.	53
6. Análisis de varianza para la variable del crecimiento radial de aislados de <i>Lecanicillium</i> sp en medio de cultivo PDA	54
7. Análisis de varianza para variable del rendimiento de aislados de <i>Lecanicillium</i> sp en diferentes sustratos orgánicos	54
8. Análisis de varianza para la variable del rendimiento de aislados de <i>Lecanicillium</i> sp en sustrato orgánico a base de soya	54
9. Análisis de varianza para la variable del rendimiento de aislados de <i>Lecanicillium</i> sp en sustrato orgánico a base de arroz	55
10. Análisis de varianza para la variable del rendimiento de aislados de <i>Lecanicillium</i> sp en sustrato orgánico a base de sorgo	55

RESUMEN

La roya del café causada por el hongo *Hemileia vastatrix* puede reducir la producción, los principales daños que causa son la caída prematura de las hojas y el secamiento de las ramas; para su manejo, el principal método utilizado es el uso de fungicidas sintéticos. El objetivo de este estudio fue contribuir al desarrollo de opciones de control biológico de la roya del café, mediante la caracterización y evaluación de aislados nativos de *Lecanicillium* sp. El inóculo se obtuvo de pústulas de roya hiperparasitadas utilizando una aguja hipodérmica y se purificó en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar. Los aislados de *Lecanicillium* sp fueron estudiados mediante caracterización microscópica y macroscópica, así como pruebas *in vitro* para determinar el parasitismo de cada aislado sobre uredosporas y pústulas de roya, además se estudió la producción de conidias en los sustratos orgánicos: soya, sorgo y arroz. Se evaluó en condiciones de campo la capacidad parasítica de los aislados. Los datos obtenidos se sometieron a pruebas de hipótesis mediante análisis de varianza y separación de medias por medio de la prueba de Tukey, otras variables fueron analizadas mediante pruebas no paramétricas. Se obtuvieron 6 aislados nativos del género *Lecanicillium* sp. El crecimiento radial promedio de *Lecanicillium* sp a los 20 días posteriores a la inoculación fue de 18 mm en PDA, 15 mm en EMA y de 16 mm en SDA. El aislado Majada presentó el mayor porcentaje de viabilidad con 99.7% a las 22 horas. El aislado La Gotera en el sustrato orgánico a base de soya presentó el mayor rendimiento de conidias de 1.08×10^9 por gramo de sustrato en comparación a los demás sustratos y los demás aislados. El aislado Jinotega presentó el mayor parasitismo de uredosporas en platos Petri 16.61%. El mayor porcentaje de parasitismo sobre las pústulas lo presentó el aislado La Gotera con 88.33%. En el campo todos los aislados lograron causar parasitismo sobre las uredosporas logrando una disminución de la enfermedad de 57.18% a 18.41%, siendo el aislado San Ramón el que presentó el mayor porcentaje de parasitismo en hojas 21.47% y 15.83% de parasitismo en pústulas.

Palabras claves: Parasitismo, crecimiento radial, pústulas, uredosporas, hiperparasitismo, control biológico.

ABSTRACT

Coffee rust caused by *Hemileia vastatrix* can reduce production, due to premature fall of the leaves and drying of the branches. The objective of this study was to contribute to the development of biological control of coffee rust caused by the fungus *Hemileia vastatrix*, throughout the characterization and evaluation of native isolates of *Lecanicillium* sp. The inoculum of *Lecanicillium* sp was obtained directly from parasitized rust pustules, using a hypodermic needle and was purified in Potato Dextrose Agar culture medium. Microscopic and macroscopic characterization was carried out for all isolates, *in vitro* tests were conducted in order to determine the level of parasitism of each isolate on uredospores and rust pustules, as well as viability, in addition, natural substrates based on soybean, sorghum and rice were evaluated for mass production. The parasitic capacity of all isolates was evaluated under field conditions. The data obtained were analyzed by analysis of variance and means comparisons by Tukey test, other variables were analyzed by non-parametric tests. Six native isolates of the genus *Lecanicillium* sp were obtained. La Majada isolate presented the highest percentage of viability with 99.7% at 22 hours after inoculation. The mean radial growth of *Lecanicillium* sp at 20 days after inoculation was 18 mm in PDA, 15 mm in EMA and 16 mm in SDA. La Gotera isolate in soybean based substrate had the highest conidia yield of 1.08E + 09 per gram of substrate, compared to the other substrates. Jinotega isolate presented the highest uredospore parasitism in Petri dishes, 16.61%. The highest percentage of parasitism on pustules was obtained by La Gotera isolate with 88.33%. In field conditions, all isolates caused parasitism on uredospores and reduced rust incidence from 57.18% to 18.41%; the highest percentage of parasitism in leaves, 21.47% and 15.83% of parasitism in pustules was obtained with San Ramón isolate.

Keywords: Parasitism, radial growth, pustules, uredospores, hyperparasitism, biological control

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo del café (*Coffea arábica* L.) es uno de los rubros más importantes del mundo con una producción de 167.9 millones de sacos de 60 kilogramos en el ciclo 2019-2020 (OIC 2020). Para la economía de Nicaragua, el café ha sido a través de los años el rubro que ha tenido mayor aporte a la economía representando cerca del 30% del PIB agrícola y 50% de las divisas provenientes de las exportaciones. Desde el punto de vista social, emplea el 31.5% del total de la mano de obra agrícola nacional (Moraga *et al.*, 2012).

Según estimaciones en Nicaragua hay 44 519 productores de café, de los cuales el 93% son pequeños productores (de 0.7 a 3.5 ha), medianos productores 6% y grandes productores 1% ubicados principalmente en los departamentos de Jinotega, Matagalpa y Las Segovia con una área total de 126, 915 ha (CENAGRO, 2013). Estos cafetaleros poseen el 59% del área cultivada y generan aproximadamente el 45,2% de la producción nacional (Guharay, 2000).

Durante el ciclo 2011-2012 Nicaragua tuvo una exportación de café de 450,383,446.61 dólares y para el ciclo 2012-2013 tuvo una exportación de 430, 721,041.16 (CETREX, 2020), lo que demuestra que tuvo una disminución de 19,662,405.5 millones de dólares debido a la alta incidencia de roya (*Hemileia vastatrix* Berk & Broome) de 37.0%. La epidemia del ciclo 2012-2013 es un revelador de las consistentes debilidades de la región en una serie de aspectos como la investigación, la generación de tecnología, la transferencia, la adopción, la capacitación. Es también un revelador de la fragilidad socioeconómica del sector café. La crisis de la roya anaranjada ha puesto en riesgo la sobrevivencia de cientos de miles de familias de la región, de trabajadores agrícolas y pequeños productores especialmente (Avelino *et al.*, 2013).

En el ciclo 2019 Nicaragua exportó 460,173,128.6 dólares lo que demuestra que el café aún sigue siendo el rubro de importancia económica para el país, después de la carne bovina y del oro (CETREX, 2020).

El control de plagas en la agricultura ha sido mediante el uso de productos químicos, pero debido a efectos no deseables en organismos benéficos, aguas subterráneas, inocuidad de alimentos y desarrollo de resistencia en insectos (Shahid *et al.*, 2012), estas estrategias no han sido la solución ideal a la problemática (Javed, 1987).

Se han aplicado diferentes prácticas agrícolas, como el uso de la rotación de cultivos, cultivos de cobertura, variedades resistentes a enfermedades. Sin embargo, tales prácticas no siempre son una protección suficiente contra las pérdidas de cultivos. Debido a esto, muchos productores orgánicos certificados recurren a los bioplaguicidas para asegurar y mejorar sus habilidades para cultivar y comercializar productos de alta calidad. Actualmente, el uso de bioplaguicidas es una herramienta para mejorar las estrategias de uso racional de insecticidas, en las que se incluyen plaguicidas microbiales a base de bacterias, hongos, virus y nemátodos. (Cao *et al.*, 2010).

El cultivo de café se ve limitado por diversos factores que afectan su producción, entre estos factores están principalmente las condiciones edáficas y climáticas, así como problemas de plagas y enfermedades; principalmente la roya (*H. vastatrix*). A nivel mundial esta enfermedad es considerada la más destructiva del café ya que provoca la caída prematura de las hojas si existe infestaciones severas, propiciando la reducción de la capacidad fotosintética, así como el debilitamiento de árboles enfermos predisponiendo de esta manera al ataque de otras enfermedades; alta severidad puede ocasionar muerte regresiva en ramas e incluso la muerte de los árboles (Guharay, 2000).

El hongo *Lecanicillium* sp es uno de los hiperparásitos más comunes de la roya del café, se presenta en los cafetales en forma natural y podría ser un buen candidato para el control biológico de la roya (Leguizamón *et al.*, 1989).

Dada la importancia de la enfermedad de la roya de café el propósito del presente estudio es contribuir al desarrollo de nuevas alternativas de manejo biológico de la enfermedad mediante aislados nativos de *Lecanicillium* sp, caracterización y evaluación en condiciones *in vitro* así como su posterior evaluación en condiciones de campo, con el propósito de obtener cepas promisorias para el manejo de la enfermedad mediante aplicaciones inundativas.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Contribuir al desarrollo de opciones de manejo biológico de la roya del café (*H. vastatrix*) a través del aislamiento y evaluación de aislados nativos de *Lecanicillium* sp

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar aislados nativos de *Lecanicillium* sp en términos fisiológicos, microscópicos y morfométricos.
- Evaluar la capacidad parasítica de aislados nativos de *Lecanicillium* sp sobre las uredosporas de *H. vastatrix* en condiciones de laboratorio.
- Evaluar el efecto de aislados de *Lecanicillium* sp sobre la roya del café (*H. vastatrix*) bajo condiciones de campo.

III. MARCO DE REFERENCIA

La roya del café es una enfermedad causada por el hongo *H. vastatrix* que pertenece a la subdivisión de los Basidiomicetes, del orden Uredinales, familia Pucciniaceae, es un parásito obligado que afecta a especies del género *Coffea* especialmente *Coffea arabica*, *Coffea canephora* y *Coffea liberica*. La enfermedad puede reducir la producción de café entre 30% y 40%. Los principales daños causados por la roya son la caída prematura de las hojas y el secamiento de las ramas y consecuentemente una baja en la producción de frutos al año siguiente (Vázquez, 2005).

Tradicionalmente el café se ha cultivado bajo un dosel de árboles de sombra, por esta complejidad estructural las plantaciones del sistema café tienen alta biodiversidad, mayor retención de humedad en el suelo y un mayor ciclaje de nutrientes; sin embargo las plantaciones de café se han transformado en plantaciones industriales con poca o ninguna sombra con el fin de obtener altos rendimientos, por esta razón la forma en que la producción de café evoluciona en las próximas décadas es probable tener un tremendo impacto debido al alto uso de insumos y la poca biodiversidad de microorganismos benéficos (Perfecto *et al.*, 2007).

En la actualidad el principal método de control de plagas es el control químico con diversos grados de toxicidad y de residualidad mezclando diferentes ingredientes activos sistémicos y de contacto con el fin de proteger los cultivos de los patógenos principalmente, sin embargo, todo esto ha desfavorecido al medio ambiente y a la salud humana, provocando en muchos casos una alteración a la fertilidad masculina por exposición a plaguicidas, produciendo incremento en la aparición de oligozoospermia, teratozoospermia y, así como una elevación de los valores sanguíneos de la hormona estimulante de los folículos (Hernández *et al.*, 2009).

El control biológico es una de las alternativas a los plaguicidas químicos. Los depredadores, parasitoides, hongos y otros organismos benéficos pueden usarse para el control biológico de las plagas de insectos o de algunas enfermedades (Alavo, 2015). Para el año 2023 se proyecta que el mercado de bioplaguicidas crecerá en ventas cerca de 6.4 mil millones de dólares (Thakore, 2006).

Una alternativa de manejo biológico de la roya del café (*H. vastatrix* Berk & Broome) puede ser el hiperparásito *Lecanicillium lecanii* (Vandermeer *et al.*, 2009) anteriormente conocido como *Cephalosporium lecanii*, previamente identificado como el complejo de especies de *Verticillium lecanii* (Zare y Gams, 2001); la efectividad de este hongo ha sido estudiada en condiciones naturales al cual se le reconocen atributos especiales como enemigo natural de *H. vastatrix*, pero ha carecido de métodos de reproducción masiva eficientes y de bajo costo (Leguizamón *et al.*, 1989).

Debido a la demanda de café de calidad en el mercado internacional y considerando los efectos colaterales del uso de fungicidas para su control, se hace necesario desarrollar una caficultura amigable con el ambiente para obtener productos agrícolas inocuos mediante manejos agroecológicos que impliquen menor riesgo al ambiente y a la salud humana por tales razones se deben desarrollar programas de manejo de plagas en la que el uso de productos biológicos debería ocupar un papel preponderante (González, 2001).

El hongo *lecanicillium* es un género del orden Hypocreales que actualmente consta de 21 especies, posee una amplia distribución en los países tropicales y subtropicales algunas especies de este género como *Lecanicillium muscarium*, *Lecanicillium psalliotae* y *Lecanicillium lecanii* se encuentra parasitando hongos del orden uredinales como la roya del café causada por el hongo *Hemileia vastatrix* (Vélez y Rosillo, 1995). Dentro del complejo de enfermedades que atacan al cultivo de café, la roya (*Hemileia vastatrix*) es de las de mayor importancia económica (Suresh *et al.*, 2012).

El control biológico de las enfermedades de las plantas ofrece alternativas naturales a los fungicidas, plaguicidas, herbicidas e insecticidas sintéticos que no solo no han logrado detener las plagas y los patógenos, sino que han generado serias preocupaciones ambientales y de seguridad (Howell, 2003).

Según Hall (1984) el hongo *L. lecanii* se desarrolla bien en casi cualquier medio de cultivo artificial. Zare y Gams (2001) afirman que *Lecanicillium lecanii* presenta un crecimiento de colonias que alcanzan 15 a 25 mm de diámetro en 10 días a 24°C en medio de cultivo PDA. Sin embargo los medios de cultivo más adecuados para el desarrollo del hongo en laboratorio

son Sabouraud dextrosa agar y Sabouraud maltosa agar más extracto de levadura (Bustillo, 1986).

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

Lecanicillium lecanii se ha registrado en varios países como hiperparásito de royas en diferentes cultivos, también se ha encontrado hiperparasitando en forma natural, pústulas esporuladas de roya, en donde se observa un crecimiento blanco del hiperparásito sobre las uredosporas (Leguizamón *et al.*, 1989). El porcentaje de parasitismo de *Lecanicillium* sp sobre uredosporas de *H. vastatrix* varía entre diferentes aislamientos (González, 2001)

Bello *et al.* (2018) mediante aplicaciones en campo demostraron un efecto parasítico de *Verticillium* sp sobre las uredosporas de *Hemileia vastatrix* logrando una disminución de porcentaje de pústulas con roya, encontrando un alto porcentaje de pústulas inhibidas en todos los tratamientos. Así mismo Monzón (1992) reporta la actividad hiperparasitica de *Lecanicillium* sp mediante la aplicación de diferentes aislamientos y concentraciones del hongo sobre pústulas de roya y encontró que el nivel de incidencia aumenta en los primeros 10 días hasta alcanzar valores desde 50% hasta 80%.

Lim y Nik (1983), reportan micoparasitismo de *V. psalliotae* sobre *Hemileia vastatrix* y describen crecimiento vigoroso entre las rugosidades en las superficies de las uredosporas formando muchos conidióforos y conidios. Estos autores también refieren que esporas infectadas eventualmente perdieron su citoplasma, este estudio de micoparasitismo fue mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía de luz de interferencia.

Askary (1997) determinó que existen diferentes momentos en el hiperparasitismo. Las hifas de *L. lecanii* colonizan las estructuras del huésped mediante una unión fuerte, aparentemente por una delgada matriz mucilaginosa. A las 24 horas después de la aplicación del antagonista sobre el patógeno, se detecta fácilmente una mayor vacuolación y desorganización del citoplasma de las hifas patógenas. A las 36 horas se da la retracción de la plasmalema y la agregación local del citoplasma siendo estas las características típicas del daño. *L. lecanii* no causa alteraciones

extensas de la pared celular del huésped, excepto en el área de penetración hifal. A las 48 h después de la inoculación, se observó una mayor desorganización del citoplasma, como lo demuestra la pérdida de turgencia celular y la contorsión de la pared celular. Tal deformación sugiere que la penetración del antagonista resulta de la presión mecánica o la hidrólisis enzimática localizada a través de la acción de las quitinasas. A las 72 h después del contacto entre los hongos, las células del patógeno colapsan notablemente, se agotaron su protoplasma debido a la extensa multiplicación y liberación de esporas de *Lecanicillium lecanii*.

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1. Ubicación del estudio

El estudio se realizó en el laboratorio de hongos entomopatógenos de la Universidad Nacional Agraria ubicada en el Km 12.5 Carretera Norte, Managua, Nicaragua y en la finca La Hermandad, localizada en San Ramón Matagalpa entre las coordenadas 12°57' latitud norte y 85°48' longitud Oeste con una altitud de 1056 msnm. Las precipitaciones varían entre 2,000 a 2,400 mm caracterizándose por una buena distribución durante todo el año, la temperatura promedio oscila entre 22°C y 26°C.

4.2. Diseño metodológico

El estudio incluye métodos de investigación descriptiva e investigación experimental. En la investigación no experimental se realizó una caracterización microscópica y macroscópica de los aislados de *Lecanicillium* sp. La investigación experimental incluyó una fase de laboratorio y una de campo donde se sometió a prueba la capacidad parasítica de los aislados de *Lecanicillium* sp sobre el patógeno *H. vastatrix* causante de la roya del café.

El estudio se efectuó en tres etapas, la primera consistió en la colecta de muestras de *Lecanicillium* sp a partir de hojas de café infectadas con roya (*H. vastatrix*) para su posterior aislamiento y caracterización, en la segunda etapa se evaluó en condiciones de laboratorio a todos los aislados de *Lecanicillium* sp para determinar el nivel de parasitismo sobre las uredosporas y sobre pústulas de roya en hojas provenientes del campo, también se evaluó el crecimiento de los aislados del hongo en diferentes sustratos con el fin de determinar cepas promisorias para la reproducción masiva. La tercera etapa consistió en la evaluación de los aislados sobre *H. vastatrix*, mediante aplicaciones inundativas en campo.

4.2.1. Recolección de muestras de campo

Para la colecta de muestras de *Lecanicillium* sp se seleccionaron tres fincas en el departamento de Jinotega y una en el departamento de Matagalpa, donde se obtuvieron las muestras, siendo como mínimo 50 hojas por muestra. La variedad de los cafetos donde se colectaron las muestras

fueron Caturra y Catuaí, con una edad de aproximadamente 10 años de establecida la plantación (Cuadro 1).

Cuadro 1. Localidades de las muestras para la obtención de *Lecanicillium* sp, en el periodo comprendido 2013-2014.

Aislamientos	Origen geográfico	Fincas	Manejo	Altura
Jinotega	Jinotega	Santa Martha	Tradicional	1000-1200 msnm
Mankotal	Jinotega	Santa Elena	Tradicional	1200-1300 msnm
Majada	Matagalpa	Santa Emilia	Convencional	900-1100 msnm
Gotera	Matagalpa	Santa Emilia	Convencional	900-1100 msnm
Granadillo	Matagalpa	Santa Emilia	Convencional	900-1100 msnm
San Ramón	Jinotega	Linda vista	Convencional	1200-1300 msnm

Para el estudio de parasitismo *in vitro* de *Lecanicillium* sp sobre la roya se usaron hojas con pústulas frescas, provenientes de la finca La Hermandad, San Ramón Matagalpa ubicada a una altura de 1056 msnm. El manejo del cafetal que presentaba la parcela donde se estableció la fase de campo era de tipo tradicional (no químico).

4.2.2. Aislamiento de *Lecanicillium* sp y de *H. vastatrix*

El inóculo de *H. vastatrix* se obtuvo de hojas infectadas con presencia de pústulas jóvenes altamente esporuladas para asegurar buena viabilidad. Una vez colectadas las muestras fueron depositadas en bolsas plásticas y en termos y fueron llevadas al laboratorio de hongos entomopatógenos de la Universidad Nacional Agraria. El inóculo de *Lecanicillium* sp se obtuvo de hojas de café con pústulas de *H. vastatrix* parasitadas por *Lecanicillium* sp.

Las uredosporas de *H. vastatrix* fueron obtenidas directamente por raspado de las pústulas a partir de las hojas infectadas colectadas en el campo. Luego de recolectadas las uredosporas, fueron depositadas en cápsulas de gelatina colocadas en tubos de ensayo y estos fueron sumergidas en ácido sulfúrico (hasta un tercio del tubo) y colocadas en refrigeración a 4°C, hasta el momento de ser utilizados en la inoculación (Monzón, 1992).

La metodología para aislar *Lecanicillium* sp fue aislamiento en seco, que consistió en tomar el inóculo directamente de una pústula de roya parasitada utilizando una aguja hipodérmica y colocarlo en platos Petri con PDA. Las muestras también fueron observadas al microscopio, utilizando tinción con lacto fenol azul para determinar que se estaba aislando el hongo deseado. Una vez confirmado mediante claves taxonómicas (Zare y Gams, 2001) se purificó en medio de cultivo PDA y se conservó hasta el momento de su utilización en el ensayo a temperatura de 24°C para su posterior uso en el estudio.

4.2.3. Caracterización de aislados nativos de *Lecanicillium* sp

Después de la purificación de los aislados de *Lecanicillium* sp se procedió a la identificación y caracterización de estos, con base a características microscópicas y características macroscópicas. La caracterización se hizo en tres medios de cultivo, Papa Dextrosa Agar (PDA), Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) y Extracto de Malta Agar (EMA). También se incluyeron características relacionadas a su producción masiva en sustratos naturales.

Para proceder a la caracterización, el hongo fue transferido a partir de un cultivo puro hacia los medios de cultivo en platos Petri de 90 mm, en los que se hicieron las observaciones correspondientes y se evaluaron seis aislados nativos de *Lecanicillium* sp, utilizando 10 repeticiones, considerando un plato Petri como repetición.

Para las características microscópicas se midió el tamaño de las estructuras reproductivas del hongo, tales como: tamaño de las fiálides, tamaño de las conidias, ancho de base de las fiálides, ancho de extremo de las fiálides. También se consideró la forma y color de las conidias. Para realizar esta medición se utilizó un microscopio de luz LW-Scientific previamente calibrado y un lente micrométrico ocular, se usó el lente de 40x. Los datos fueron tomados a las 48 horas después de inoculado el medio de cultivo. La cantidad de estructuras que se tomaron fueron treinta para cada variable para cada medio de cultivo (PDA, SDA y EMA). Para evitar contaminación con bacterias, se utilizó un antibiótico a base de cloranfenicol al 2%.

Las características macroscópicas incluyeron aspectos cualitativos como color de las colonias, tipo de crecimiento y ritmo de crecimiento (crecimiento radial).

La medición del crecimiento radial se hizo con base a la metodología descrita por French y Hebert (1982), la cual permite determinar el ritmo de crecimiento en platos Petri. La técnica consistió en colocar el inóculo en el centro del plato que contiene el medio de cultivo y luego dibujar una cruz en la parte de atrás de plato Petri marcando el centro que fue el punto de inoculación; la cruz delimita cuatro radios identificados con letras A, B, C, D en los cuales se realizaron las lecturas (Anexo 1).

Los datos se tomaron midiendo el crecimiento del hongo sobre cada uno de los cuatro radios marcados. Las mediciones se realizaron cada 48 horas por un período de 20 días. Para cada aislamiento se utilizaron 30 platos, 10 para cada medio cultivo para un total de 180 unidades experimentales.

Viabilidad de conidias

La viabilidad se determinó mediante la evaluación de la germinación evaluando el tiempo medio de germinación de conidias descrito por Monzón (2001). La metodología consistió en colocar un gramo de hongo en un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua destilada estéril, de esa manera se prepararon las diluciones en serie 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . Una vez preparada la primera dilución, esta fue homogenizada mediante un vórtex a 2400 rpm se mantuvo por tres minutos para separar las conidias del sustrato. A partir de la primera dilución se tomó un ml de la suspensión, para preparar la siguiente dilución, procediendo de esta manera para preparar todas las diluciones y se seleccionó la dilución más adecuada para el estudio de viabilidad.

Para el establecimiento de la prueba se depositó con una micropipeta una alícuota de 5 μ l de la suspensión de *Lecanicillium* sp en el plato Petri de 90 mm, que contenía un medio Agar-agua al 1.5%, esterilizado en autoclave a 1.2 bar de presión y 120°C de temperatura. Los platos Petri inoculados fueron colocados en una sala a temperatura de 24.5° C. Todos los tratamientos recibieron 8 horas luz.

La medición de germinación de conidias se realizó a las 16, 18 y 22 horas, con ayuda de un microscopio de luz marca LW-Scientific de 40X, utilizando tres platos Petri para cada tiempo de lectura, para un total de nueve platos por cada aislado. Al momento de la lectura de la viabilidad en cada plato se observaron 10 campos microscópicos, los cuales fueron previamente

delimitados con un marcador en la parte posterior del plato; se observó en total treinta campos por cada aislado en cada lectura, observando al menos 200 conidias en cada plato.

El porcentaje de viabilidad se calculó empleando la siguiente fórmula (French y Hebert, 1982).

$$\text{Conidias germinadas (\%)} = \frac{\text{No. de conidias germinadas}}{\text{No. de conidias totales}} \times 100$$

Considerando que el estudio de la viabilidad de las conidias tiene como propósito determinar el porcentaje de conidias que se encuentran viables; es decir la capacidad que tienen las conidias de poder germinar, se consideró una conidia germinada aquella que su tubo germinativo alcanzara el doble de su largo. Este estudio es importante ya que nos permite conocer la cantidad de esporas vivas, ya que es una de las características principales que un hongo debe cumplir para poder reproducirse masivamente.

Potencial de producción masiva

El potencial de producción masiva de cada aislado de *Lecanicillium* sp, fue evaluado mediante la producción de conidias (rendimiento) en tres sustratos, arroz, soya y sorgo, con base a un método de producción masiva semi-industrial bifásica. La metodología consistió en reproducir el inóculo en un medio de cultivo sólido sintético y en matrices líquidas a base de Nitrógeno, vitaminas, fitohormonas, sacarosa y leche descremada. A partir de la matriz se tomó el inóculo para la inoculación de los sustratos sólidos naturales a evaluar. Se colocaron 200 gramos de cada sustrato crudo en bolsas de polipropileno y se agregó 50 ml de agua potable, posteriormente se sellaron las bolsas con grapas. Las bolsas fueron esterilizadas mediante calor húmedo a 1.5 bar de presión a temperatura de 121°C durante 5 minutos. Una vez esterilizadas y enfriadas las bolsas con los sustratos se procedió a inocular 10 bolsas con cada aislado, depositando 20 ml de suspensión del hongo (Monzón, 2001).

La inoculación de las bolsas se realizó en una cámara de flujo laminar. Después de la inoculación, el sustrato dentro de las bolsas fue homogenizado manualmente para asegurar un crecimiento uniforme del hongo; posteriormente las bolsas fueron colocadas en una sala de incubación con temperaturas aproximada de 24°C en condiciones de oscuridad.

La evaluación del rendimiento, considerado como la cantidad de hongo puro obtenido de cada gramo de sustrato colonizado, se realizó a los 20 días después de la inoculación cuando el sustrato había sido colonizado totalmente por el hongo. De las 10 bolsas de cada aislado, cinco fueron seleccionadas al azar, para realizar el conteo. Para realizar las lecturas se prepararon diluciones en serie (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) y se seleccionó la dilución 10^{-3} para realizar el conteo de conidias.

La primera dilución se preparó tomando un gramo de sustrato colonizado por el hongo y se depositó en un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua destilada estéril, de esa manera y a partir de esta se obtuvieron las demás diluciones. Para homogenizar y separar las conidias del sustrato, los tubos fueron agitados por tres minutos en un vórtex a 2400 rpm. El conteo de conidias se realizó en una cámara de conteo con rayado Neubauer y un microscopio LW-Scientific de 40X.

El rendimiento (No. de esporas/gramo de sustrato) se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \text{Número de conidias observadas} \times \text{factor de camara} \times \text{factor de dilución}$$

4.3. Parasitismo *in vitro* de *Lecanicillium* sp sobre *H. vastatrix*

Para determinar la efectividad de parasitismo de *Lecanicillium* sp sobre las uredosporas de *H. vastatrix* se estableció un bioensayo en condiciones de laboratorio.

El inóculo de *H. vastatrix* se obtuvo de lesiones frescas de roya, raspando con un bisturí en el envés de las hojas en las lesiones de roya y depositando el raspado en un recipiente con agua, preparando posteriormente una concentración de 1×10^4 uredosporas/ml en agua destilada estéril, requerida para el estudio.

El inóculo de *Lecanicillium* sp se obtuvo del crecimiento del hongo en sustrato de arroz, a partir del que se preparó una suspensión de 1×10^5 esporas/ml. La prueba fue realizada en platos Petri de 90 mm, conteniendo Agar-agua al 1.5%, utilizando tres platos para cada aislado de *Lecanicillium* sp. Sobre la superficie del medio se depositaron 5 μ l de la suspensión de uredosporas en cinco puntos previamente delimitados con un marcador. Posteriormente, sobre la suspensión de esporas de *H. vastatrix* se depositó 5 μ l de la suspensión de conidias de

Lecanicillium sp. Una vez establecida la prueba, los platos fueron colocados en una sala a temperatura de 24°C. Las lecturas de germinación de uredosporas de *H. vastatrix* se iniciaron a las 72 horas, observando cinco puntos por plato Petri y revisando como mínimo 50 uredosporas.

La lectura de germinación de conidias de *Lecanicillium* sp se hizo a las 24 horas y se cuantificó como mínimo 200 conidias por cada plato Petri. Para la lectura se usó un microscópico de luz LW-Scientific, objetivo de 40x.

4.4. Parasitismo de *Lecanicillium* sp sobre pústulas de *H. vastatrix* en condiciones de laboratorio

Se estableció un bioensayo en condiciones de laboratorio para determinar la efectividad de parasitismo de *Lecanicillium* sp sobre las pústulas de roya en hojas de café. Se colectaron hojas con pústulas frescas de roya, altamente esporuladas y libres de *Lecanicillium* sp. La ausencia del hiperparásito fue confirmada mediante montajes y observados en el microscopio.

Para evitar el proceso de envejecimiento prematuro de las hojas y mantenerlas turgentes durante 120 horas que duraría el período de evaluación, se colocó en el pecíolo de cada hoja un chupón de algodón impregnado de 3 mililitros de una solución de 6 BAP (Benzyl amino purina) al 2% con pH de 5.8 (Tórrez y Castillo, 2005).

La inoculación de *Leacnicillium* sp sobre las pústulas de roya se realizó por inmersión en una concentración de 1×10^8 conidias/ml. Después de sumergir las hojas con roya en la suspensión de conidias, se dejó reposar por dos minutos, luego las hojas fueron colocadas en cámara húmeda, la que consistía en un recipiente de plástico de 30 cm largo x 18 cm de ancho x 10 cm de profundidad, con una malla de 2.5 cm de altura, sobre la que se colocó diez hojas en cada recipiente que correspondía a cada aislado. Para mantener humedad relativa mayor a 95%, en cada recipiente se depositó 500 ml de agua. Finalmente los recipientes fueron ubicados en una cámara oscura, conformada con plástico negro se cubrió con papel craft humedecido de tal manera que se cubriera todas las panas con plástico negro para asegurar alta humedad. La temperatura del bioensayo osciló entre 17°C y 24°C y una humedad relativa superior a 95% dentro de los recipientes.

Para la evaluación de parasitismo de *Lecanicillium* sp sobre las pústulas, se hicieron observaciones a las 36 horas, tiempo que requiere el hiperparásito para colonizar las uredosporas. Además, se realizaron montajes para observar el micoparasitismo a nivel microscópico.

Para el cálculo del porcentaje de parasitismo se usó la siguiente fórmula (Monzón, 1992):

$$\text{Pústulas parasitadas (\%)} = \frac{\text{No. de pústulas parasitadas}}{\text{No. de pústulas totales}} \times 100$$

4.5. Efecto de aislados de *Lecanicillium* sp sobre la roya en condiciones de campo

El estudio fue realizado en una plantación de café establecida por la cooperativa La Hermandad en el 2007. Los cafetos donde se realizó el ensayo eran de la variedad Caturra, establecido a una distancia de siembra de 1 m entre surcos por 0.5 m entre planta. El cafeto fue establecido en un sistema agroforestal que contemplaba árboles maderables, frutales como mango, naranja usados como sombra permanente y como sombra temporal se usó higuera.

Tratamientos evaluados

Se evaluaron ocho tratamientos correspondientes a los seis aislados de *Lecanicillium* sp, un testigo relativo que consistió en Sulfato de cobre pentahidratado en dosis de 1 onza de producto / 20 litros y un testigo absoluto que fue asperjado con agua (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos aplicados en campo para determinar la efectividad de diferentes aislados de *Lecanicillium* sp sobre *H. vastatrix*.

Tratamientos	Descripción
1	Aislado Jinotega
2	Aislado Mankotal
3	Aislado Majada
4	Aislado La gotera
5	Aislado EL Granadillo
6	Aislado San Ramón
7	Testigo relativo pentahidratado
8	Testigo absoluto

El ensayo fue establecido en un diseño experimental de Bloques Completos al Azar con tres replicas (Anexo 2). El área total del ensayo fue aproximadamente 1 ha. Cada subparcela fue de un área aproximada de 100 m² que contenía 200 plantas aproximadamente.

Los cafetos estaban establecidos con sombra permanente manejados de forma tradicional. Las aplicaciones y toma de datos se realizaron cada 15 días donde se cuantificaron las variables correspondientes.

Se realizaron aplicaciones foliares en horas de la mañana cada 15 días, dirigida al envés de las hojas para lograr una buena efectividad del hiperparásito sobre las pústulas de la roya, ya que el modo de acción de *Lecanicillium* sp es de contacto. Para la aplicación se usó hongo en sustrato de arroz, aproximadamente 200 gramos que contenía una concentración de 5x10⁷ conidias, realizando una pre-mezcla y frotando manualmente el sustrato para desprender las conidias, a partir de la pre-mezcla se preparó la mezcla definitiva, la que fue aplicada con una bomba de mochila de 20 litros, debidamente calibrada.

4.5.1. Metodología de muestreo

En la parcela útil se seleccionaron cinco sitios de muestreo, compuestos de cinco plantas cada uno, para un total de 25 plantas por parcela (Anexo 3). En cada planta se seleccionó al azar dos bandolas, en cada bandola se cuantificó el número de hojas con roya, número de hojas con roya y el número de pústulas parasitadas con *Lecanicillium* sp. Los muestreos se realizaron cada 15 días, iniciando 15 días después de la primera aplicación.

Los porcentajes de incidencia para cada una de las variables se calculó de la siguiente manera (Monzón 1992).

$$\text{Incidencia de roya (\%)} = \frac{\text{No. hojas con roya por bandolas}}{\text{No. total de hojas muestreadas por bandolas}} \times 100$$

$$\text{Incidencia de parasitismo (\%)} = \frac{\text{No. hojas con roya parasitadas por bandolas}}{\text{No. total hojas con roya por bandolas}} \times 100$$

$$\text{Parasitismo sobre pústulas (\%)} = \frac{\text{No. pústulas parasitadas en hojas}}{\text{No. total de pústulas}} \times 100$$

4.5.2. Variables evaluadas

Características microscópicas y macroscópicas de *Lecanicillium* sp

- Tamaño (ancho y largo) y forma de las conidias
- Tamaño de fiálides (ancho de la base)
- Viabilidad de conidias
- Color y forma de colonias de *Lecanicillium* sp
- Crecimiento radial de *Lecanicillium* sp
- Rendimiento de conidias/g

Parasitismo *in vitro* en platos Petri

- Porcentaje de uredosporas parasitadas
- Deformación y degradación de uredosporas

Parasitismo en hojas en laboratorio

- Porcentaje de pústulas parasitadas con *Lecanicillium* sp

Incidencia de roya, parasitismo en hojas y pústulas en condiciones de campo

- Incidencia de roya
- Parasitismo de *Lecanicillium* sp sobre roya
- Porcentaje de pústulas de roya parasitadas con *Lecanicillium* sp

4.5.3. Análisis de los datos

Los datos fueron organizados en una base de datos usando el software Microsoft Excel y luego algunas variables fueron analizadas mediante el programa de análisis estadístico SAS versión 9.1, otras variables fueron analizadas mediante el programa estadístico Infostat Versión 2016e.

La viabilidad, concentración de conidias, parasitismo *in vitro* sobre uredosporas en platos Petri y crecimiento radial fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANDEVA) con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$, para la separación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($p= 0,05$).

El parasitismo en hojas en condiciones de laboratorio de *Lecanicillium* sp sobre *H. vastatrix* fue analizado mediante un análisis de varianza no paramétrico Kruskal Wallis.

Las características microscópicas (morfométrica) y macroscópicas de *Lecanicillium* sp fueron analizadas de forma descriptiva.

Los datos de incidencia de roya, parasitismo de *Lecanicillium* sp sobre roya, parasitismo en hojas y parasitismo en pústulas fueron analizados de acuerdo con el diseño utilizado (BCA) mediante un análisis de varianza (ANDEVA) con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$. Cuando correspondía se utilizó la separación de medias mediante la prueba de Tukey ($p=0,05$).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se colectó un total de 20 muestras, de las que se obtuvieron seis aislados de *Lecanicillium sp*, los que fueron sometidos a todas las pruebas realizadas en el estudio (Cuadro 1). Todos los aislados fueron obtenidos de plantas de café, estos materiales genéticos son considerados aislados nativos debido a que no se habían realizados aplicaciones comerciales a base de *Lecanicillium sp*.

5.1. Características microscópicas y macroscópicas de *Lecanicillium sp*

Características microscópicas

En general todos los aislados de *Lecanicillium sp* presentaron características microscópicas similares en los tres medios evaluados EMA, SDA y PDA. El tamaño de las conidias fue similar, oscilando entre 2.5 y 7.5 μ de largo y de 1.5 a 2 μ de ancho, con presencia de conidias en el extremo de las fiálides en forma de cabezuelas o solitarias, de color hialinas y de formas cilíndricas o elipsoidales (Figura 1).

El tamaño de las fiálides osciló de 20 a 28 μ con un ancho de base de 2.5 μ y se adelgaza en el extremo en una especie de punta muy pequeña; se encontraron fiálides solitarias o en verticilos originados en conidióforos rectos, las conidias generalmente en grupos de dos a seis, algunas veces solitarias (Figura 1).

Icochea (2004) describe fiálides (células conidiógenas) erectas, anchos en la base y terminan en una punta delgada por donde salen las conidias, generalmente en grupos de dos a seis, aunque también algunos miden 11 a 30 μ de largo x 1.5 a 2 μ de diámetro, son ligeramente anchos en la base y van adelgazando hacia la punta; salen del extremo de las fiálides en grupos formando cabezuelas, las conidias elipsoidales de 2 a 4 x 1 a 1.5 μ . fiálides solitarias o en verticilos originados en conidióforos rectos. Así mismo Zare y Gams (2001) describen fiálides de células conidiógenas relativamente cortas de 11-20(30) x 1.4-1.8 μ , aglomeradas y fuertemente afiladas, producidas individualmente o en espirales de hasta 6 directamente en las hifas postradas, o en conidióforos cortos, erectos a veces también producidos secundariamente en fiálides anteriores.

Conidias formados en las cabezas en el ápice de las fiálides, típicamente de forma elipsoidal corta que va de 2.5 - 3.5 (4.2) x 1- 1.5 μ .

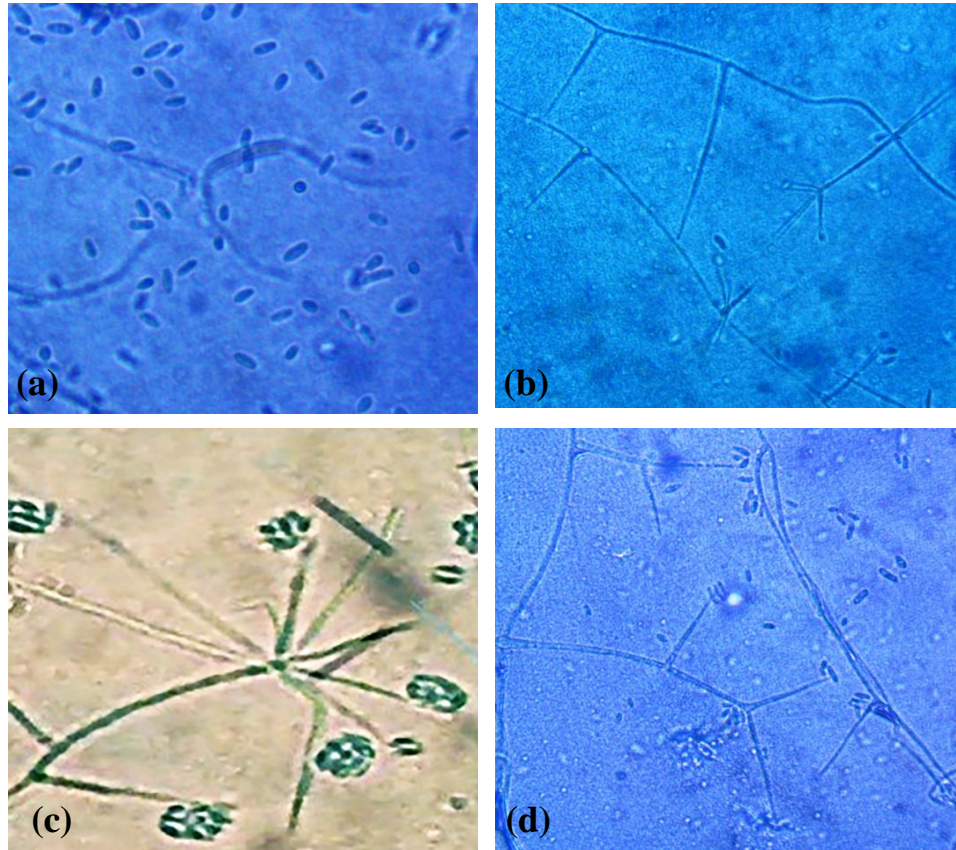


Figura 1. Estructuras reproductivas de *Lecanicillium* sp. Conidias de forma cilíndricas, elipsoidales y redondeadas (a). Conidióforos verticiliado con fialides y conidias solitarias (b). Conidióforo verticiliado con fiálides y conidias en racimos (c). Fialides solitarias con conidias en racimos (d).

Viabilidad de conidias

La viabilidad de conidias de los aislados de *Lecanicillium* sp osciló entre 71.4% y 99.7%. La mayor viabilidad se registró en el aislado Majada a las 22 horas después de haber establecido la prueba.

El análisis de varianza realizado para viabilidad de conidias determinó diferencias significativas entre las diferentes horas de evaluación ($p < 0.0001$), entre aislados ($p < 0.001$), así mismo la interacción hora x aislado resultó significativa ($p < 0.0001$), lo que indica que la viabilidad de

los aislados del hongo depende de la hora en que se realizaron las lecturas, es decir que el aislado que presentó la mayor viabilidad de conidias en una determinada hora no fue el mismo en otra hora (Anexo 4), por lo que para comprobar que aislado presentó la mayor viabilidad de conidias en cada hora, se procedió a realizar un análisis de varianza para cada momento de evaluación y determinar el comportamiento de los aislados.

El ANDEVA realizado para los datos en las diferentes horas indican que hay diferencias significativas entre los diferentes aislados a las 16 ($p < 0.0001$), 18 ($p < 0.0001$) y 22 horas ($p < 0.0001$).

El porcentaje promedio de viabilidad a las 16 horas fue de 83%, siendo el aislado Majada el que presentó el mayor porcentaje de viabilidad con 89.2%. Los aislados San Ramón, La gotera, El Granadillo en este período de muestreo resultaron ser estadísticamente similares al aislado Majada, en cambio el aislados Jinotega fue el que presentó la menor viabilidad 71.4% (Cuadro 2).

A las 18 horas el porcentaje promedio de viabilidad fue de 93%. El aislado San Ramón presentó la mayor viabilidad de 98%. Los aislados Majada, La Gotera, El Granadillo y Jinotega fueron estadísticamente similares al aislado San Ramón, en cambio el aislado Mankotal fue el que presentó el menor porcentaje de viabilidad de 87% (Cuadro 3).

El porcentaje promedio de viabilidad a las 22 horas fue de 96%. El aislado Majada fue el que presentó el mayor porcentaje de viabilidad con 100% (Cuadro 3). La mayoría de los aislados presentaron un alto porcentaje de germinación a las 22 horas superior a 95%. Debido a estos resultados todos los aislados presentan características adecuadas en términos de viabilidad, ya que este parámetro es determinante para la reproducción masiva según Monzón (2001).

Los resultados obtenidos en la prueba de viabilidad de conidias de diferentes aislados de *Lecanicillium* sp, demuestran que la viabilidad de conidias tiene una tendencia a incrementar a medida que pasan las horas, en cada fecha los aislados presentaron una viabilidad que varió de una fecha a otra; es decir que las que fueron mejores a las 18 horas no necesariamente fueron mejores a las 22 horas en su germinación (Cuadro 3).

La mayoría de los aislados presentaron una germinación cercana al 100%, una germinación rápida ayuda a disminuir el tiempo de exposición a condiciones ambientales y lograr un rápido efecto sobre la plaga (Malpartida *et al.*, 2013). La efectividad del hongo en el campo depende de la capacidad que este tiene de colonizar un sustrato y de infectar al su huésped, lo que a su vez está determinado por su viabilidad (Monzón, 2001). Por esta razón la determinación de esta característica es importante en la selección de cepas en el control biológico, entre mayor sea la viabilidad en un menor tiempo en condiciones de laboratorio se presume que presentará mejor adaptabilidad a las condiciones ambientales y mejor efectividad sobre el hospedero, asimismo, Steinkraus (2006) sugiere que la viabilidad está relacionada con la capacidad de propagarse dentro de una población huésped y determina su potencial como agente de control microbiano.

Cuadro 3. Porcentaje de viabilidad de conidias de aislados de *Lecanicillium* sp en tres fechas de muestreo mediante prueba de Tukey.

Aislados	Periodos de muestreo		
	16 horas	18 horas	22 horas
Majada	89 A	95 A	100 A
San Ramón	89 A	98 A	97 A
La gotera	89 A	94 A	98 A
El Granadillo	87 A	93 A	98 A
Mankotal	76 B	87 B	92 B
Jinotega	71 B	90 A	91 C
Promedio	83	93	96

Medias con letras iguales, en una misma columna, no difieren significativamente según Tukey ($p \leq 0,05$).

Características macroscópicas (color y forma de colonias)

Todos los aislados presentaron características macroscópicas similares. El crecimiento de las colonias de los aislados fue de color blanco hueso, con una apariencia algodonosa, además las colonias presentaron mayor crecimiento vertical en la parte superior debido al abundante micelio, en la parte inferior del plato se observó un arrugamiento o estrillas en el medio durante su crecimiento.

Estudio realizado por González (2001) encontró resultados similares donde describe que *Lecanicillium* sp presenta colonias color blanco cremoso, con estrías en el reverso y colonias algodonosas, esta es una característica propia de este hongo el cual produce una compactación

en toda la colonia que hace difícil de desprender su micelio. En nuestro estudio el arrugamiento del hongo se observó mayormente en los medios de cultivos SDA y EMA. En el medio de cultivo PDA el crecimiento de las colonias de los aislados presentaron la misma coloración blanco hueso, pero presentaron poco crecimiento vertical y poco algodonosa, además se observó un crecimiento anillado círculos espaciados concéntricos ya que las hifas buscan un mejor aprovechamiento de los nutrientes, adhesión y desimanación sobre el medio nutritivo (Argueta, 2011).

Es importante mencionar que todos los aislados de *Lecanicillium* sp presentaron colonias algodonosas, pero no polvorientas, debido a que este hongo su micelio y sus conidas se adhiere fuerte al medio de cultivo, esto se observó en los tres medios evaluados (Figura 2).

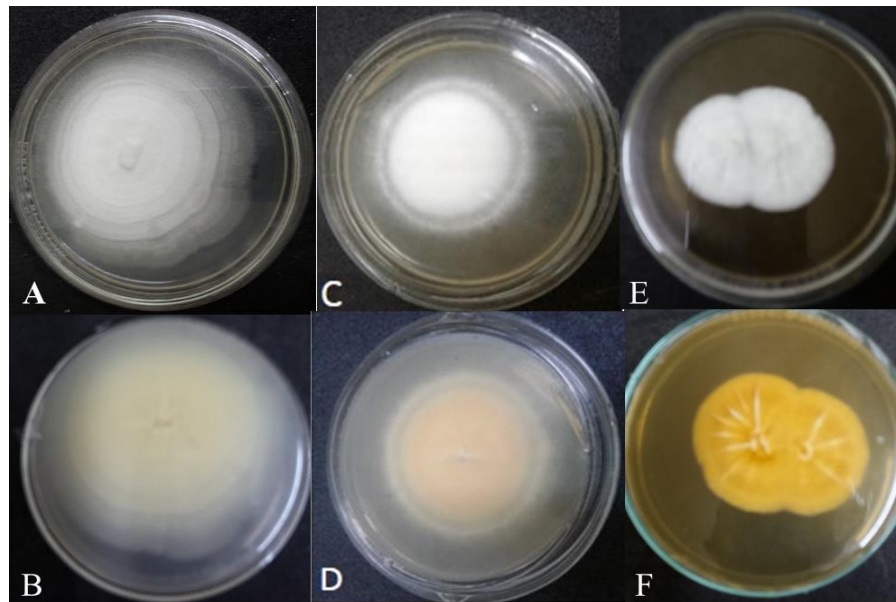


Figura 2. Colonias de *Lecanicillium* sp en diferentes medios de cultivo. Medio de cultivo PDA. Vista frontal (A) vista posterior (B). Medio de cultivo SDA vista frontal (C), vista posterior (D), Medio de cultivo de EMA vista frontal (D) vista posterior (F).

Crecimiento radial promedio de *Lecanicillium* sp

En general todos los aislados nativos de *Lecanicillium* sp lograron crecimiento en los medios de cultivo evaluados. Según Hall (1984) el hongo *L. lecanii* se desarrolla bien en casi cualquier medio de cultivo. En nuestro estudio el medio de cultivo PDA fue donde se registraron los

mayores valores de crecimiento, seguido por el medio de cultivo SDA, los menores valores de crecimiento se registraron en el medio de cultivo EMA (Figura 3).

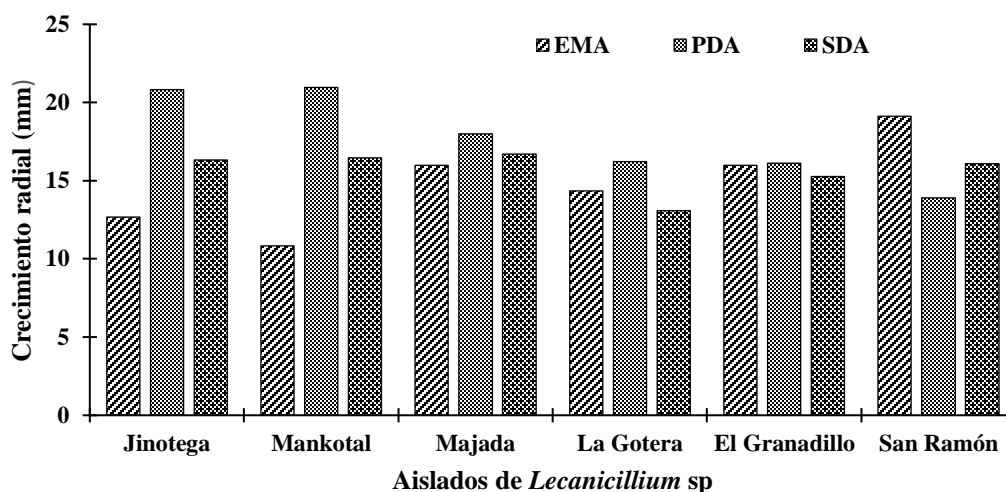


Figura 3. Crecimiento radial de aislados de *Lecanicillium* sp a los 20 días después de inoculación, en tres medios de cultivo, a 24°C, con 10 horas luz y 14 horas de oscuridad.

El crecimiento radial promedio alcanzado por los aislados de *Lecanicillium* sp a los 20 días posteriores a la inoculación fue de 18 mm en PDA, de 15 mm en EMA y de 16 mm en SDA (Figura 3), estos resultados son similares con estudios reportados por Zare y Gams (2001), quienes describen que este hongo presenta un crecimiento de colonias que alcanzan 15 a 25 mm de diámetro en 10 días a 24°C en medio de cultivo PDA.

El análisis de varianza para el medio de cultivo EMA indica que el crecimiento radial difiere significativamente entre períodos de evaluación ($p < 0.0001$); también indica que hay diferencias significativas ($p < 0.0001$) entre los aislados. Además, indica que la interacción Tiempo*Aislado es significativa ($p = 0.002$). Este mismo resultado se encontró en el medio de cultivo PDA (Anexo 5 y 6).

En el medio de cultivo SDA, el crecimiento radial de *Lecanicillium* sp resultó significativo para el factor período de evaluación ($p < 0.0001$) y el factor aislado ($p < 0.0001$), pero no para la

interacción, indicando que el efecto del aislado sobre el crecimiento radial es independiente del efecto del período de evaluación.

Los resultados significativos de la interacción entre los dos factores en estudio (aislados y períodos de evaluación) para el crecimiento radial de *Lecanicillium* sp, en EMA y PDA, indican que el comportamiento del crecimiento radial de los aislados varía significativamente a través del tiempo en cada aislado, es decir que en algunos períodos unos aislados resultan con mayor crecimiento radial, pero en otros son superados por otros aislados.

Debido a que los resultados significativos de la interacción entre los aislados y los períodos de evaluación, para los medios de cultivo EMA y PDA, indican que el crecimiento radial de los aislados varía significativamente a través del tiempo en cada aislado, se procedió a realizar un análisis de varianza para comparar el crecimiento radial de los aislados en cada período de evaluación.

Crecimiento radial de aislados de *Lecanicillium* sp en EMA

En Extracto de Malta Agar, el aislado San Ramón fue el que presentó mayor ritmo de crecimiento en la mayoría de los períodos de evaluación, en cambio el aislado Mankotal fue el que registró un menor crecimiento radial en todos los períodos de evaluación, excepto a las 48 y 96 horas después de la inoculación.

El análisis de varianza realizado para las diferentes fechas indica que hay diferencias en el crecimiento radial entre aislados a las 48 ($p < 0.0001$), 96 ($p < 0.0259$), 192 ($p < 0.0001$), 240 ($p < 0.0039$) y 336 horas ($p < 0.0002$).

A las 48 horas después la inoculación en el medio de cultivo EMA el crecimiento radial osciló entre 0.31 mm y 3.16 mm. El aislado San Ramón fue el que registró el mayor crecimiento con 3.6 mm, en cambio el aislado El granadillo registró el menor crecimiento radial con 2.6 mm, en este mismo período, se observó el mayor crecimiento radial de todos los aislados.

En los tres últimos períodos de evaluación no existe diferencias estadísticas en el crecimiento radial de los aislados es posible entren en un periodo de bajo metabolismo, que pudiera permitirle al hongo desarrolle estrategias de sobrevivencia. Milner *et al.* (1991) afirma que es

posible que algunos aislamientos entren en un tipo de dormancia fisiológica, lo que les permitiría sobrevivir por períodos prolongados en el campo fuera del hospedante y darle mejores características de adaptabilidad, mejor desempeño como controlador biológico.

Todos los aislados presentaron el mismo patrón de crecimiento a través del tiempo. A las 480 horas la mayoría de los aislados registraron crecimientos menores a 1 mm (Figura 4). El crecimiento radial en este medio de cultivo fue menor en la mayoría de las fechas evaluadas en comparación a los obtenidos en el PDA; el crecimiento radial está determinado por diversos factores como: pH, relación N/C, así como otros valores nutricionales de los medios de cultivo. El medio de cultivo EMA posee un pH de 4.7 ± 0.2 . Quizás en este medio de cultivo podría desfavorecer el crecimiento del micelio de los aislados de *Lecanicillium* sp. Pereira *et al.* (2007) afirman que la variación de pH en el medio de cultivo es determinante en el comportamiento de las especies de hongos. Estudios por realizados López y Carbonell (1999) confirman estos hallazgos donde *V. lecanii* crece mejor a pH cercano a 7 que a pH 3.

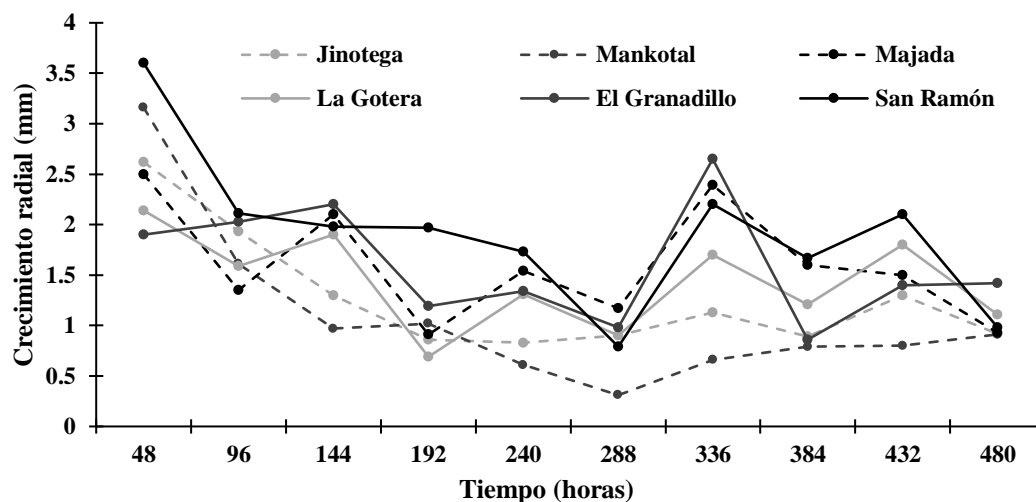


Figura 4. Crecimiento radial (mm) de diferentes aislados de *Lecanicillium* sp en diferentes horas en medio de cultivo Extracto de Malta Agar.

Crecimiento radial de aislados de *Lecanicillium* sp en PDA

El análisis de varianza para el crecimiento de los aislados en el medio de cultivo PDA indica que existen diferencias significativas a las 48 ($p < 0.0001$), 192 ($p < 0.0001$), 384 horas después de la inoculación ($p < 0.0083$).

En PDA, los valores del crecimiento radial de los diferentes aislados de *Lecanicillium* sp oscilaron entre 0.71 mm y 2.98 mm. El aislado Majada presentó el mayor crecimiento radial a las 336 horas, en cambio el aislado San Ramón presentó el menor crecimiento radial a las 288 horas. El aislado Mankotal presentó el mejor crecimiento en la mayoría de los periodos de muestreo, en cambio el aislado San Ramón presentó el menor crecimiento radial en la mayoría de los periodos de muestreo (Figura 5).

PDA es un medio de cultivo la mayoría de los aislados presentaron un patrón de crecimiento similar en el tiempo con menor variabilidad en comparación a lo encontrado en el medio de cultivo EMA, sin embargo, el crecimiento radial en medio de cultivo PDA fueron mayores en la mayoría de los periodos de muestreo. El medio de cultivo Papa Dextrosa Agar posee un pH de 5.6 ± 0.2 lo que podría permitir que los aislados tengan un crecimiento radial se vean favorecidos y además presenten un crecimiento bastante uniforme.

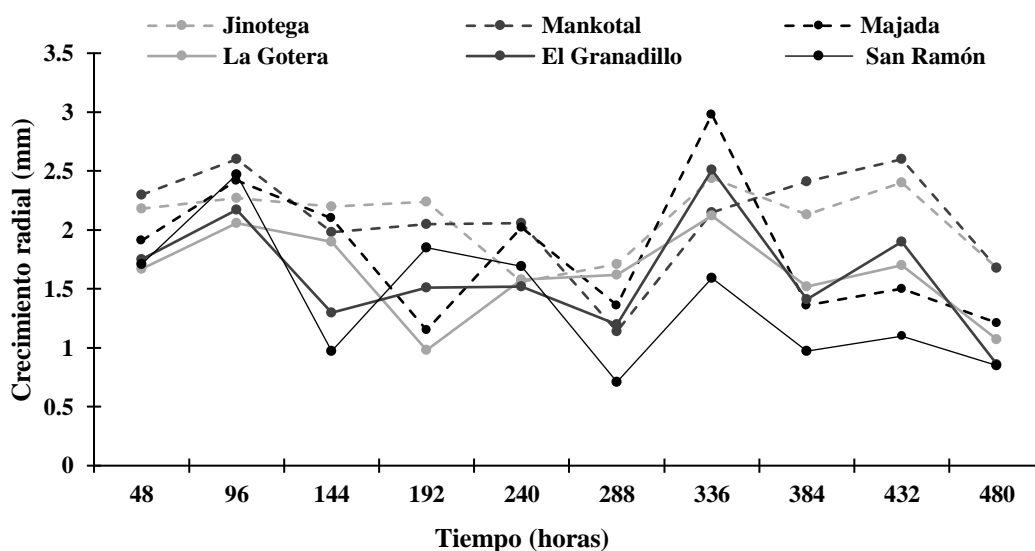


Figura 5. Crecimiento radial (mm) de diferentes aislados de *Lecanicillium* sp en diferentes horas en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar.

Espinosa y Vallejos. (2016) comparando diferentes medios de cultivos, encontraron que la mayor velocidad promedio de crecimiento radial de *Beauveria bassiana* se presenta en el medio de cultivo PDA; en nuestro estudio se encontró la misma particularidad cuando se compararon diferentes medios de cultivo con diferentes aislados nativos de *Lecanicillium* sp encontrando que el mayor crecimiento se registró en el medio de cultivo PDA. Algunos medios de cultivos podrían estimular el crecimiento de los hongos e influir además en algunas características fisiológicas como viabilidad y esporulación. Pereira *et al.* (2007) indican que la variación de pH en el medio de cultivo es determinante en el comportamiento de las especies de hongos. La demanda de un nutriente particular, con frecuencia varía no solo dentro de una sola especie, sino también para cepas individuales de una especie (Iskandarov *et al.*, 2004).

Crecimiento radial de aislados de *Lecanicillium* sp en SDA

El crecimiento radial de *Lecanicillium* sp resultó significativo para el factor período de evaluación ($p < 0.0001$) y el factor aislado ($p < 0.0001$), sin embargo, la interacción entre ambos factores no fue significativa, lo que indica que el efecto del aislado sobre el crecimiento radial es independiente del efecto del período de evaluación.

El crecimiento radial osciló entre 0.9 mm y 2.6 mm. El aislado Mankotal presentó el mayor promedio de crecimiento radial a las 336 horas, en cambio el aislado San Ramón presentó el menor crecimiento radial de 0.9 mm a las 48 horas (Figura 6).

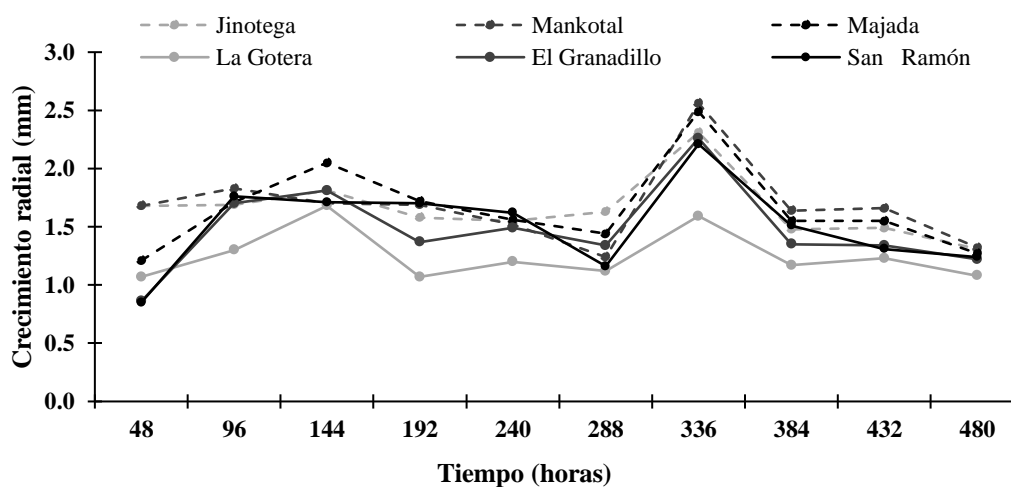


Figura 6. Crecimiento radial (mm) de diferentes aislados de *Lecanicillium* sp en diferentes horas en medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar.

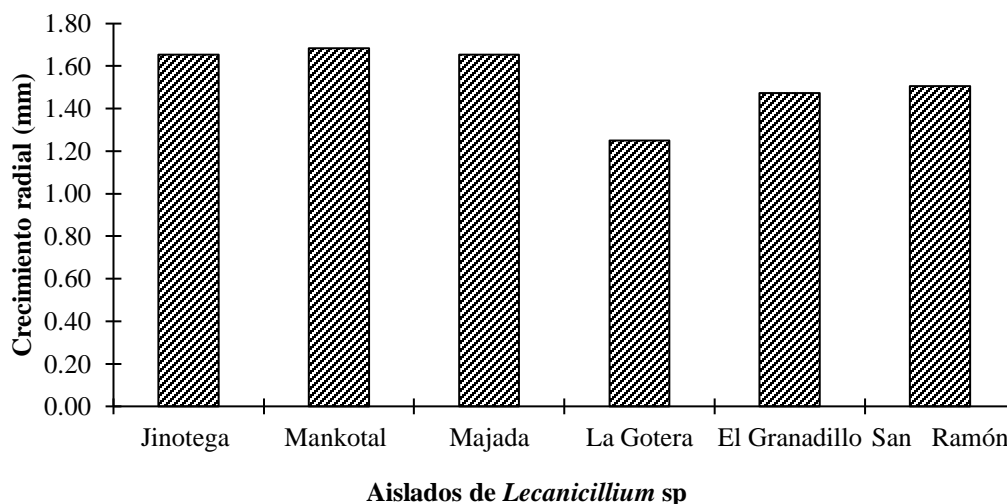


Figura 7. Crecimiento radial de aislados de *Lecanicillium* sp cada 48, en medios de cultivo SDA, a 24°C, con 10 horas luz y 14 horas de oscuridad.

Los resultados obtenidos demuestran que los todos los aislados presentan un crecimiento radial similar este el medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar (Figura 7), sin embargo el mayor crecimiento radial lo obtuvo el aislado Mankotal. Es importante recalcar que en este medio de cultivo se observaron crecimientos bastante uniformes en comparación a los obtenidos en el EMA y PDA. Referente a este hallazgo Fatiha *et al.* (2007) citado por Retamal (2008) indican que el medio de cultivo en el cual crece y esporula mejor *L. Lecanii* es Sabouraud Dextrosa Agar, siendo este uno de los medios de cultivo más utilizados por los patólogos de insectos.

5.2. Potencial de producción masiva

En general los resultados en este estudio mostraron que los sustratos orgánicos a base de soya y arroz fueron los que presentaron los mejores resultados en comparación al sustrato a base de sorgo. Todos los aislados nativos de *Lecanicillium* sp lograron crecer, pero con diferentes rendimientos, algunos sustratos favorecieron a algunos aislados en la multiplicación del hongo en cambio esos mismos aislados no se vieron favorecido en otro sustrato orgánico.

El análisis del rendimiento en número de conidias por gramo de sustrato, indica que hubo diferencias significativas entre sustratos ($p < 0.0001$), entre aislados ($p < 0.0039$) y además la

interacción aislado*sustrato resultó significativa ($p < 0.0001$) lo que indica que el tipo de sustrato influye de diferente manera sobre la multiplicación del hongo de cada aislado (Anexo 7). Debido a estos resultados se procedió a realizar un análisis de varianza para cada sustrato con cada uno de los aislados para determinar el comportamiento en términos de rendimientos de cada aislado.

5.2.1. Rendimiento de aislados de *Lecanicillium* sp en sustrato a base de soja

Todos los aislados de *Lecanicillium* sp lograron tener crecimiento esporulación muy variable en sustrato a base de soja, algunos aislados se vieron favorecidos en la multiplicación. El análisis de varianza determinó diferencias significativas en el rendimiento en el número de conidias por gramo en sustrato a base de soja (Anexo 8), lo que indica que cada aislado tiene ciertas características muy particulares en la multiplicación ($p < 0.0002$).

El aislado La Gotera presentó el mayor rendimiento con $1.08E+09$ conidias por gramo en sustrato, en cambio el aislado el aislado Mankotal presentó el menor rendimiento con $1.90E+08$ conidias por gramo. Los aislados Majada, Jinotega, Granadillo y San Ramón presentaron rendimiento intermedio similares entre $7.42E+08$ y $4.21E+08$ conidias por gramo en sustrato (Figura 8).

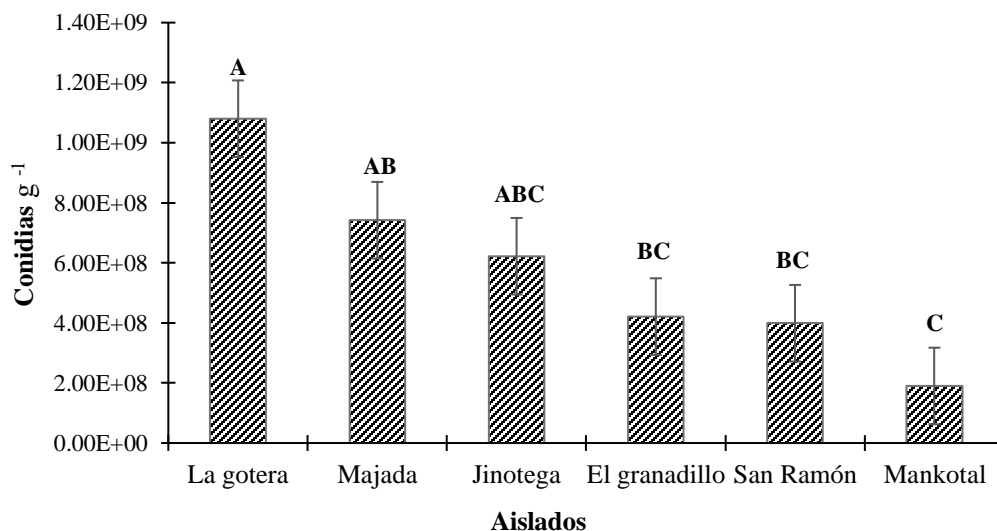


Figura 8. Rendimiento promedio de aislados nativos de *Lecanicillium* sp a los 20 días incubación en el sustrato a base soja. Líneas sobre las barras indican el error estándar.

El aislado La Gotera se destaca sobre los demás este sustrato posiblemente existe cierta especificidad entre el material vegetativo y características genéticas del aislado, este sustrato proporciona mejores condiciones nutricionales en relación Carbono/Nitrógeno y otros elementos esenciales para su multiplicación.

Para considerar un sustrato como idóneo para la producción masiva debe estimular una alta concentración de conidias y capacidad para mantener la virulencia de la cepa de un entomopatógeno (Cortez, 2007). De igual manera Roberts y Yendol (1971) sostienen que un sustrato con buenos atributos para fines de la producción de conidias de una cepa de un hongo entomopatógeno debe tomarse en cuenta su bajo costo, fácil adquisición. En nuestro estudio este sustrato de soya a pesar de que se obtuvo buena producción de conidias y poseer bajo costo, este sustrato no posee buena capacidad de absorber la humedad en la preparación del sustrato ni en el periodo de incubación lo que dificulta su manejo, por esta razón este sustrato muy susceptible a contaminación bacteriana.

Cortez (2007) afirma que la producción conidial varía de acuerdo con el sustrato utilizado para su reproducción, además sostiene que el hongo *L. lecanii* produce mayor cantidad de conidias cuando se cultiva en sustratos que le permiten una mayor aireación, sin embargo, en los resultados obtenidos en este estudio se pudo observar que para obtener mayor producción de conidias es necesario también que el sustrato posea buenos valores nutricionales. Por tal razón podemos decir que los valores nutricionales de un sustrato es un factor determinante para obtener mayor número de conidias. Volcy y Pardo (1994), quienes mencionan que un buen sustrato para la producción de conidias debe poseer un alto contenido de carbohidratos, nitrógeno, microelementos, vitaminas del complejo B y una concentración alta de iones necesarios para el crecimiento y esporulación.

5.2.2. Rendimiento de aislados de *Lecanicillium* sp en sustrato de arroz

Todos los aislados nativos de *Lecanicillium* sp lograron crecer, pero con diferentes rendimientos, algunos sustratos favorecieron a algunos aislados en la multiplicación del hongo en cambio esos mismos aislados no se vieron favorecido en otro sustrato orgánico.

El análisis de varianza determinó diferencias significativas en el rendimiento en el número de conidias por gramo en sustrato a base de arroz ($p: 0.0337$), lo que indica que cada aislado tiene ciertas características muy particulares en la multiplicación (Anexo 8).

Todos los aislados presentaron rendimientos muy variables. El aislado San Ramón presentó el mayor rendimiento conidias por gramo en sustrato $5.95E+08$, los aislados Jinotega, Majada y Mankotal fueron estadísticamente similares al aislado San Ramón, en cambio los aislados El Granadillo y La Gotera presentaron menor rendimiento con $2.35E+08$ y $2.14E+08$ conidias por gramo (Figura 9).

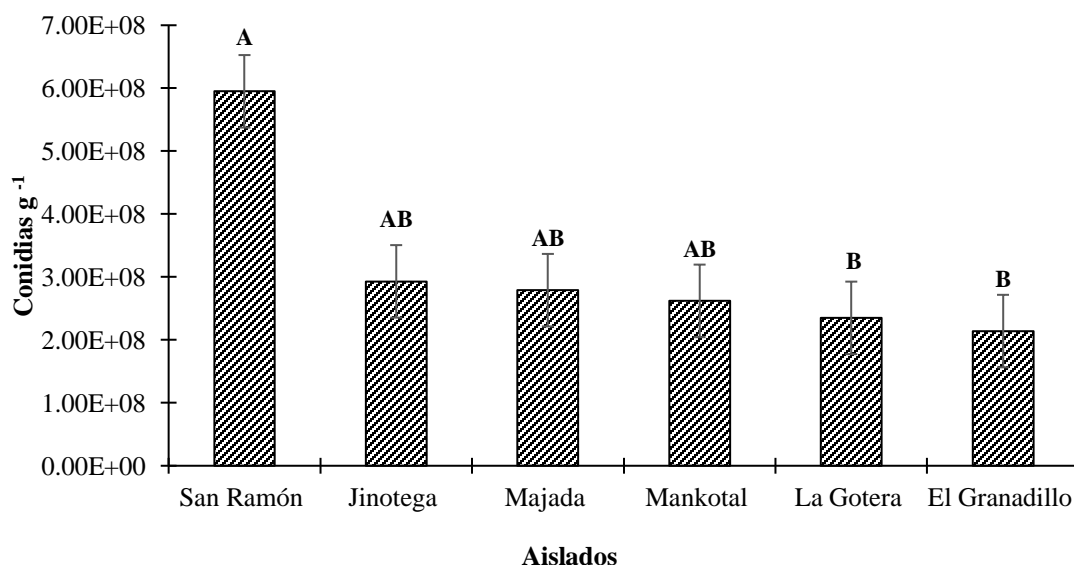


Figura 9. Rendimiento promedio de aislados nativos de *Lecanicillium* sp a los 20 días incubación en el sustrato a base arroz. Líneas sobre las barras indican el error estándar.

En este estudio se observó que este sustrato de arroz absorbe eficientemente la humedad en el proceso, además presenta una adecuada aireación, sin embargo, se observó que el crecimiento en el sustrato crece de una manera compacta que dificulta la separación de las conidias y afecta de una manera sustancial su rendimiento. En algunos hongos como *Lecanicillium lecanii*, la cantidad de conidias puede disminuir debido la alta compactación que ejerce el hongo sobre el arroz, lo que evita aireación interna y reducción de la producción conidial (Cortez, 2007).

Existen características muy importantes para usar determinado sustrato para la reproducción masiva, una de ellas es que tengan facilidad de separación de conidias al momento de la cosecha y otra que debe presentar buena consistencia del sustrato en todo el proceso de reproducción masiva.

5.2.3. Rendimiento de aislados de *Lecanicillium* sp en sustrato a base de sorgo

En general todos los aislados lograron tener crecimiento y esporulación muy variable en sustrato orgánico a base de sorgo, algunos aislados se vieron favorecidos la multiplicación de algunos aislados, en cambio esos mismos aislados no se vieron favorecidos en otro sustrato orgánico evaluado.

El ANDEVA indica que hay diferencias significativas entre las aislados evaluados ($p:0.001$) (Anexo 9). Las aislados con los mayores rendimientos fueron Mankotal $3.29E+08$ y San Ramón $2.83E+08$, en cambio el aislado Majada presentó rendimiento intermedio de $1.74E+08$ conidias por gramo en sustrato, en tanto las aislados la Gotera, Jinotega y El Granadillo presentaron rendimientos por debajo de la producción media de las aislados evaluadas con valores de $6.90E+07$, $6.60E+07$, $5.70E+07$ respectivamente (Figura 10).

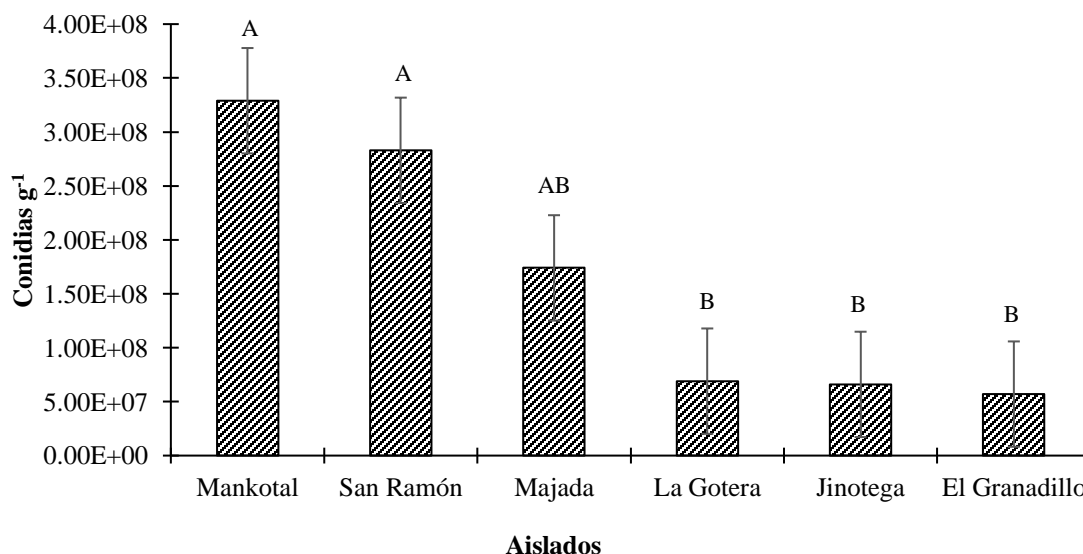


Figura 10. Rendimiento promedio de aislados nativos de *Lecanicillium* sp a los 20 días incubación en el sustrato a base sorgo. Líneas sobre las barras indican el error estándar.

Aceves (2008) mediante un análisis químico proximal a diferentes sustratos orgánicos para la reproducción masiva demostró que existe correlación entre los valores nutricionales y la producción de esporas. Por lo anterior Figueroa *et al.* (2007) sostienen que el rendimiento de la esporulación sobre un sustrato también puede ser influenciado por factores como la técnica de cultivo, concentración del inóculo inicial, condiciones de temperatura, humedad, aireación, y tiempo de incubación. En nuestro estudio también se pudo observar que este sustrato presentó deficiencia en cuanto a la absorción de humedad durante en proceso de producción lo que genera mayor tiempo secado siendo algo tedioso para su uso en la reproducción masiva de hongos por tales razones el uso de este sustrato no se recomienda para tales fines, además porque existe un potencial riesgo de contaminación bacteriana según lo observado.

5.3. Parasitismo de *Lecanicillium* sp en condiciones *in vitro*

Todos los aislados causaron parasitismo a las uredosporas de *H. vastatrix* a excepción del aislado Majada y el testigo mientras duro el ensayo. El análisis de varianza realizado para parasitismo *in vitro* de diferentes aislados de *Lecanicillium* sp sobre las uredosporas de *H. vastatrix*, determinó diferencias estadísticas significativas entre los aislados (p:0.0014), lo que indica que cada aislado presenta diferentes grados de parasitismo sobre las uredosporas.

El porcentaje de parasitismo osciló entre 16.6% y 2.36%, siendo el aislado Jinotega en que presentó el mayor porcentaje de parasitismo. Los aislados La Gotera, El Granadillo y San Ramón fueron estadísticamente similares al aislado Jinotega, en cambio el aislado Mankotal presentó el menor porcentaje de parasitismo de 2.36%, así mismo el testigo no presentó parasitismo cómo se esperaba (Cuadro 4).

Cuadro 4. Parasitismo *in vitro* de aislados nativos de *Lecanicillium* sp sobre uredosporas de *H. vastatrix*.

Aislados	Porcentaje de parasitismo	Categorías Tukey (0.05)
Jinotega	16.61	A
La Gotera	15.37	AB
El Granadillo	6.39	ABC
San Ramón	2.74	ABC
Mankotal	2.36	BC
Majada	0.00	C
Testigo	0.00	C

Medias con letras en común, dentro de una misma columna no difieren significativamente según Tukey($p \leq 0,05$).

El aislado Majada y el testigo no presentaron parasitismo mientras duró el tiempo de evaluación del bioensayo. En el caso del aislado Majada que no logró parasitar ninguna uredosporas, fue quizás porque no logró encontrar ninguna uredosporas en su trayectoria de crecimiento según se observó en el seguimiento a nivel microscópico. En nuestro estudio, las pruebas realizadas a los diferentes aislados nativos de *Lecanicillium* mostraron diferentes grados de parasitismo. González (2001) obtuvo resultados similares donde encontró diferentes grados de parasitismo sobre las uredosporas de *H. vastatrix*.

El parasitismo *in vitro* fue evidenciado a las 72 horas después de la inoculación de las conidias de *Lecanicillium* sp sobre las uredosporas de roya se pudo observar a través del microscopio de luz una destrucción de la pared celular de las uredosporas (Figura 11).

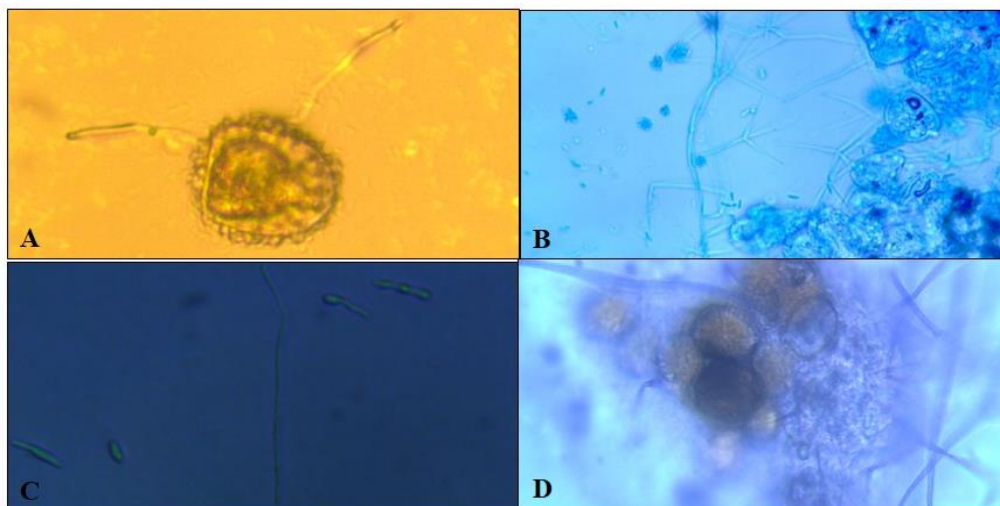


Figura 11. Prueba de parasitismo *in vitro*. Espora no germinada de *H. vastatrix* (A). Estructuras de *Lecanicillium* sp conidióforos verticilados que emergen de las uredosporas de *H. vastatrix* (B). Conidia germinada de *Lecanicillium* sp (C). Interacción entre *Lecanicillium* sp y *H. vastatrix* desintegración de uredosporas (D).

En el tiempo de evaluación no se logró observar ninguna uredosporas germinada cuando se añadió la suspensión de conidas de *Lecanicillium* sp, este mismo fenómeno de inhibición de germinación de uredosporas de *H. vastatrix* ocurrió en un estudio realizado por Eskes (1987) quien determinó que además de ser micoparásito de *H. vastatrix* era también inhibidor de la germinación de las uredosporas.

5.4. Parasitismo *in vitro* de *Lecanicillium* sp sobre pústulas de *H. vastatrix*

El porcentaje de parasitismo causado por los aislados nativos de *Lecanicillium* sp sobre las pústulas de roya en hojas en condiciones de laboratorio osciló entre 88.33 y 66.43a las 72 horas después haber establecido la prueba. En este mismo periodo de evaluación no se observó parasitismo en el testigo (Cuadro 5).

El análisis de varianza no paramétrica (Kruskal Wallis) para el parasitismo *in vitro* de *Lecanicillium* sp sobre las uredosporas de *H. vastatrix* en hojas encontró diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ($p:0.0001$), es decir que todas los aislados causaron parasitismo en las pústulas de *H. vastatrix*. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas dentro de las aislados evaluados mientras duro el periodo de evaluación ,es decir

que todos los aislados se comportaron de una manera similar sobre el parasitismo en hojas .
(Cuadro 5).

Cuadro 5. Medias comparativas del parasitismo *in vitro* de aislados nativos de *Lecanicillium* sp sobre pústulas de *H. vastatrix*.

Aislados	Parasitismo %	Categorías
Testigo	0.00	A
Mankotal	66.43	B
Majada	70.08	B
San Ramón	71.95	B
Jinotega	78.75	B
El Granadillo	86.48	B
La Gotera	88.33	B

Medias con letras en común, dentro de una misma columna no difieren significativamente según Tukey($p \leq 0,05$).

Los porcentajes del parasitismo de los aislados nativos de *Lecanicillium* sp son altos en este estudio, los valores fluctuaron entre 88.33 y 66.43%. González (2001) encontró porcentajes de parasitismo similares sobre los soros de *H. vastatrix* y redujo a 0% la germinación de las uredosporas y alcanzó un 81.03% de parasitismo. En este estudio la cuantificación del parasitismo sobre pústulas fue mediante la observación visual y se consideró como pústula parasitada aquella que presentara micelio blanquecino. Mahfud *et al.* (2006) señalan que los efectos de algunas especies de este género producen una decoloración de uredosporas, formación de micelio blanco sobre ellas o necrosamiento, dependiendo el tiempo de evaluación.

Los hallazgos encontrados en este estudio en condiciones de laboratorio podrían ser de mucha utilidad y de mucha importancia. Los aislados colectados causan parasitismo al patógeno, además se demostró que los aislados presentan diferentes grados de parasitismo sobre las uredosporas de *Hemlieia vastatrix*. Estos resultados podrían motivar a otros para desarrollar métodos efectivos y baratos para la reproducción masiva, además se debe considerar su uso potencial para la lucha biológica de la roya del café mediante la incorporación de estrategias de manejo de la enfermedad en condiciones de campo.

5.5. Efecto de aislados de *Lecanicillium* sp sobre la incidencia de roya en condiciones de campo

Se realizó un muestreo preliminar para determinar el porcentaje de incidencia en el área de estudio encontrando una incidencia de 57.18%. La enfermedad estuvo presente durante todo el período de duración del ensayo.

El análisis de varianza realizado para comparar los tratamientos, indica que estos fueron estadísticamente similares entre sí, sin embargo, hubo diferencias estadísticas entre las fechas de muestreo de la incidencia de roya ($p=0.0001$). Lo que indica que la efectividad de la aplicación de los aislados de *Lecanicillium* sp disminuyen la enfermedad a través del tiempo (Figura 13).

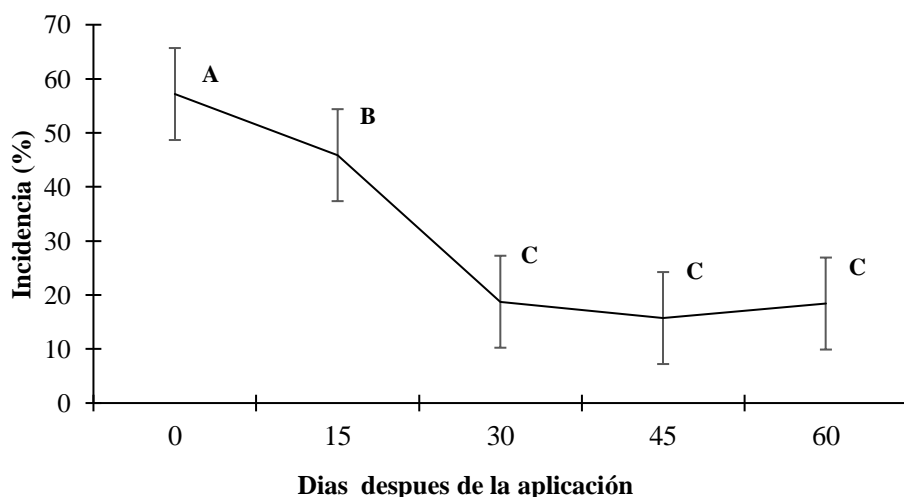


Figura 12. Incidencia de roya en cinco fechas en cafetos bajo sombra. Líneas en los puntos indican el error estándar.

La incidencia de la enfermedad tuvo un comportamiento descendente conforme se realizaban las aplicaciones. La mayor incidencia fue 57.18% y se registró antes del inicio de las aplicaciones, seguida por la incidencia registrada a los 15 días después de la aplicación. Después de la segunda aplicación la incidencia fue de 45.87% manteniendo un comportamiento similar en las siguientes aplicaciones. En el muestreo realizado 60 días después de la primera aplicación, la incidencia fue de 18.41%, registrando un leve aumento con respecto el muestreo anterior, quizá favorecido por las mayores precipitaciones registradas en ese momento. Es posible que la

edad del cafeto y el tipo de manejo tradicional que se le daba a la plantación incidió en la relativamente alta incidencia observada de manera general.

Vargas (2017) observó disminución de la incidencia de roya en evaluaciones posteriores a aplicaciones inundativas en campo por *Lecanicillium lecanii*. Estos resultados son similares a nuestro estudio donde la incidencia de la enfermedad se redujo significativamente de 57.18% hasta 18.41% que fue la última fecha que se registraron los datos (Figura 13).

5.6. Parasitismo de aislados de *Lecanicillium* sp sobre *H. vastatrix* en condiciones de campo

El parasitismo de *Lecanicillium* sp sobre la roya en condiciones de campo osciló entre 21.47% y 11.54%. El aislado San Ramón sobre sale en esta prueba ya que presentó el mayor grado de parasitismo.

En análisis de varianza realizado indica que hubo diferencias estadísticas para las fechas de muestreo sobre el parasitismo de *Lecanicillium* sp sobre *H. vastatrix* ($p=0.0001$); también indica que hay diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p=0.0033$), lo que indica que la efectividad de la aplicación de los aislados de *Lecanicillium* sp disminuyen significativamente la enfermedad a través del tiempo con forme se realizaban las aplicaciones, además indica que los tratamientos tienen cierta variabilidad sobre el efecto la enfermedad (Figura 14).

Todos los aislados causaron parasitismo, alcanzando diferentes grados de control de la enfermedad. El aislado San Ramón se destacó con el mayor grado de parasitismo. Este aislado alcanzó el mayor grado de parasitismo de 21.47% sobre hojas con roya, los demás aislados fueron estadísticamente similares. En el tratamiento a base de cobre pentahidratado (testigo relativo) el parasitismo fue de 11.54%, siendo el menor de todos (Figura 13).

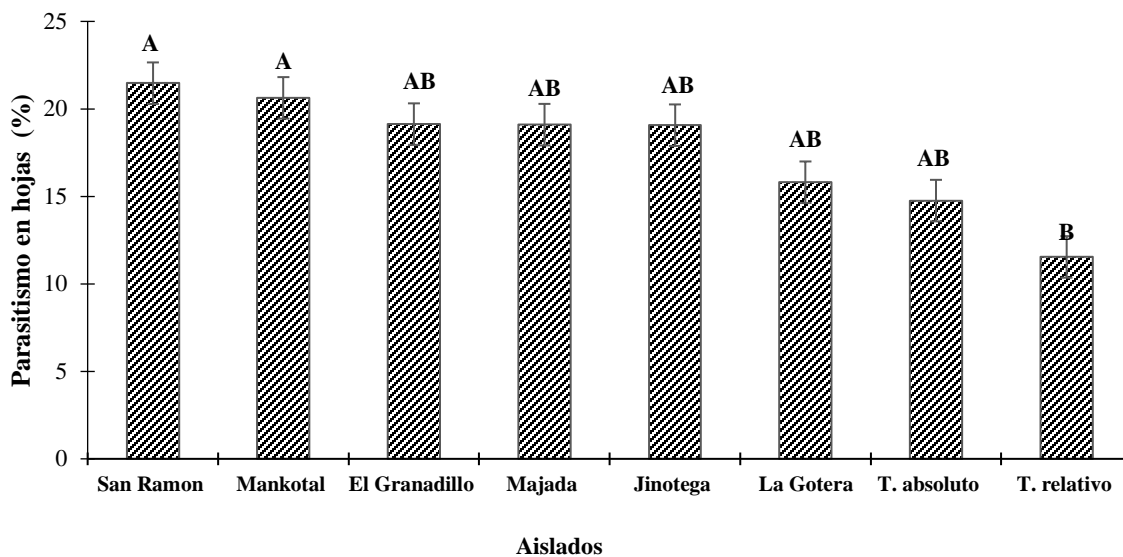


Figura 13. Porcentaje de parasitismo de aislados de *Lecanicillium* sp en hojas. Líneas sobre las barras indican el error estándar.

Vandermeer *et al.* (2009) observaron en un estudio un efecto débil pero estadísticamente significativo del control hiperparasitario de la roya del café en dos escalas distintas: en una parcela de 45 ha y en una escala de aproximadamente 10 m. en este estudio se evaluó el efecto indirecto del mutualismo anticoccídico, donde *L. lecanii* era un parásito del cóccido. En nuestro estudio el manejo del cafeto era tradicional (no químico), estas condiciones benefician el establecimiento del hiperparásito; lo anterior demuestra que cuando se promueve una mayor diversidad biológica se incrementa una mayor red ecológica que permite un equilibrio entre las diferentes especies (Jackson *et al.*, 2012).

Los porcentajes de parasitismo están estrechamente relacionados a la incidencia de enfermedad. Es importante remarcar que *Lecanicillium* sp se establece sobre las pústulas de roya siendo un hiperparásito obligado de manera que entre más roya se presente habrá más probabilidad del establecerse en el campo (Monzón, 1992).

5.6.1. Parasitismo de aislados de *Lecanicillium* sp sobre *H. vastatrix* en diferentes fechas

En este estudio los resultados sobre el comportamiento de los porcentajes de parasitismo en hojas se observó una disminución en la segunda fecha de evaluación de 22.19%. Después de la segunda aplicación el parasitismo disminuyó 13.45% este comportamiento descendente se observó en las tres primeras fechas, sin embargo, a los 60 días se presentó un incremento de la

enfermedad, lo que demuestra que a medida aumenta la incidencia de la enfermedad también aumenta el parasitismo en hojas (Figura 14).

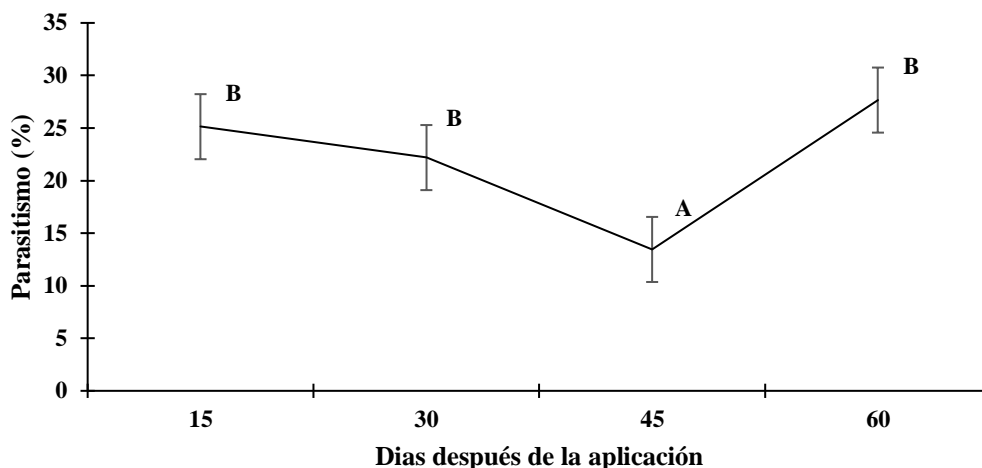


Figura 14. Incidencia de pústulas parasitadas en condiciones de campo mediante aplicaciones de aislados nativos de *Lecanicillium* sp con muestreos y aplicaciones cada 15 días. Líneas en los puntos indican el error estándar.

5.6.2. Parasitismo de aislados de *Lecanicillium* sp en pústulas de *H. vastatrix*

Los tratamientos que presentaron el mayor parasitismo fueron los aislados San Ramon y Majada con 15.83% y 14.69% respectivamente, en cambio el tratamiento químico (cobre pentahidratado) presentó el menor porcentaje de parasitismo 8.24%. Los demás tratamientos presentaron valores intermedios de parasitismo que oscilaron entre 14.23% y 9.7% (Figura 16).

El análisis de varianza realizado indica que hubo diferencias estadísticas para las fechas de muestreo para el parasitismo sobre pústulas de roya ($p:0.0001$); también indica que hay diferencias significativas entre los tratamientos ($p:0.0029$), lo que indica que el efecto de los aislados sobre la incidencia no depende de la fecha de evaluación (Figura 15).

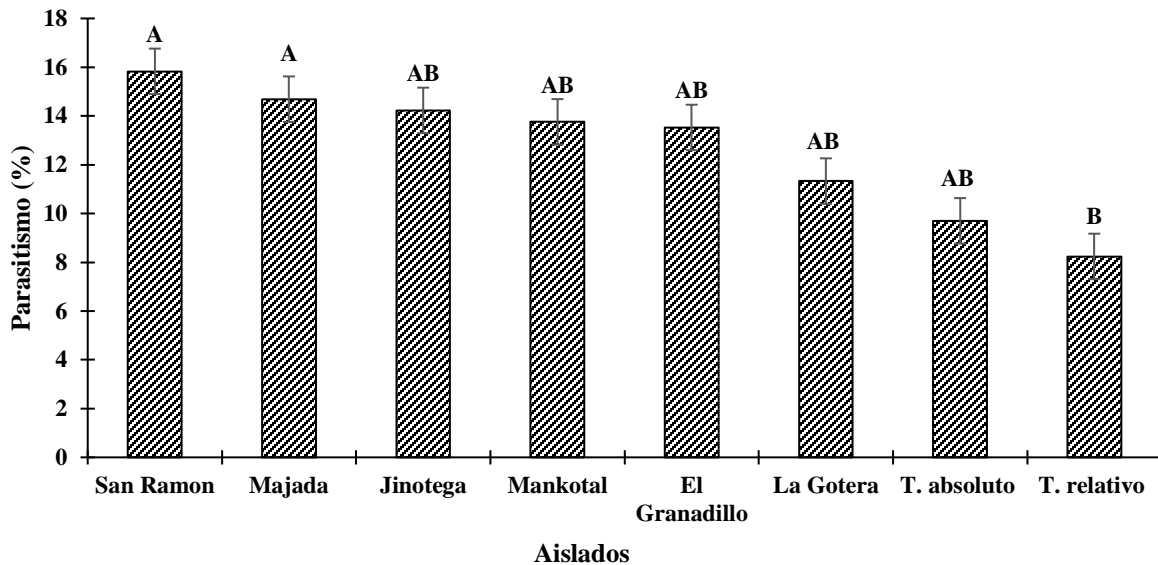


Figura 15. Porcentaje de parasitismo de aislados de *Lecanicillium* sp en pústulas. Líneas sobre las barras indican el error estándar.

Los aislados San Ramón, Majada y Jinotega presentaron porcentajes promedios mayores a 14% de parasitismo en pústulas, el restante de los aislados se mantuvo por debajo de este valor inclusive los dos testigos. En general el promedio del parasitismo sobre pústulas no superó los 12.7%. Canjura *et al.* (2002) obtuvieron resultados similares cuando hicieron aplicaciones de *Lecanicillium* en plantas de café establecidas en macetas, a pesar de que no se hayan encontrado diferencias significativas respecto al testigo el grado de parasitismo se mantuvo en un 10.5 % en ese estudio. Así mismos estudios realizados por Monzón (2001) encontró resultados similares, donde el parasitismo no supero el 14% en pústulas parasitadas.

5.6.3. Parasitismo de aislados de *Lecanicillium* sp sobre *H. vastatrix* en pústulas en diferentes fechas

El parasitismo a los 15 días después de la primera aplicación fue de 24,5%. En las fechas siguientes se redujo el porcentaje de parasitismo a 7.89%, lo que indica que tuvo un comportamiento descendente (Figura 16), sin embargo a los 60 días se registró un leve incremento posiblemente se haya debido a las condiciones ambientales que favorecían la enfermedad. el parasitismo presentó un comportamiento similar a las que se encontró en el

parasitismo en hojas, así como la incidencia de roya en las fechas evaluadas Vargas, (2017) encontró este mismo fenómeno en las aplicaciones de *Lecanicillium lecanii* en diferentes concentraciones en condiciones de campo.

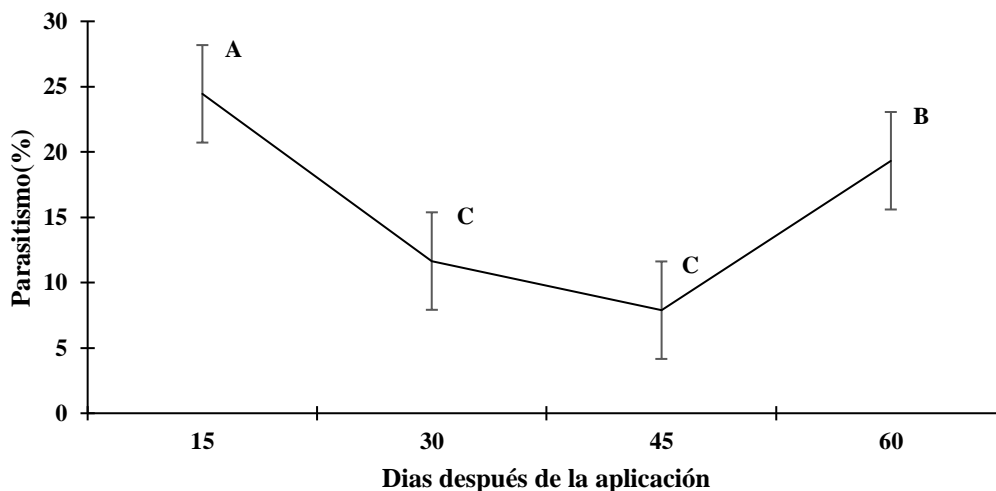


Figura 16. Parasitismo de aislados de *Lecanicillium* sp en pústulas en diferentes fechas. Líneas en los puntos indican el error estándar.

Los mayores porcentajes de pústulas parasitadas se encontraron en la primera y última fecha, correspondiente a los 15 y 60 días después de la aplicación de *Lecanicillium* sp, esto se debe a que en la primera fecha la incidencia de roya fue alta (Figura 12). De igual manera a los 60 días el parasitismo se ve incrementado por un leve aumento de la incidencia de roya. En este estudio se observó que cuando se aplicaba *Lecanicillium* sp con alta incidencia de roya se producía caída prematura de las hojas. Este mismo fenómeno se presentó en un estudio realizado por Monzón (1992). Leguizamón *et al.* (1989) afirma que las hojas que se encuentran parasitadas por este hongo muestran a menudo necrosis y se caen más rápido que las no parasitadas y sostienen que algunos metabolitos son producidos como resultado de la interacción de *H. vastatrix* y *Lecanicillium lecanii*, lo cual origina la necrosis de la hoja. Santiesteban *et al.* (2004) corroboran lo descrito por Leguizamón y colaboradores donde afirman mediante un estudio que el hongo *Lecanicillium lecanii* (*Verticillium*) produce metabolitos en cultivo sumergido entre los cuales se encuentran las proteasas, lipasas y antibióticos denominados Verticilinas. Es importante recalcar que en la medida que los aislados presenten mayores porcentajes de parasitismo sobre las pústulas de roya, mayor potencial tendrá para el control de la enfermedad, debido a que el

efecto de *Lecanicillium* sp sobre la enfermedad se basa principalmente en la reducción de inóculo en ciclos epidemiológicos posteriores.

VI. CONCLUSIONES

Se obtuvieron seis aislados nativos, los que de acuerdo a la caracterización microscópica y macroscópica corresponden al género *Lecanicillium* sp.

Todos los aislados de *Lecanicillium* sp evaluados, presentaron características microscópicas y macroscópicas similares. En las pruebas de parasitismo *in vitro* los aislados Jinotega y La Gotera mostraron los mayores porcentajes de parasitismo sobre uredosporas y pústulas de roya respectivamente.

En condiciones de campo todos los aislados causaron parasitismo sobre las uredosporas logrando una disminución de la enfermedad en el periodo de evaluación, siendo el aislado San Ramón el que resultó más promisorio.

VII. RECOMENDACIONES

Continuar la colecta de aislados nativos de *Lecanicillium* sp para su evaluación y selección como aislados promisorios para el control de roya.

Realizar estudios con más aislados de *Lecanicillium* sp y evaluarlos en diferentes condiciones agroecológicas.

Realizar investigaciones durante más tiempo para ver el comportamiento de la enfermedad, así mismo hacer evaluaciones en diferentes variedades de café donde se integre el uso de *Lecanicillium* sp.

VIII. LITERATURA CITADA

- Aceves, M. A. C., Sánchez, O. M. A. (2008). Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. Revista Chapingo. Serie horticultura, 14(2), 185-191.
- Alavo, T. B. (2015). The insect pathogenic fungus *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas and its use for pests control: A review. Journal of experimental biology and agricultural sciences, 3(4), 337-345.
- Argueta, A. I. N. (2011). Evaluación del hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viegas como bio-controlador de garrapatas en perros (*Canis domesticus* L) (Doctoral disertación, Universidad de El Salvador).
- Askary, H., Benhamou, N., & Brodeur, J. (1997). Ultrastructural and cytochemical investigations of the antagonistic effect of *Verticillium lecanii* on cucumber powdery mildew. *Phytopathology*, 87(3), 359-368.
- Avelino, J., & Rivas, G. (2013). La roya anaranjada del cafeto: mito y realidad, In: Bertrand, B., Rapidel, B. (Eds.), Desafíos de la caficultura en Centroamérica. IICA, San José, pp. 194-241.
- Bello, C. J. C., Figueroa, T. R. F., Guamán, M. M. M., Villao, N. F. A. A., & Tumbaco, B. M. V. (2018). Prevalencia y diseminación de *Verticillium* sp. para el control biológico de la roya del café. RECIAMUC, 2(3), 92-119.
- Bustillo, A. E. (1986). Evaluación del hongo *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* en el control de la mosca blanca, *Trialeurodes vaporariorum* en frijol. Revista colombiana de entomología 12(2) 26 – 3.
- Canjura, S.E. M. (2002). Reproducción masiva de *Verticillium* sp. hiperparásito de roya del café, *Hemileia vastatrix*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica) No. 66 p. 13-19.
- Cao, C., Park S., McSpadden B. B. (2010). Biopesticide controls of plant diseases: resources and products for organic farmers in Ohio. Ohio, United States of America, The Ohio State University. (FACT SHEET. SAG 18-10).
- CENAGRO (Censo Nacional Agropecuario). 2013. IV Censo Nacional Agropecuario (en línea). Managua, NI. Consultado el 04 octubre, 2018. Disponible en <https://www.inide.gob.ni/cenagro/infi/cenagro/IVCENAGROINFORME/assets/basic-html/page5.html>

- Centro de Trámites de las Exportaciones (CETREX). Consultado 08-05-2020. Disponible en <https://www.cetrex.gob.ni/website>.
- Cortez, M., H. (2007). Producción de *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* en diferentes sustratos y patogenicidad. Agricultura técnica en México, 33(1), 83-87.
- Eskes, A. B., Mendes, M.D., Robbs, CF. Gams, W. (1989). Studies on the hiperparasitism of *Hemileia vastatrix* by *Verticillium spp.* In Congreso Paulista de Fitopatología, 10 Piracicaba S.P. Resúmenes. Grupo Paulista de Fitopatología.
- Espinosa, R. G. C., Vallejos Treminio, F. L. (2016). Desarrollo de formulaciones bioplaguicidas a base de *Beauveria bassiana* (Bals & Vuils) con materiales sólidos y líquidos. Universidad Nacional Agraria, Managua (Nicaragua); Facultad de Agronomía. Tesis.
- Fatiha, L. A, Shaukat., R, Shunxiang., A, Muhammad. (2007). Biological characteristics and pathogenicity of *Verticillium lecanii* against *Bemisia tabaci* (HOMOPTERA: AleyrodidaE) on eggplant. Pakistan Entomology. 29 (2).
- Figueroa. L.M., Varela A, Corredor D (2007) Evaluación de sustratos naturales para la propagación masiva del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromicotina: Hyphomycetes). Rev. Invest. 7: 127-131.
- French, E., R; Hebert, TT. (1982). Metodología de investigación fitopatología. ed. M de la Cruz. Sn José, CR. IICA. 290 p.
- Gómez, D., I., Pérez-Portilla, E., Escamilla-Prado, E., Martínez-Bolaños, M., Carrión-Villarnovo, G. L. L., & Hernández-Leal, T. I. (2017). Selección *in vitro* de micoparásitos con potencial de control biológico sobre Roya del café (*Hemileia vastatrix*). Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology, 36(1).
- González, E. (2001). Selección de aislamientos nativos de *Verticillium lecanii* (Zimm) Viegas para la lucha biológica de plagas en el cultivo del cafeto *Coffea arabica* (L.) (No. 2132). Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria.
- González, E., Martínez, B. (1998). Control biológico de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk y Br.) con *Verticillium lecanii* (Zimm) Viegas. Revista Protección Vegetal, 13, 81-84.
- Guharay, F., Monterrey, J., Monterroso, D., & Staver, C. (2000). Manejo integrado de plagas en el cultivo del café. Manual técnico, (44).
- Hall, R. A. 1984. Epizootic potential for aphids of different isolates of fungus *Verticillium lecanii*. Entomophaga 29:311-21.

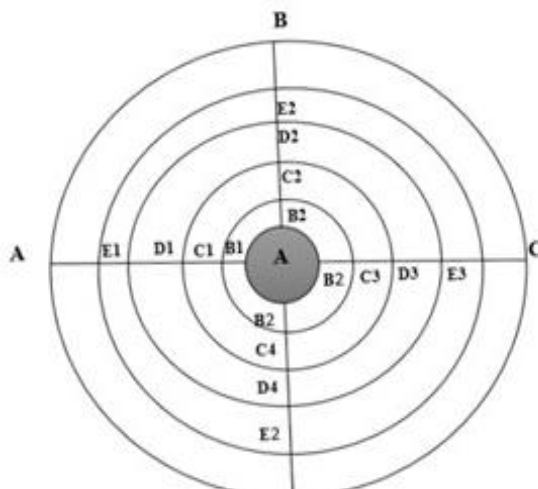
- Hernández, I. B., Carrillo, R. V., & García, I. C. (2009). Alteraciones en la fertilidad masculina por exposición a pesticidas. *Revista Internacional de Andrología*, 7(2), 98-105.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease*, 87(1), 4-10.
- Icochea, T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos Entomopatógenos. International Potato Center.
- Iskandarov, U. S., Guzalova, A. G., & Davranov, K. D. (2006). Effects of nutrient medium composition and temperature on the germination of conidia and the entomopathogenic activity of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(1), 72-76.
- Jackson, D., Skillman, J., & Vandermeer, J. (2012). Indirect biological control of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*, by the entomogenous fungus *Lecanicillium lecanii* in a complex coffee agroecosystem. *Biological Control*, 61(1), 89-97.
- Javed, Z. J. (1987) . Epidemiología y control de la roya del café en Centroamérica. Plagas y enfermedades de carácter epidémico en cultivos frutales de la región centroamericana. CATIE, C. R . Serie técnica . Informe técnico no. 110. p. 17-26.
- Leguizamón, J., Vélez, p., & González, a. (1989). Efecto de extractos metabólicos de *Verticillium lecanii* sobre *Hemileia vastatrix*. CENICAFE. Vol. 40, no. 2. p. Tapachula. 31-39.
- Lemus, S., B. A., & Pérez-Aguilar, D. A. (2016). Control químico del ácaro café del aguacate *Oligonychus punicae* (Hirst, 1926) (Acari: *Tetranychidae*). *Entomología Mexicana*, 3, 349-353.
- Lim, T. K., & Nik, W. Z. W. (1983). Mycoparasitism of the *coffee rust* pathogen, *Hemileia vastatrix*, by *Verticillium psalliotae* in Malaysia. *Pertanika.*, 6(2), 23-25.
- López, Ll., L. V., and Carbonell, T. (1999). Characterization of Spanish strains of *Verticillium lecanii*. *Revista Iberoamericana de micología*, 16, 136-142.
- Mahfud, M. C., ZA, M. A., Meon, S., & Kadir, J. (2006). *in vitro* and in alive Tests for Parasitism of *Verticillium psalliotae* Treschow on *Hemileia Vastatrix* BERK and BR. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2(1), 46-50.
- Malpartida, J., Narrea, M., Dale, W. (2013). Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., sobre el gusano defoliador del maracuyá *Dione juno* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae) en laboratorio. *Ecología Aplicada*. 12(2): 75-81.
- Michel, A., , A. C., Otero-Sánchez, M. A., Martínez-Rojero, R. D., Rodríguez-Morán, N. L., Ariza-Flores, R., & Barrios-Ayala, A. (2008). Producción masiva de *Trichoderma*

- harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. Revista Chapingo. Serie horticultura, 14(2), 185-191.
- Milner, R. J., Huppertz, R. J., & Swaris, S. C. (1991). A new method for assessment of germination of *Metarhizium* conidia. Journal of Invertebrate Pathology, 57(1), 121-123.
- Montalva, C. (2008). Evaluación de la virulencia de dos cepas de *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare y Gams para el control biológico de *Cinara cupressi* (Buckton) (Doctoral dissertation, Tesis Ingeniero Forestal. Valdivia, Chile. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Austral de Chile).
- Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo integrado de plagas (Costa Rica), 63, 95-103.
- Monzón, J. A. (1992). Distribución de *Verticillium* sp. en tres zonas cafetaleras de Nicaragua y evaluación de dos aislamientos del hongo como agente de control biológico de la roya (*Hemileia vastatrix*) del café (*Coffea arabica* L.). Turrialba, CR. CATTE.
- Moraga, P. Q., Bolaños, I. R. T., Pilz, M., Munguía, R. H., Jürgen, A. H. P., Barios, M., & Gamboa, W. M. (2012). Árboles de sombra e intensidad del cultivo afectan el rendimiento de café (*Coffea arabica* L.) y la valoración ecológica en Masatepe, Nicaragua. La Calera, 11(17), 41-47.
- Organización Internacional del Café (ICO). Consultado 10-05-2020. Disponible en http://www.ico.org/ES/trade_statistics.asp?section=Estad%EDstica.
- Pereira, G., Herrera, J., Machuca, A., & Sánchez, M. (2007). Efecto del pH sobre el crecimiento *in vitro* de hongos ectomicorrícicos recolectados de plantaciones de *Pinus radiata*. Bosque (Valdivia), 28(3), 215-219.
- Perfecto, I., Rice, R. A., Greenberg, R., & Van der Voort, M. E. (2007). Shade coffee: a disappearing refuge for biodiversity: shade coffee plantations can contain as much biodiversity as forest habitats. BioScience, 46(8), 598-608.
- Retamal, C. (2008). Evaluación de la virulencia de dos cepas de *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare y Gams para el control biológico de *Cinara cupressi* (Buckton). Universidad Austral de Chile.
- Roberts, D. W., & Yendol, W. G. (1971). Use of fungi for microbial control of insects. Burges, HD Microbial control of insects & mites.
- Safavi, S. A., Shah, F. A., Pakdel, A. K., Reza Rasoulían, G., Bandani, A. R., & Butt, T. M. (2007). Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. FEMS Microbiology Letters, 270(1), 116-123.

- Santiesteban, E. G., Fontela, R. M. Á., Vidal, R. F., Fernández, I. R., Barrios, J. H., Rodríguez, T. L., & Rodríguez, A. N. S. J. (2004). Metabolitos producidos por el hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii*. *Biotecnología Aplicada* Vol.21, No.2.
- Shaid, A. A., Rao Q. A; Bakhsh A., Husnain T. (2012). Entomopathogenic fungi as biological controllers: New insights into their virulence and pathogenicity. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 64(1):21-42.
- Steinkraus, D. C. (2006). Factors affecting transmission of fungal pathogens of aphids. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92(3), 125-131.
- Sumalatha, j. (2014). Evaluation of pH, media on biological attributes & virulency of *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viegas with compatibility studies on biopesticides and insecticides.
- Suresh, N., Santa, R. A., & Shivanna, M. B. (2012). Coffe leaf rust (CLR) and diseases triangle: A case study. *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences*, 2(2), 50-5.
- Thakore, Y. (2006). The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*, 2(3), 194-208.
- Tórrez Avilez, L. M., & Castillo, J. M. (2005). Evaluación de la incidencia natural de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill sobre *Hypothenemus hampei* (Ferrari) y *leucoptera coffeella* (Guerin-Meneville) en el cultivo de café en dos zonas cafetaleras de Nicaragua (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Agraria, UNA).
- Vandermeer, J., Perfecto, I., & Liere, H. (2009). Evidence for hyperparasitism of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) by the entomogenous fungus, *Lecanicillium lecanii*, through a complex ecological web. *Plant Pathology*, 58(4), 636-641.
- Vargas, T. D. A. (2017). Efecto de la aplicación de *Lecanicillium* sp sobre la incidencia y severidad de la roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo del café (*Coffea arábica*).
- Vázquez, M. L. (2005). Experiencia cubana en el manejo agroecológico de plagas en cafeto y avances en la broca del café. Simposio sobre Situación Actual y Perspectivas de la Investigación y Manejo de la Broca del Café en Costa Rica, Cuba, Guatemala y México. JF Barrera (ed.). Sociedad Mexicana de Entomología y El Colegio de la Frontera Sur Tapachula Chiapas, México (pp. 46-57).
- Vélez, P. E., y Rosillo, A. G. (1995). Evaluación del antagonismo del hongo *Verticillium lecanii* sobre *Hemileia vastatrix* en condiciones de invernadero y de campo.
- Volcy, C y Pardo. V. (1994) Principios de Micología. 19ª ed. Universidad Nacional de Colombia. 141 pp.
- Zare, R. and Gams, W. (2001). A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen nova. *Nova Hedwigia* 73:1-50.

IX. ANEXOS

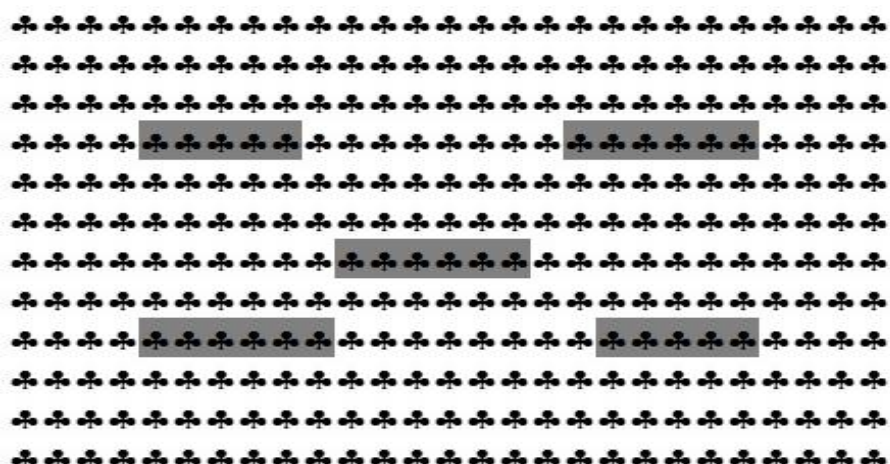
Anexo 1. Metodología de medición del crecimiento radial de aislados de *Lecanicillium* sp. descrita por (French y Hebert, 1982).



Anexo 2. Diseño de campo de diferentes tratamientos.

BLOQUE	Tratamientos (parcelas)							
I	Mankotal	Majada	Jinotega	La Gotera	San Ramón	Granadillo	T. Relativo	T. Absoluto
II	T. Absoluto	San Ramón	Granadillo	Jinotega	Majada	Mankotal	T. Relativo	Gotera
II	Jinotega	Gotera	Mankotal	T. Relativo	Majada	Granadillo	T. Absoluto	San Ramón

Anexo 3. Distribución del azar de sitios para el muestreo de incidencia de roya , parasitismo de roya en diferentes fechas, parasitismo en hojas y pústulas.



Anexo 4. Análisis de varianza para la variable de viabilidad de aislados de *Lecanicillium* sp en diferentes horas.

Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	Pr > F
Horas	2	14303.8562	7151.92811	143.02	<0.0001
Aislados	5	10371.8713	2074.37425	41.48	<0.0001
Horas*Aislados	10	5712.15801	571.2158	11.42	<0.0001
R ² : 0.53792; Coeficiente de variación:7.79927					

Anexo 5. Análisis de varianza para la variable del crecimiento radial de aislados de *Lecanicillium* sp en medio de cultivo EMA.

Fuente	Suma de Cuadrado	Gados de Libertad	Cuadrado Medio	F Calculado	p-valor
Horas	140.29	9	15.59	18.07	<0.0001
Aislado	34.22	5	6.84	7.93	<0.0001
Horas*Aislado	67.64	45	1.5	1.74	0.0026
Error	465.87	540	0.86		
Total	708.02	599			
R: 0.34; Coeficiente Variación : 48.39					

Anexo 6. Análisis de varianza para la variable del crecimiento radial de aislados de *Lecanicillium* sp en medio de cultivo PDA.

Fuente	Suma de Cuadrado	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F Calculado	p-valor
Horas	150.58	9	16.73	23.51	<0.0001
Aislado	41.87	5	8.37	11.77	<0.0001
Horas*Aislado	67.62	45	1.5	2.11	0.0001
Error	384.29	540	0.71		
Total	644.37	599			

R²: 0.40; Coeficiente de Variación: 56.85

Anexo 7. Análisis de varianza para variable del rendimiento de aislados de *Lecanicillium* sp en diferentes sustratos orgánicos.

Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrado	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Sustrato	2	1805816532	902908266	47.18	<.0001
Aislado	5	367072480	73414496	3.84	0.0039
Sustrato*Aislado	10	1550470333	155047033	8.10	<.0001

R²:0.729884; Coeficiente de variación:25.52408

Anexo 8. Análisis de varianza para la variable del rendimiento de aislados de *Lecanicillium* sp en sustrato orgánico a base de soya.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Aislados	5	1088552569	217710514	7.58	0.0002
Error	24	689433543	28726398		
Corrected total	29	1777986112			

R² :0.612239; Coeficiente de variación: 23.59323

Anexo 9. Análisis de varianza para la variable del rendimiento de aislados de *Lecanicillium* sp en sustrato orgánico a base de arroz.

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculado	Pr > F
Aislados	5	291129925	58225985	2.92	0.0337
Error	24	478101421	19920892.5		
Corrected total	29	769231346			

R²:0.378469; Coeficiente de Variación : 26.32946

Anexo 10. Análisis de varianza para la variable del rendimiento de aislados de *Lecanicillium* sp en sustrato orgánico a base de sorgo.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Pr > F
Aislados	5	537860318.1	107572063.6	12.27	<.0001
Error	24	210405196.5	8766883.2		
Corrected total	29	748265514.7			

R²: 0.718809; Coeficiente de variación: 25.19951