

Efecto de la aplicación de *Lecanicullium lecanii* sobre la incidencia y severidad de la roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo de café (*Coffea arabica*)

Diego Alonso Vargas Tenorio

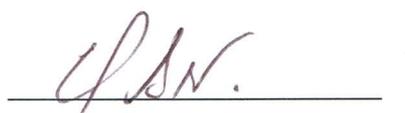
PRÁCTICA DIRIGIDA PARA OPTAR AL GRADO DE PROFESIONAL DE INGENIERO
AGRÓNOMO CON EL GRADO DE LICENCIADO EN AGRONOMÍA

ESCUELA DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
2017

Efecto de la aplicación de *Lecanicullium lecanii* sobre la incidencia y severidad de la roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo de café (*Coffea arabica*)

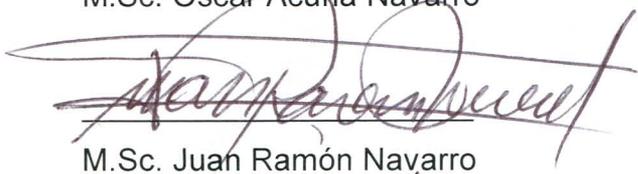
Diego Alonso Vargas Tenorio

PRÁCTICA DIRIGIDA PARA OPTAR AL GRADO DE PROFESIONAL DE INGENIERO AGRÓNOMO CON EL GRADO DE LICENCIADO EN AGRONOMÍA



M.Sc. Oscar Acuña Navarro

DIRECTOR DE PRÁCTICA



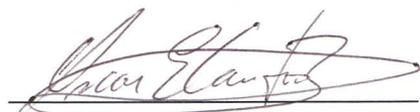
M.Sc. Juan Ramón Navarro

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



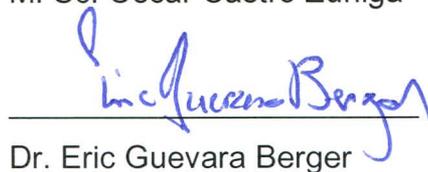
Lic. Oscar Ortiz Pérez

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



M. Sc. Oscar Castro Zúñiga

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Dr. Eric Guevara Berger

DIRECTOR DE ESCUELA



Diego Alonso Vargas Tenorio

SUSTENTANTE

Dedicatoria

A Dios, por guiarme por el camino correcto, por darme las fuerzas
y el don de la perseverancia para alcanzar esta meta.

A mis padres, Luis Diego Vargas Sandoval y Elizabeth Tenorio Fernández,
a mi hermana Jennifer Vargas Tenorio por el apoyo incondicional.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Hacienda Juan Viñas, en especial al Lic. Oscar Ortiz Pérez y a Manuel Cordero por la ayuda, confianza y apoyo brindado.

A mi director de tesis, M.Sc. Oscar Acuña Navarro por la guía, apoyo y consejos que me ayudaron a la conclusión del proyecto.

Al M.Sc. Juan Ramón Navarro por la ayuda para la culminación de la práctica.

A las casas comerciales por su colaboración con los productos utilizados durante la práctica.

A mi familia por la paciencia, sacrificio y apoyo que me brindaron para poder concluir con éxito este proyecto.

Índice

Tabla de Cuadros	vi
Tabla de Figuras.....	vii
Resumen.....	1
1 Introducción.....	2
1.1 Objetivo general	5
1.2 Objetivos específicos	5
2 Antecedentes.....	5
3 Revisión de Literatura.....	7
3.1 Generalidades del cultivo	7
3.2 Condiciones agroecológicas óptimas para el café.....	9
3.2.1 Precipitación.....	9
3.2.2 Temperatura.....	9
3.2.3 Humedad Relativa	9
3.3 Generalidades de la roya	10
3.3.1 Clasificación taxonómica	10
3.3.2 Ciclo Biológico	11
3.3.3 Control de la roya	13
3.4 Hongo <i>Lecanicillium lecanii</i>	17
4 Metodología	18
4.1 Procedencia del hongo.....	19
4.2 Información del producto.....	19
4.3 Evaluación de calidad del producto	19
4.4 Información del Coadyuvante	20
4.5 Tratamientos	21
4.6 Diseño y establecimiento de la práctica	22
4.7 Mecanismos de evaluación.....	23
5 Resultados	27
5.1 Incidencia	27
5.2 Severidad	31

Discusión.....	33
6 Conclusiones	35
7 Literatura citada.....	36
8 Anexos.....	43
Anexo 1. Análisis estadístico de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) respecto a la incidencia de roya para las tres dosis utilizadas junto con el testigo durante la práctica.	43
Anexo 2. Análisis estadístico de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) respecto al uso de coadyuvante para las tres dosis utilizadas en base a la incidencia.	43
Anexo 3. Análisis estadístico de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) respecto a la severidad de roya para de las tres dosis utilizadas junto con el testigo durante la práctica. ..	44
Anexo 4. Análisis estadístico de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) respecto al uso de coadyuvante para las tres dosis utilizadas en base a la severidad.	44

Tabla de Cuadros

Cuadro 1. Análisis de calidad del producto Lecano realizado en el laboratorio de CIA.

Cuadro 2. Tratamientos aplicados en el campo para determinar la efectividad del producto Lecano sobre la roya del café.

Cuadro 3. Fungicidas, ingrediente activo y dosis utilizadas por la empresa Juan Viñas para el combate de la roya (*Hemileia vastatrix*).

Cuadro 4. Escala de Severidad para roya (SAGARPA 2013).

Cuadro 5. Índice de incidencia de roya bajo las tres dosis utilizadas.

Tabla de Figuras

Figura 1. Aplicación de Lecano en la finca de Hacienda Juan Viñas, cantón de Jiménez.

Figura 2. Lesiones de roya observadas en el campo. A). Lesión de roya con esporas. B). Lesión de roya en ausencia de esporas. C). Lesión de roya parasitada por el hongo *Lecanicillium lecanii*.

Figura 3. Diagrama del grado de la escala de Severidad (SAGARPA 2013).

Figura 4. Datos climatológicos de la zona de Juan Viñas, durante el desarrollo de la práctica. Fuente: ICAFE

Figura 5. Porcentaje de incidencia de roya a través del tiempo en cada uno de los tratamientos al aplicar el producto químico (Q) y biológico (B).

Figura 6. Índice de incidencia de roya de los 7 tratamientos utilizados durante la práctica.

Figura 7. Porcentaje de severidad de roya a través del tiempo en cada uno de los tratamientos al aplicar el producto químico (Q) y biológico (B).

Figura 8. Índice de severidad de roya de los 7 tratamientos utilizados durante la práctica.

Figura 9. Lesiones de roya (*Hemileia vastatrix*) parasitadas por *Lecanicillium lecanii*.

Resumen

Una de las principales enfermedades que ataca al cultivo del café es la roya, *Hemileia vastatrix*, la cual causa la defoliación de la planta, causando un debilitamiento general de la planta, una maduración irregular de la cosecha y una reducción de la producción. Este trabajo de investigación busca una alternativa biológica para el combate de esta enfermedad, ya que la principal medida utilizada por los productores es el uso de fungicidas, en especial del grupo químico de los triazoles, lo que conlleva un riesgo de desarrollar resistencia por parte del patógeno, además estos productos químicos pueden representar un riesgo para el ambiente y la salud de los trabajadores.

Se evaluó el efecto del controlador biológico *Lecanicillium lecanii* en 3 distintas dosis: 1kg/ha, 1,5kg/ha y 2kg/ha sobre la incidencia y severidad de la roya, así como si el uso de coadyuvante junto a *L. lecanii* mejora el combate de la enfermedad. Los tratamientos que mostraron el menor porcentaje de incidencia fueron el testigo (fungicidas) junto con el tratamiento de 1,5 kg/ha; mientras el tratamiento que presentó la mayor incidencia fue el de 1 kg/ha. En cuanto a la severidad no se presentaron diferencias significativas en ningún tratamiento. No se encontraron diferencias significativas en el uso o no de coadyuvante.

1 Introducción

El café (*Coffea arabica*) es un cultivo de gran importancia económica mundial. Esta planta nativa de África se produce actualmente en unos 70 países alrededor del mundo, de los cuales 45 son miembros exportadores de la Organización Internacional del Café, que en conjunto representan el 97 por ciento de la producción mundial de café (MAG 2007). Según el Instituto del café de Costa Rica (ICAFE 2015) y el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC 2015) a nivel nacional el café representa el cultivo de mayor superficie sembrada, con un 23,8% lo que equivale a una extensión de 84.133 hectáreas. En la región centroamericana Costa Rica figura como el tercer productor del grano con 1 897 935 fanegas en la cosecha 2014-2015, esto representa una fuente de empleo para más de 50 000 familias productoras, 210 beneficiadores, 67 tostadores y 58 exportadores.

La roya, *Hemileia vastatrix*, está considerada en el ámbito mundial entre las siete enfermedades más peligrosas que atacan a las plantas tropicales, y es sin duda la enfermedad más dañina del café (Subero 2005). Este hongo ingresó por primera vez a Costa Rica en 1983 y hoy en día se encuentra presente en todo el país y durante la mayor parte del año. Esta enfermedad se ve favorecida por las temperaturas cálidas y ambientes húmedos y lluviosos; su importancia es mayor en zonas cafetaleras de altura media y baja (Barquero 2013) (ICAFE 2011). El principal daño causado por este hongo es la caída de gran cantidad de hojas (especialmente en ataques severos) lo que causa un debilitamiento general de la planta, una maduración muy irregular de la cosecha y una reducción de la producción para el siguiente año, alrededor de un 20% (Avelino & Rivas 2013).

Esta enfermedad ha afectado a unos 43.000 pequeños productores costarricenses, causando pérdidas para la cosecha 2012-2013 por \$16 millones, según datos del ICAFE. Debido a esto el Gobierno firmó un decreto de “Emergencia fitosanitaria nacional por epifitía y daño severo causado por la roya en el cultivo del café”. Para el periodo 2013-2014 la producción se redujo a 1.827.960 fanegas en fruta (de las 2.245.543 fanegas con que cerró la temporada 2012-2013), ya que según un informe del Instituto del Café de Costa Rica, del total de hectáreas sembrada en el país, el 67% se encontraban afectadas por roya y del total de las plantas con la enfermedad, un 25% fueron dañadas de manera severa.

Las acciones de combate de la enfermedad han girado en torno al uso de fungicidas, ya que este es el método que tradicionalmente ha presentado los mejores resultados en el combate de la roya; de hecho cuando el gobierno firmó el decreto de emergencia fitosanitaria se destinaron 2 mil millones de colones del fondo de emergencias del ICAFE para la distribución de fungicidas para el combate de la enfermedad. Sin embargo la gran mayoría de estos fungicidas pertenecen al grupo de los triazoles, esto ha provocado una disminución en la efectividad de los productos, ya que una aplicación masiva de productos con el mismo grupo químico puede provocar la generación de resistencia por parte de la cepa, haciéndola inmune a los fungicidas. Tomando en cuenta la alta tasa de mutación que posee *Hemileia vastatrix*, como menciona Cristancho et al. (2007) no es de extrañar que se encuentren con más frecuencia razas nuevas de la roya, las cuales pueden conferir de manera gradual resistencia a fungicidas de este grupo (Oliver 2014).

También se debe considerar que la mayoría de los fungicidas utilizados para el combate de la roya son considerados como tóxicos, por lo que dicho combate representa un riesgo no solo para el ambiente, sino por los problemas de salud que puede causar en personas y animales. Debido a lo mencionado anteriormente se están buscando alternativas para reducir el número de aplicaciones químicas que se realizan actualmente. Entre las alternativas evaluadas destacan organismos que realizan un control biológico, como es el caso del hongo *Lecanicillium lecanii*, el cual es uno de los hiperparásitos de la Roya del Café que más ha sido estudiado en condiciones naturales y al cual se le reconocen atributos especiales como un enemigo natural de *Hemileia vastatrix* (FAO 2015) (Retana 2006).

La mayor eficacia en campo de estos hongos biocontroladores se presenta en condiciones ideales tanto climatológicas como en la calidad de la preparación y maquinaria de aplicación. Sin embargo, esas condiciones no siempre están presentes, por lo que se busca maximizar la calidad de la aplicación. Estudios mencionan un incremento en la eficacia de hongos entomopatógenos cuando fueron aplicados junto a un coadyuvante, se menciona que la estabilidad, viabilidad y persistencia en campo mejoraron con el uso de este componente (Cortez 2006).

Este trabajo buscó obtener una alternativa biológica al uso de fungicidas químicos, que permitiera obtener un combate similar al proporcionado por estos, con la ventaja de obtener un producto que no represente riesgo para la salud de las personas, no contamine el medio ambiente y no genere resistencia por parte del patógeno.

1.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la aplicación de *Lecanicillium lecanii* en combinación con fungicidas químicos sobre la incidencia y severidad del daño causado por el hongo *Hemileia vastatrix* en el cultivo de café para contar con una alternativa biológica en el combate de la roya.

1.2 Objetivos específicos

- Comparar el efecto de 3 dosis distintas de *Lecanicillium lecanii* en combinación con fungicidas químicos sobre la aparición y grado de avance de lesiones causadas por *Hemileia vastatrix* en el cultivo de café.
- Determinar el efecto del aceite vegetal como coadyuvante del fungicida biológico sobre la aparición y grado de avance de lesiones causadas por *Hemileia vastatrix* en el cultivo de café.

2 Antecedentes

Se han realizado numerosos esfuerzos por encontrar alternativas al control químico de la roya. Alavo (2015) menciona que *Lecanicillium lecanii* es uno de los más comunes y eficientes entomopatógenos de áfidos, trips, dípteros, lepidópteros, himenopteros y homópteros. Gracias a esto se han logrado realizar aislamientos de

este hongo provenientes de insectos, los cuales fueron capaces de parasitar *Hemileia vastatrix*. También se indica que las royas y hongos son un sustrato común de *L. lecanii*. Eskes et al. (1991) mostraron que aislamientos de *L. lecanii* parasitaron con facilidad lesiones de roya del café, y con condiciones de elevada humedad relativa, este mostró propiedades hiperparasíticas y antibióticas en laboratorio, sin embargo al realizar las pruebas en campo el hongo no presentó el desarrollo hiperparasítico deseado. Ellos atribuyeron esto a la baja humedad relativa presente y a otros factores ambientales.

Macdonald et al. (2013), así como Jackson et al. (2012) revelaron el potencial epizoótico de *Lecanicillium lecanii* de realizar un control biológico mediante las interacciones de mutualismo entre hormigas y la escama del café. Ellos mostraron que *L. lecanii* es un enemigo natural de la escama del café (*Coccus viridis*), la cual a su vez posee una relación mutualista con la hormiga *Azteca instabilis*, donde estas transportan y protegen a la escama de depredadores y parasitoides, y las escamas producen un “néctar” rico en carbohidratos que la hormiga consume. Cuando las esporas de *L. lecanii* que se encuentran en propágulos viables en el suelo son transportados por el viento o salpiques de lluvia, llegan a la escama, germinan y se multiplican sobre esta, y posteriormente las escamas son transportadas por las hormigas en la planta de café, diseminando las esporas del hongo, llegando a parasitar a *Hemileia vastatrix*.

En estudios similares, Vandermeer et al. (2009) encontraron un efecto de hiperparasitismo de *Lecanicillium lecanii* sobre la roya, el cual está relacionado a un efecto indirecto entre la hormiga y la escama. Y Perfecto & Vandermeer (2015) encontraron que la presencia epizoótica de *L. lecanii* dentro de un grupo de hormigas tuvo una influencia negativa sobre la incidencia de roya en un radio de 15 metros.

Por su parte Cortez (2006) evaluó el efecto de aceite de girasol como coadyuvante del hongo *Lecanicillium lecanii* para el control de áfidos. Determino que con baja humedad relativa (80%) el aceite al 15% fue más favorable para el desarrollo micelial y la velocidad de germinación del hongo, ya que este reducía el riesgo de desecación de los conidios. También obtuvo que la mayor mortalidad de áfidos se obtuvo con la formulación del hongo + aceite que al utilizar el hongo sin coadyuvante. Este estudio concluyó que la efectividad biológica de *L. lecanii* en campo puede ser incrementada mediante formulaciones en aceite vegetal.

En un estudio similar realizado por Williams et al. (2000) probaron coadyuvantes de diferente composición (aceites vegetales, aceites minerales, surfactantes, entre otros) con una formulación comercial de *Lecanicillium lecanii* obteniendo pequeños beneficios al usar aceite vegetal. En los demás casos no se encontraron diferencias significativas.

3 Revisión de Literatura

3.1 Generalidades del cultivo

El café se produce en ocho zonas cafetaleras del país. El café de cada zona difiere según sean las condiciones ambientales y la altitud. En Costa Rica, la precipitación y la humedad relativa, al igual que la temperatura tienden a disminuir con la elevación (ICAFE 2015). Las 8 Regiones Productoras se dividen en zonas bajas de menos de 1.000 metros de altitud donde el café es más liviano y regiones de más de 1.200 metros de altura y de origen volcánico, que producen cafés más fuertes o ácidos y aromáticos. Más del 80% de nuestro grano de calidad sigue produciéndose en las tierras

altas, de los 1.000 a 1.700 metros. Según el ICAFE (2011) las principales variedades de café sembradas en Costa Rica son:

Variedad Caturra

Variedad originaria de Brasil, se caracteriza por ser de porte bajo, tiene entrenudos cortos, tronco grueso y poco ramificado, y ramas laterales abundantes, cortas, con abundante ramificación secundaria, lo que da a la planta un aspecto vigoroso y compacto. Esta variedad posee una amplia adaptabilidad en cuanto a altitud y también cuenta con una alta productividad.

Variedad Catuaí

Procedente de Brasil, resultado del cruzamiento de Caturra por Mundo Novo. Es de porte pequeño e internudos cortos aunque un poco más alto y ancho que el Caturra. Presenta una gran uniformidad genética, tiene la propiedad de producir mucho crecimiento secundario en las bandolas, ese hecho le da un potencial de muy alta producción.

Híbridos F1

Presentan tronco grueso, tallo de porte medio, bandolas largas, entrenudos cortos y follaje abundante. El fruto es de maduración media y la producción promedio superior en 27% respecto a Caturra y Catuaí. Los materiales seleccionados presentan tolerancia ante la Roya (*Hemileia vastatrix*), mientras que respecto a otras enfermedades es igualmente susceptible como las variedades antes mencionadas.

Variedad Venecia

Es una planta de porte bajo, entrenudos cortos, el tamaño de hoja es grande. Esta variedad posee una alta calidad de taza, tamaño de grano grande (superior a Caturra), maduración tardía de frutos y producción media. Esta variedad se orienta principalmente a zonas en donde la cosecha coincide con el periodo de mayor precipitación.

3.2 Condiciones agroecológicas óptimas para el café

3.2.1 Precipitación

Para un buen desarrollo del cafeto se requieren al menos 1000mm anuales, ya que valores por debajo de este causarían una limitante en el crecimiento, lo que repercutiría en la cosecha del siguiente año. Un periodo de sequía muy prolongado también puede causar la defoliación de la planta. Sin embargo con precipitaciones mayores de 3000 mm la calidad física del café oro y la calidad de taza se deterioran notablemente; además el control fitosanitario de la plantación resulta más difícil y costoso.

3.2.2 Temperatura

El café expuesto a bajas temperaturas ($<10C^0$) produce clorosis en las plantas, mientras temperaturas elevadas causan un acelerado desarrollo vegetativo, maduración precoz de los frutos y mayor agotamiento de los cafetos.

3.2.3 Humedad Relativa

Cuando la humedad relativa alcanza niveles superiores al 85%, se propicia el ataque de enfermedades fungosas que se ven notablemente favorecidas.

3.3 Generalidades de la roya

La roya es un parásito obligado que afecta las hojas de las especies del género *Coffea*, en especial a la especie *C. arabica*. Los primeros síntomas de la enfermedad aparecen en la cara inferior de las hojas, por donde penetra el hongo. Consisten en pequeñas lesiones amarillentas que con el tiempo se vuelven coalescentes y producen las uredosporas; las cuales fungen como medio de reproducción y dispersión. Estas son de forma reniforme, equinuladas sobre su mitad superior y lisas ventralmente (Avelino & Rivas 2013). De acuerdo a Fernandes et al. 2009 *H. vastatrix* también produce teliosporas y basidiosporas, de hecho estas últimas germinan sobre las hojas de café pero no logran infectarlas, por lo que se cree que este hongo necesita de otro hospedero para completar su ciclo, sin embargo se desconoce el hospedero alterno. Al final del ciclo de vida de la roya, las lesiones producen uredosporas de color anaranjado y en la cara superior de las hojas se divisan manchas cloróticas. Finalmente, las lesiones se vuelven necróticas (Trinidad 2014).

3.3.1 Clasificación taxonómica

La roya del cafeto es causada por *Hemilleia vastatrix* Berk & Br. La clasificación del causante de la roya de acuerdo a Avelino et al. (1999) es la siguiente:

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Filo: *Basidiomycota*

Subfilo: *Pucciniomycotina*

Clase: *Pucciniomycetes*

Orden: *Puccionales*

Género: *Hemileia*

Especie: *Hemileia vastatrix*

3.3.2 Ciclo Biológico

Según Avelino et al. (1999) el ciclo de la roya anaranjada está formado por varios procesos, entre los que menciona la diseminación, germinación, la penetración, la colonización y la fase de esporulación.

Diseminación

La diseminación del hongo se realiza por medio de esporas denominadas uredosporas, que producidas en grandes cantidades corresponden al polvo amarillo o naranja que se visualiza en el envés de las hojas de café y que es característico de esta enfermedad (Rivillas et al. 2011). La diseminación a corta distancia es favorecida por el agua, a pequeñas y medias distancias por el hombre (en especial en la época de cosecha); y el viento desde cortas hasta largas distancias (Trinidad 2014) (Virginio 2015).

Germinación

Una vez que la espora (uredospora) llega al envés de la hoja, esta requiere la presencia de agua libre por al menos 6 horas, temperaturas entre 21-25 °C y condiciones de oscuridad (SAGARPA 2013). Si bien es cierto la germinación se puede dar en menos de 5 horas, la penetración no se dará con menos de 6 horas de presencia de agua libre (Rayner 1961).

Penetración

Para darse la penetración del hongo en el hospedero se requiere la formación de apresorios, que son estructuras adhesivas y achatadas a partir de la cual se origina una hifa afilada, que permite forzar la entrada en el huésped. Los apresorios pueden formarse entre 6.5 - 8.5 horas después de iniciada la germinación y con temperaturas de 14 a 20 °C (De Jong et al. 1987). La germinación se inhibe por la luz y cuando se evapora el agua de la hoja, ya que afecta el crecimiento de los tubos germinativos (Avelino & Rivas 2013). La penetración del hongo se da por estomas bien desarrollados, esto explica porque la infección se da en mayor cantidad en hojas adultas que en jóvenes, ya que en estas últimas la maduración de los estomas es incompleta (Avelino et al. 1999).

Colonización

Después de la penetración se establecen relaciones tróficas entre el hongo y la planta. Se da la formación de hifas intracelulares, de la cuales nacen haustorios intracelulares, los cuales extraen de las células invadidas los elementos necesarios para el crecimiento del hongo. Esto conduce a la aparición de los primeros síntomas, “un leve amarillamiento entre diez y veinte días después de la germinación. Unas cuantas hifas invaden posteriormente una cámara sub-estomática y producen un agregado de células esporógenas o protosoro” (Avelino & Rivas 2013). Algunas de estas células salen por la apertura estomática y producen un esporóforo. Cada agregado producido a nivel de un estoma constituye un soro o pústula (Avelino et al. 1999).

Esporulación

Los soros son los encargados de producir nuevas uredósporas. El tiempo transcurrido desde la infección hasta la producción de esporas se denomina periodo de latencia; cuanto más corto es el periodo de latencia, más fuerte es la epidemia. De acuerdo a Barquero (2013) la duración del ciclo reproductivo de la roya en Costa Rica dura alrededor de 30 días, por lo que de acuerdo a los periodos de lluvia en nuestro país se pueden completar de 6 a 8 ciclos de la enfermedad de acuerdo a la región donde se encuentre.

3.3.3 Control de la roya

En el café, la roya ha obligado a un uso continuo de agroquímicos, en especial del grupo de los triazoles, por lo que se han buscado alternativas para el manejo de esta enfermedad reduciendo las aplicaciones químicas. Para este manejo es importante conocer el ciclo de vida del hongo, la curva epidemiológica, así como las condiciones climáticas que favorecen la enfermedad, para determinar las medidas que puedan afectar al hongo en su estado más vulnerable (Barquero 2013).

3.3.3.1 Combate por medio de prácticas culturales: Densidad de siembra

La densidad adecuada dependerá de las condiciones climáticas del lugar, las características del terreno (inclinación, tipo de suelo, etc.), así como las características específicas de cada variedad. La distancia de siembra es importante ya que permite un adecuada entrada de aire y luminosidad para la planta, favoreciendo el secado rápido de las hojas debido a las lluvias o rocío, reduciendo las condiciones favorables para la germinación de *Hemileia vastatrix* (Paiva et al. 2001). De acuerdo a Barquero (2013) se

puede utilizar de referencia la siembra de las plantas a una distancia de 2m entre hileras y 1m entre plantas.

3.3.3.2 Podas

Un sistema de poda bien equilibrado estimula la formación de tejido productivo nuevo y vigoroso. Además favorece la disminución de las enfermedades al mejorar la distribución de la luz y aumentar la aireación. En Costa Rica, del total de hectáreas cultivadas, un 15,1% requieren podas y un 5,3% requieren renovación; en ambos casos se refleja que el manejo del cultivo no ha sido el más apropiado y se evidencia el envejecimiento de las plantaciones (ICAFE 2013).

3.3.3.3 Fertilización

La fertilización es probablemente la actividad que más repercute en la productividad de los cafetos. Además una plantación bien nutrida es menos propensa a la infección de enfermedades, ya que esta contará con mejores defensas contra los microorganismos dañinos. Cuando la planta está en la etapa de formación de frutos, requiere una mayor demanda nutricional, si no se suplen estas demandas, sufren un estrés, translocando los nutrientes de las hojas a los frutos, reduciendo los niveles nutricionales en las hojas, haciéndolas más susceptibles a la roya (Barquero 2013).

3.3.3.4 Combate por resistencia

Este método consiste en la utilización de cultivares resistentes a la roya. En nuestro país la variedad Obatá fue liberada por el ICAFE en el 2013, el cual es altamente tolerante a la roya y sobresale por sus características productivas y de calidad de taza

(ICAFE 2015). Existen además dos híbridos F1 con resistencia incompleta a la roya (L13A44) y (L12A28) los cuales deben ser propagados en laboratorio por embriogénesis somática, ya que son la primera descendencia del cruce (Barquero 2013).

3.3.3.5 Control Químico

El control químico de la roya se realiza mediante la aplicación de fungicidas que pueden ser protectores o sistémicos. En el primer caso son productos a base de cobre y actúan cubriendo la superficie de la hoja, previniendo la germinación de las esporas. Sin embargo estos productos no curan, por lo que en las partes que ya han sido atacadas el hongo continúa su desarrollo. También se ha comprobado que los cúpricos, como metales pesados, son contaminantes fuertes del ambiente, además que estos productos se lavan fácilmente cuando llueve intensamente (Rivillas et al. 2011).

Por otra parte los fungicidas sistémicos son productos cuya finalidad es detener el avance de las lesiones de roya, desde el interior de las hojas. La gran mayoría de los fungicidas sistémicos utilizados hoy en día pertenecen al grupo de los triazoles, cuyo mecanismo de acción se basa en impedir la producción de ergosterol, que es una sustancia imprescindible para el crecimiento de *H. vastatrix*, En el grupo de los triazoles se encuentran diversos fungicidas, con variados ingredientes activos, como: Tebuconazole, Difenconazole, Epoxiconazole, Cyproconazole, Triadimenol, Propiconazole, Tetraconazole y Flutriafol (Zambollin 2013). Sin embargo debido al uso continuo de estos fungicidas y al sitio de acción tan específico, existe preocupación de crear resistencia por parte del patógeno al fungicida.

3.3.3.6 Control biológico

El desarrollo de un programa exitoso de control biológico requiere un profundo conocimiento de la ecología del agente de control de la enfermedad y de la enfermedad misma, lo que incluye verificar que *L. lecanii* de origen natural puede reducir significativamente la prevalencia o severidad de *H. vastatrix* en condiciones de campo. Vandermeer et al. (2009) mostraron, utilizando estudios de campo que *L. lecanii* y *H. vastatrix* en una finca de café orgánico en el sur de México, que la presencia de *L. lecanii* se correlaciona con una reducción significativa en la prevalencia de *H. vastatrix*. El estudio demostró que existe una correlación negativa significativa entre la abundancia de *L. lecanii* y la prevalencia de la roya del café en el mismo año, se plantea la hipótesis, basándose en la historia natural de los dos hongos, que puede haber un efecto a través de años que podría ser tan fuerte, o incluso más fuerte, que el efecto dentro del año. Dado que la roya es un hongo biótrofo solo puede sobrevivir en tejido vivo del huésped. Esto implica que una alta abundancia de *L. lecanii* al comienzo del período de alta actividad de la roya, puede desempeñar un papel importante en la prevención de un brote de roya al restringir la reproducción de esta antes de que tenga la oportunidad de convertirse en una epidemia local.

De acuerdo a Jackson (2002) y Vandermeer (2009) se consideró que el hongo *Hemileia vastatrix* podía ser suprimido con la acción de microorganismos endofíticos, por lo que se estudió el efecto de organismos como *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aureofaciens*, *P. alcaligenis*, *P. putida* y *Lecanicillium lecanii*. Con cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas en Colombia, se produjeron inhibiciones en la germinación de la Roya entre 77 y 97 % (FAO 2015). Avelino y Rivas (2013)

determinaron que *L. lecanii* tiene la capacidad de parasitar la roya y disminuir la cantidad de inóculo primario para la epidemia del hongo del año siguiente.

3.4 Hongo *Lecanicillium lecanii*

De acuerdo al Centro Nacional para la Información Biotecnológica de EU (NCBI) que toma como referencia a Zare y Grams (2001) la clasificación taxonómica para *Lecanicillium lecanii* es la siguiente:

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Subdivisión: Ascomycotina

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Género: *Lecanicillium*

Especie: *L. lecanii*

Lecanicillium lecanii posee una amplia distribución mundial, desde Asia, Europa, América y algunas islas del Caribe. Este hongo ha sido aislado de sustratos como suelo, otros hongos, así como de insectos en todas sus etapas de desarrollo (Retana 2006). *L. lecanii* puede crecer en un ámbito de temperatura entre 4C⁰ y 30C⁰ sin presentar crecimiento a más de 35C⁰ (Cuthbertson et al. 2005) (Lopez & Carbonell 1999). De acuerdo a Ayala et al. (2005) el crecimiento óptimo del hongo, así como su mayor tasa de infección se presenta a una temperatura de 25C⁰. La humedad relativa óptima para la germinación de los conidios se encuentra entre 90 y 95%. Estas condiciones son críticas en las etapas iniciales de germinación, sin embargo no son tan determinantes en lo que

respecta a invasión, perforación y penetración del hongo, debido a que estas etapas se pueden realizar en condiciones de humedad relativamente bajas (Inglis et al. 2001). El modo de acción de *Lecanicillium lecanii* es por contacto, hiperparasitando otros hongos, entre ellos la roya. Una vez que las esporas de *L. lecanii* entran en contacto con el patógeno se da una liberación de enzimas, como la β -1,3-glucanasa, quitinasas, amilasas y proteasas, las cuales causan alteraciones en la paredes celulares del hospedero, permitiendo que las hifas de penetración de *L. lecanii* ingresen. Posteriormente se observa una desorganización del citoplasma en las células del patógeno, debido a la pérdida de turgencia de las células y contorsión de la pared celular. Por último las células atacadas colapsan, reduciendo su protoplasma debido a la extensa multiplicación del antagonista y al estar totalmente rodeado por este. Luego se da la liberación de las esporas de *Lecanicillium lecanii* de las células muertas del hospedero (Askary et al. 1997).

4 Metodología

La práctica se llevó a cabo en la Hacienda Juan Viñas, ubicada en el cantón de Jiménez, Costa Rica, a una altitud de 1165 msnm. Se utilizaron plantas de café (*Coffea arabica*) variedad Caturra, sembrado a una distancia de 1 m. entre plantas y 2 m. entre hileras. El suelo de la finca seleccionada se clasifica como ultisol, con una topografía con pendiente leve.

4.1 Procedencia del hongo

El Hongo *Lecanicillium lecanii* se obtuvo del producto comercial Lecano el cual es producido por la empresa BIOTECH CR GRM S.A. ubicada en Oreamuno de Cartago.

4.2 Información del producto

Lecano es un producto a base del hongo *Lecanicillium lecanii* el cual se obtuvo mediante aislamiento de suelo y lesiones de roya (*Hemileia vastatrix*) del café. Cada gramo de producto posee una concentración de $1,0 \times 10^9$ conidios viables del hongo, y cuenta con una germinación y pureza mayor del 95%. El ingrediente activo del producto son conidias o esporas del hongo. Su mecanismo de acción es por contacto; la espora se adhiere a la lesión de roya, germina y parasita las uredósporas o esporas de la roya. Posteriormente la lesión de roya se torna de color blanco, característico de *L. lecanii*. Este producto viene en una presentación en polvo y la dosis recomendada es de 1 kg/ha.

4.3 Evaluación de calidad del producto

Para verificar la calidad del producto se realizó un análisis en el laboratorio de Bioquímica de los Procesos Orgánicos del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) y los resultados fueron los siguientes:

Cuadro 1. Análisis de calidad del producto Lecano realizado en el laboratorio de CIA.

Conidios viables por gramo	Concentración (u.f.c./g)	Viabilidad (%)	Pureza (%)
$1,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^5$	100	56

De acuerdo a lo indicado en la etiqueta y ficha técnica del producto, tanto los conidios viables, concentración y viabilidad, están dentro de los rangos aceptables para estos productos, el único valor que no indica lo expresado en la etiqueta es la pureza, la cual debe ser mayor al 95%. Esta disminución en la pureza se debe a la presencia de bacterias contaminantes detectadas en el método de recuento, que indica únicamente la concentración de bacterias totales presentes en la muestra.

4.4 Información del Coadyuvante

Carrier es un aceite vegetal derivado del proceso del grano de soya. Se usa 93 % de este aceite y el resto es material inerte y solventes que se usan para darle las propiedades que este producto presenta para la protección de agroquímicos en general. Entre las propiedades que aporta están:

- **Encapsulador.** Esta propiedad permite que se haga una película de aceite que se adhiere a la molécula del producto, protegiéndolo así de la acción de los factores, especialmente el pH del agua, los metales y las partículas de arcilla y limo en suspensión que estén presentes en ella.
- **Adherente.** Esta propiedad hace que el producto pueda adherirse a la superficie en donde se aplicó.
- **Surfactante.** Esta propiedad permite romper la tensión superficial del agua, dando como consecuencia de ello, una gota pequeña que permite una mayor área de cobertura y, por lo tanto, habrá un mayor efecto del producto aplicado.
- **Antideriva.** Evita que el viento se lleve el producto y lo deposite en lugares no deseados.

4.5 Tratamientos

Se realizaron 7 tratamientos, el primero consistió en el manejo convencional que realiza la finca, en el cual se aplican fungicidas, este se consideró como el testigo, los demás tratamientos consistieron en una rotación de fungicida con Lecano en diversas dosis y en presencia o no de coadyuvante, estos se detallan en el cuadro 1. La primera aplicación se realizó el 26 de junio de 2015, y la última aplicación fue el 4 de mayo de 2016.

Cuadro 2. Tratamientos aplicados en el campo para determinar la efectividad del producto Lecano sobre la roya del café.

Número de Tratamiento	Tratamientos			
	1 aplicación	2 aplicación	3 aplicación	4 aplicación
1	Duett 25 SC	Atemi 10	Soprano	Atemi 10
2	Duett 25 SC	Lecano (1kg/ha)	Soprano	Lecano (1kg/ha)
3	Duett 25 SC	Lecano (1kg/ha) + Carrier	Soprano	Lecano (1kg/ha) + Carrier
4	Duett 25 SC	Lecano (1,5kg/ha)	Soprano	Lecano (1,5kg/ha)
5	Duett 25 SC	Lecano (1,5kg/ha) + Carrier	Soprano	Lecano (1,5kg/ha) + Carrier
6	Duett 25 SC	Lecano (2kg/ha)	Soprano	Lecano (2kg/ha)
7	Duett 25 SC	Lecano (2kg/ha) + Carrier	Soprano	Lecano (2kg/ha) + Carrier

Nota: El coadyuvante Carrier se aplicará en una dosis de 1:1

Cuadro 3. Fungicidas, ingrediente activo y dosis utilizadas por la empresa Juan Viñas para el combate de la roya (*Hemileia vastatrix*).

Fungicida	Ingrediente Activo	Dosis
Duett 25 SC	Epoxiconazole (12,5g) + Carbendazim (12,5g)	400cc/ha
Soprano	Epoxiconazole (12,5g) + Carbendazim (12,5g)	400cc/ha
Atemi 10 WG	Ciproconazol	400cc/ha

4.6 Diseño y establecimiento de la práctica

Se determinó el área bajo la curva para la incidencia y severidad, además se realizó un análisis de varianza ANOVA así como una prueba de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) utilizando el programa InfoStat.

Se establecieron 7 lotes de 150 plantas cada uno, lo que equivale a 1050 plantas en total. Dentro de cada lote se establecieron 5 estaciones de muestreo, y en cada estación se tomaron 2 plantas. Los tratamientos se ubicaron al azar. La distribución de las estaciones dentro de cada lote se hizo de manera sistemática, de manera que se logre la mayor cobertura del lote. El producto se aplicó en las horas de la mañana por medio de una bomba de motor de 25 litros (Figura 1).



Figura 1. Aplicación de Lecano en la finca de Hacienda Juan Viñas, cantón de Jiménez.

4.7 Mecanismos de evaluación

Se realizó la primera evaluación quince días luego de la aplicación inicial; la cual fue el 26 de junio, luego de esto se realizaron evaluaciones quincenales desde la primera aplicación, para un total de 18 evaluaciones. Se realizaron los muestreos en 2 bandolas opuestas de la planta ubicadas en el tercio medio de la misma. Para determinar la incidencia de roya, se contó el número total de hojas por bandola, así como la cantidad de hojas afectadas con la enfermedad. En cada evaluación se contabilizó únicamente las lesiones de roya esporuladas, para determinar si la enfermedad estaba o no presente en las hojas. Luego se dividió la cantidad de hojas enfermas en la bandola, entre la cantidad total de hojas y el resultado se multiplicó por 100.

$$\text{Incidencia (\%)} = \frac{\text{Hojas enfermas en bandola}}{\text{Total de hojas en bandola}} \times 100$$

Para evaluar la severidad de la roya en las hojas de café, se utilizó el procedimiento recomendado por SAGARPA (2013) (cuadro 3) el cual consiste en emplear una escala donde se presenta un porcentaje de daño desde el grado cero, que representa la hoja completamente sana, hasta grado 4, que es una hoja con más del 50 % de su área afectada como se aprecia en la figura 3. Para determinar la severidad se consideró como área afectada únicamente el área donde se observaba la lesión de roya con esporas, mientras las lesiones no esporuladas no se contabilizaron como área afectada. Para determinar la severidad en los tratamientos que incluían al hongo *Lecanicillium lecanii* las lesiones de roya cubiertas por *L. lecanii* se consideraron como área donde la roya había sido combatida. Para los muestreos únicamente se consideraron las lesiones donde se observaba desarrollo del hongo fitopatogeno, ya que una vez que Lecano colonizaba la lesión no había posterior desarrollo de micelio ni esporulación, por lo tanto no se consideró oportuno tomar en cuenta estas áreas ya combatidas para posteriores cálculos de severidad. Para mayor claridad se puede observar la figura 2, donde se muestran las distintas lesiones de roya mencionadas.



Figura 2. Lesiones de roya observadas en el campo. A). Lesión de roya con esporas. B). Lesión de roya en ausencia de esporas. C). Lesión de roya parasitada por el hongo *Lecanicillium lecanii*.

Cuadro 4. Escala de Severidad para roya (SAGARPA 2013).

GRADO	HOJA (% DAÑO)
0	Sano sin síntomas visibles
1	1-5 % de área afectada
2	6-20 % de área afectada
3	21-50 % de área afectada
4	> 50% de área afectada

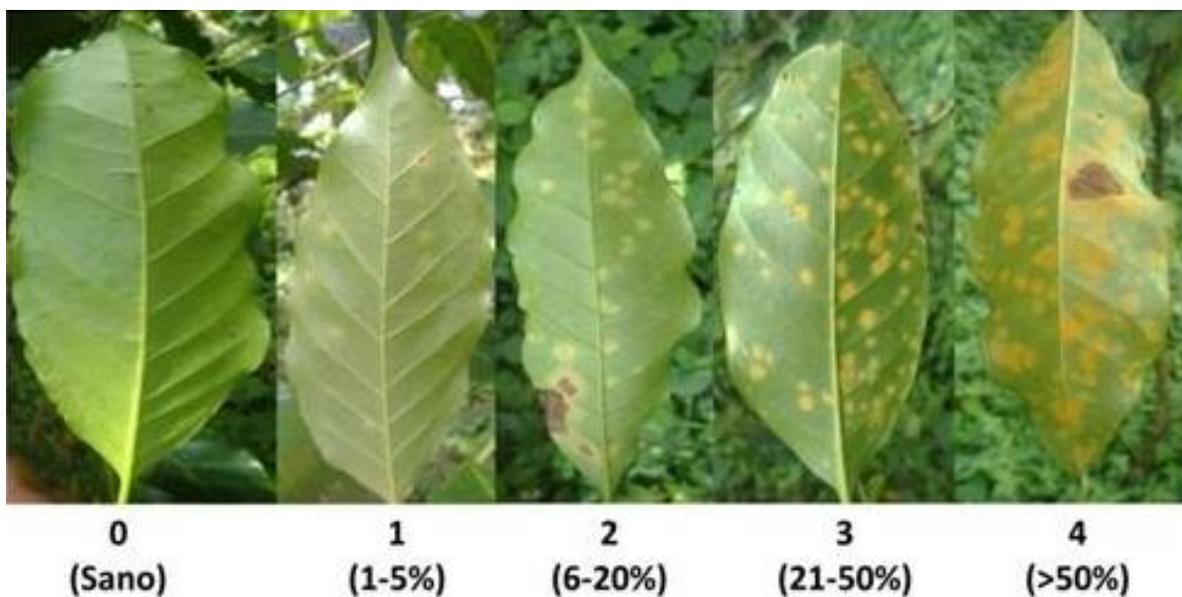


Figura 3. Diagrama del grado de la escala de Severidad (SAGARPA 2013).

La determinación de la severidad de la roya se calculó con la fórmula:

$$SEV = \frac{(N_0 \cdot 0) + (N_1 \cdot 1) + (N_2 \cdot 2) + (N_3 \cdot 3) + (N_4 \cdot 4)}{N \cdot 4} \times 100$$

Dónde:

N₀ = # Hojas con valor 0 de la escala.

N₁ = # Hojas con valor 1 de la escala.

N₂ = # Hojas con valor 2 de la escala.

N₃ = # Hojas con valor 3 de la escala.

N₄ = # Hojas con valor 4 de la escala.

5 Resultados

5.1 Incidencia

En la figura 4 se muestran los datos climatológicos que se presentaron durante el transcurso de la práctica.

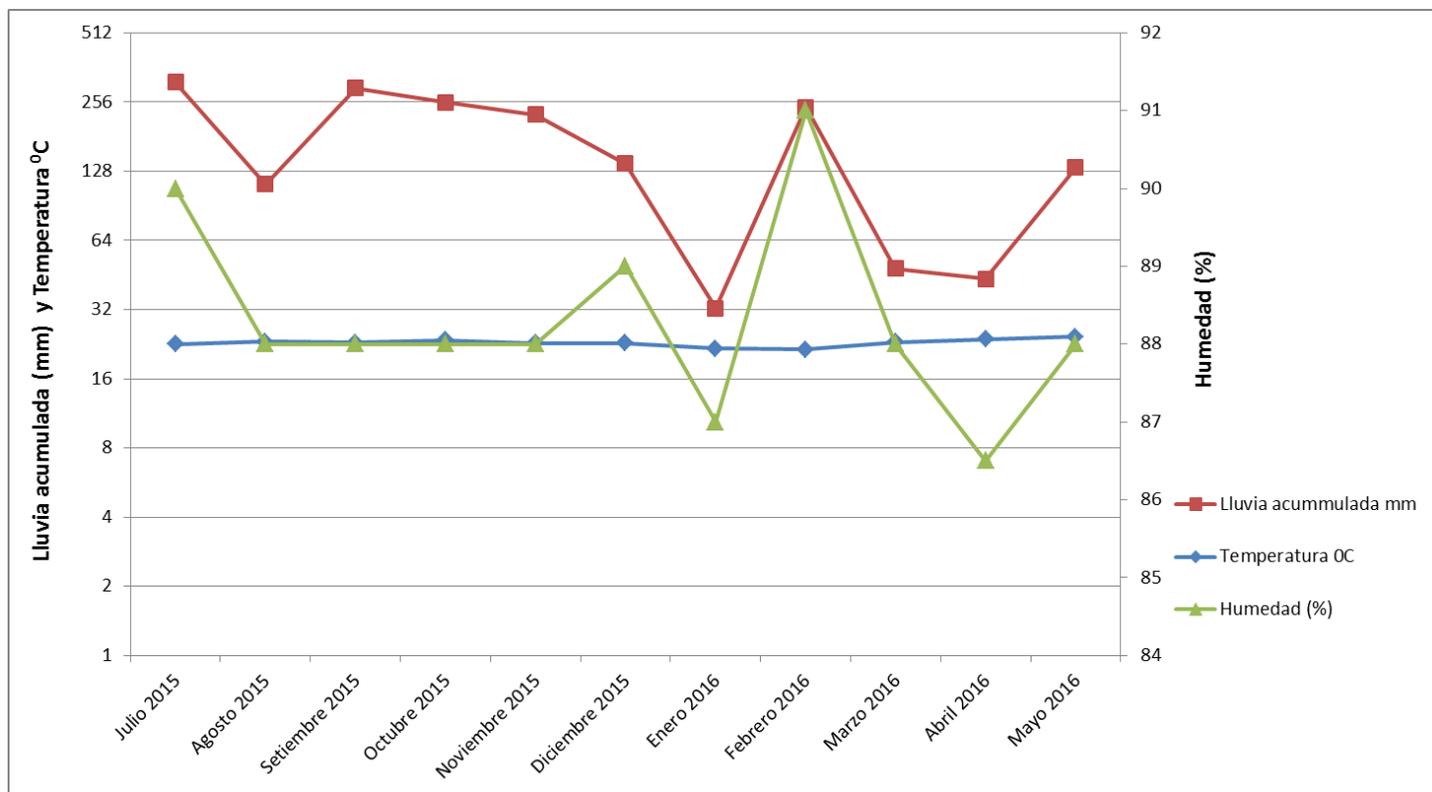


Figura 4. Datos climatológicos de la zona de Juan Viñas, durante el desarrollo de la práctica. Fuente: ICAFE

En la figura 5 se observan los niveles de incidencia de *Hemileia vastatrix* en el transcurso de la práctica.

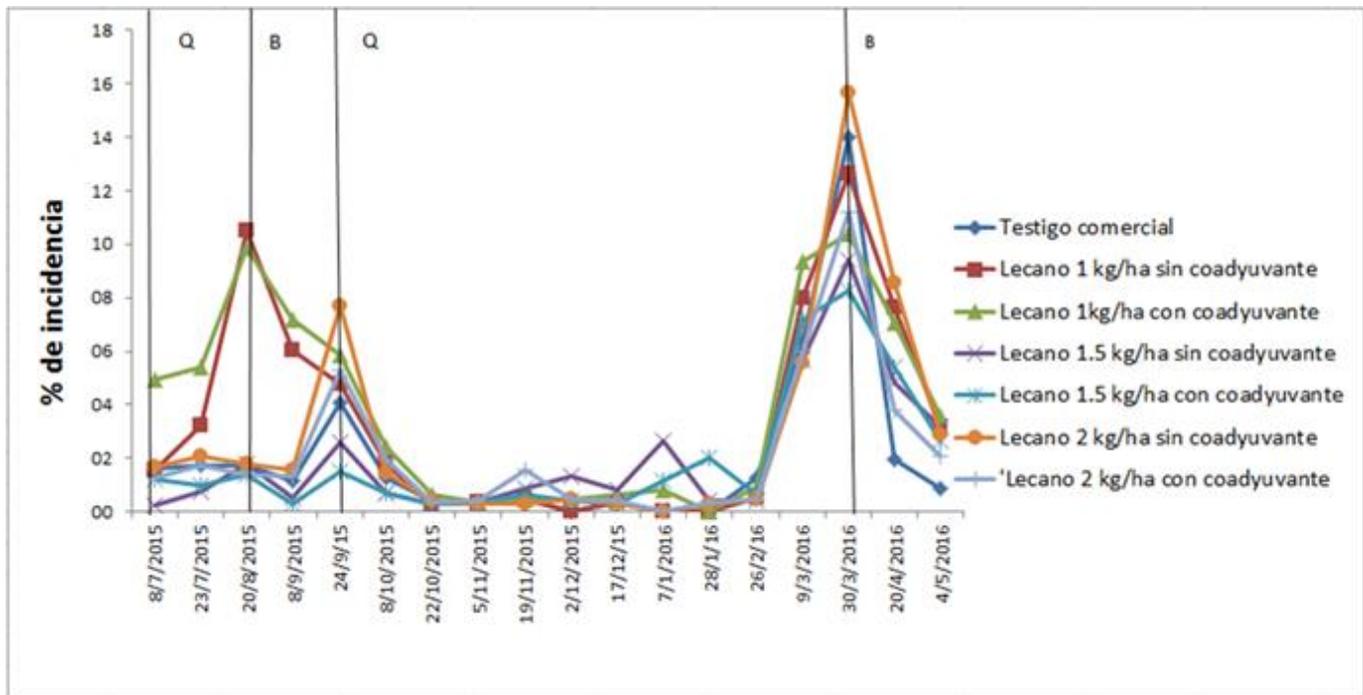


Figura 5. Porcentaje de incidencia a través del tiempo en cada uno de los tratamientos al aplicar el producto químico (Q) y biológico (B).

Las evaluaciones iniciaron 15 días luego de una primera aplicación de fungicidas químicos. En los meses de agosto y setiembre del 2015 se presentó un aumento en la incidencia de roya, llegando a valores superiores a 8%. En este periodo se realizó la primera aplicación de *Lecanicillium lecanii* y posteriormente la segunda aplicación de fungicidas químicos. Luego se dio una disminución en la incidencia de la enfermedad, permaneciendo por debajo del 2% durante un periodo de cinco meses. Durante el mes de marzo del 2016 se dio un nuevo incremento en la incidencia de la enfermedad, por lo que se realizó la segunda aplicación del hongo antagonista de la roya.

En el cuadro 5 se muestran los valores de incidencia de roya para la secuencia de productos donde se aplicó Lecano. En el cuadro se muestra únicamente las diferentes

dosis del producto biológico para mejor comprensión y tomando en cuenta que el único factor que diferencia a los tres tratamientos es la dosis de Lecano.

Cuadro 5. Índice de incidencia de roya bajo las tres dosis utilizadas.

Dosis Producto	Índice de incidencia de roya
Lecano 1kg/ha	1599,60 (B)
Lecano 1,5kg/ha	1088,29 (A)
Lecano 2 kg/ha	1257,29 (A)

Nota: La presencia de letras iguales significa que los tratamientos no presentan diferencias estadísticas.

Se observa que las dosis de 1,5 kg/ha y 2 kg/ha presentaron los menores índices de incidencia, y estadísticamente se comportaron igual, mientras la dosis de 1kg/ha presentó la mayor incidencia de roya.

La figura 6 muestra el comportamiento de los 7 tratamientos evaluados durante la práctica.

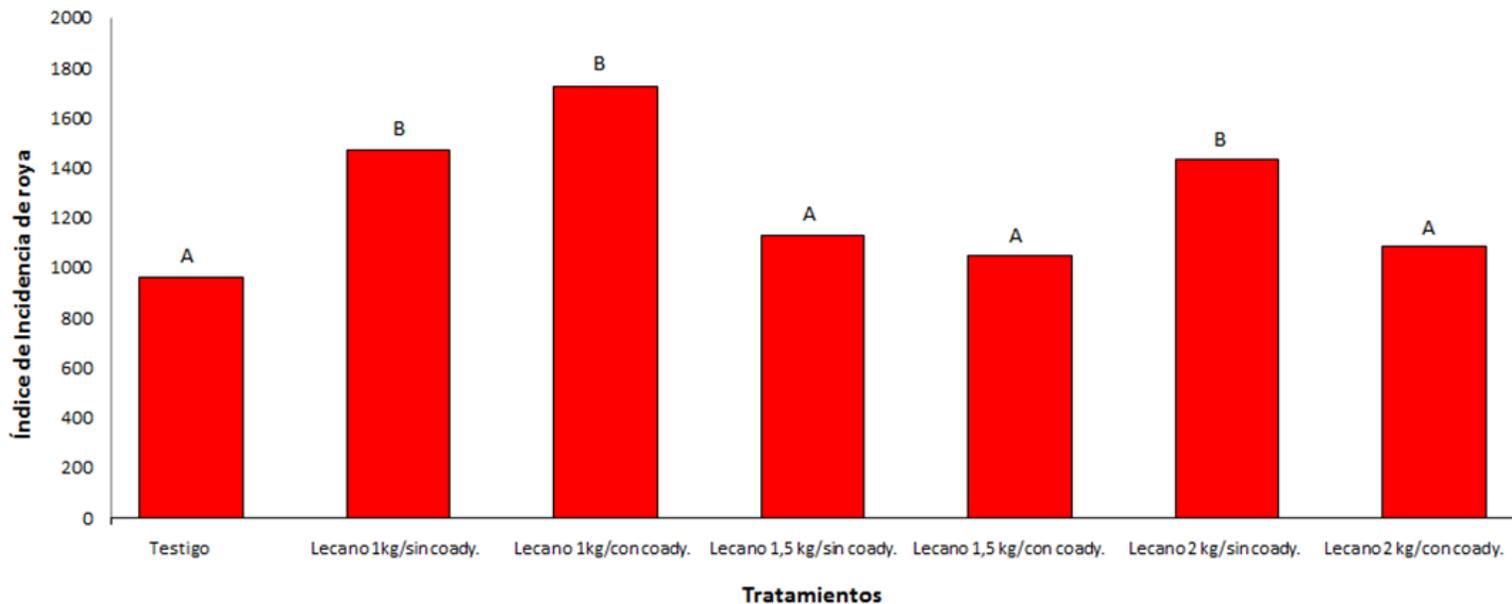


Figura 6. . Índice de incidencia de roya de los 7 tratamientos utilizados durante la práctica.¹

Los tratamientos que presentaron una menor incidencia y por ende un mejor combate de la enfermedad fueron los tratamientos de la secuencia de productos donde se encontraba la dosis de Lecano 1,5Kg/ha y el testigo, el cual consistía en la aplicación únicamente de fungicidas químicos. Estos tratamientos se comportaron estadísticamente de igual forma. Mientras el tratamiento que presentó la mayor incidencia de roya fue el de 1kg/ha.

En cuanto al efecto sobre la incidencia de la roya al aplicar el producto a base de *L. lecanii* junto con un coadyuvante, no se presentaron diferencias estadísticas con respecto al uso o no de este en las 3 dosis evaluadas (el anexo 3 muestra el análisis estadístico).

¹ En cada grafico la presencia de letras iguales significa que los tratamientos no presentan diferencias estadísticas.

5.2 Severidad

En la figura 7 se observa como en los meses de agosto y setiembre del 2015 se presentó un aumento en la severidad de roya. En este periodo se realizó la primera aplicación de *Lecanicillium lecanii* y posteriormente la segunda aplicación de fungicidas químicos.

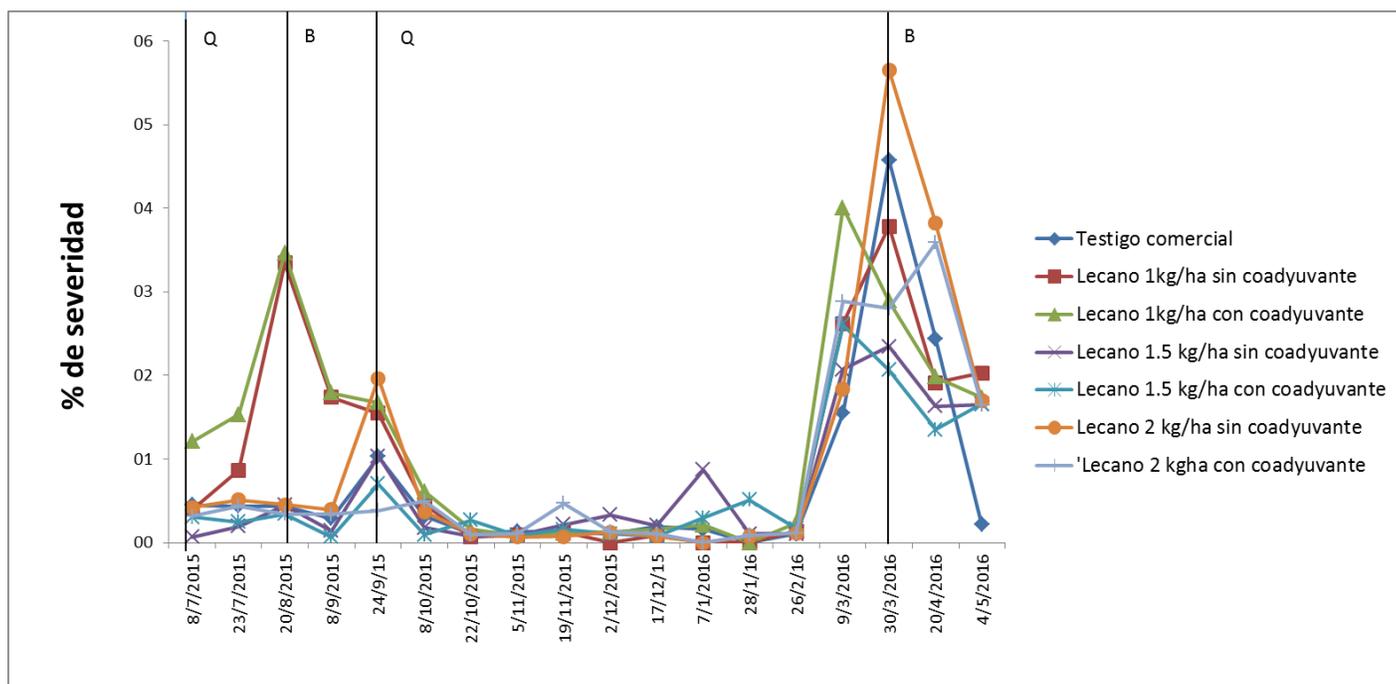


Figura 7. Porcentaje de severidad a través del tiempo en cada uno de los tratamientos al aplicar el producto químico (Q) y biológico (B).

La ausencia de roya por un periodo de cinco meses causó que la severidad se mantuviera baja desde octubre de 2015 hasta febrero de 2016. Durante el mes de marzo del 2016 se dio un nuevo incremento en la severidad de la roya, por lo que se realizó la segunda aplicación de Lecano.

La figura 8 muestra el comportamiento de los 7 tratamientos respecto a la severidad, evaluados durante la práctica.

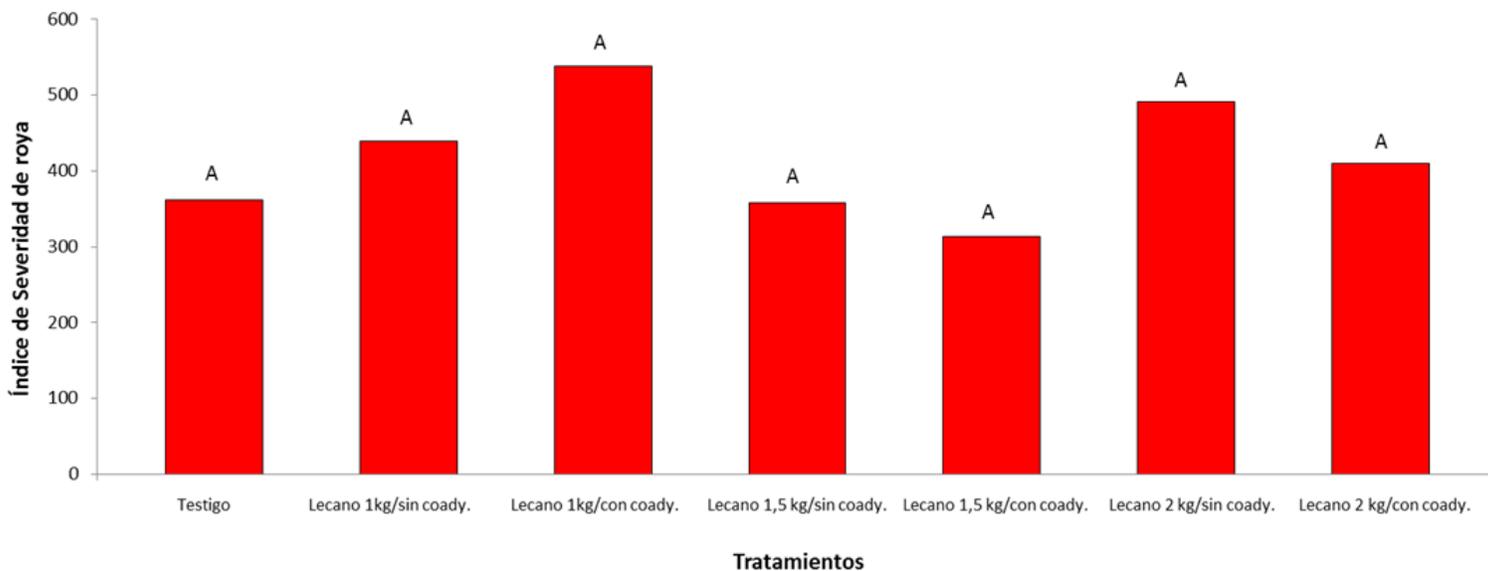


Figura 8. Índice de severidad de roya de los 7 tratamientos utilizados durante la práctica.

En el caso de la severidad, como se observa en la figura 8, estadísticamente no se presentaron diferencias en ninguno de los tratamientos.

De igual manera que la incidencia, el efecto del coadyuvante en combinación con Lecano no presentó diferencias significativas respecto a la severidad para las 3 dosis evaluadas.

Discusión

Con base en los resultados obtenidos en la figura 5 y 7, y en comparación con los datos meteorológicos presentados en la figura 4, en el mes de julio de 2015 y febrero de 2016 se presentaron las condiciones de humedad, precipitación y temperatura necesarias para la germinación de las uredósporas de la roya, como lo indica De Jones et al. (1987) y Virginio y Astorga (2015) donde mencionan que para la germinación de las esporas de *Hemileia vastatrix* y formación del apresorio se requiere de temperaturas entre los 21 y 25 °C así como la presencia de agua libre por al menos seis horas. También Avelino y Rivas (2013) afirman que la humedad relativa y la mojadura de la hoja tienen un efecto sobre la germinación de la uredóspora de la roya, ya que cuando hay alta humedad relativa en el ambiente, se mejora la disponibilidad de agua, y los tejidos (hojas, frutos y ramas) permanecen húmedos, lo que favorece la germinación de la uredospora y la proliferación de la infección. Las condiciones mostradas, también favorecieron el desarrollo del hongo *Lecanicillium lecanii*, ya que como menciona Ayala et al. (2005) la mayor tasa de crecimiento de *L. lecanii* se produce a 25 °C con una elevada humedad relativa.

Al presentarse estas condiciones, se dio un incremento en la incidencia de la roya en los meses de agosto del 2015 y marzo del 2016 llegando a valores suficientemente elevados para realizar una aplicación, como se muestra en la figura 5. En ese momento se aplicó el producto Lecano, y como se observó en las evaluaciones posteriores, ya se presentaron lesiones de roya hiperparasitadas por el hongo (figura 9) y por consiguiente, se dio una disminución en la incidencia de la roya.



Figura 9. Lesiones de roya (*Hemileia vastatrix*) parasitadas por *Lecanicillium lecanii*.

Al evaluar las secuencias de productos que incluían las 3 dosis de Lecano utilizadas en la práctica se recomendaría utilizar el tratamiento de 1,5 kg/ha ya que al ser la dosis más baja con la que se presentó la menor incidencia, el costo económico de su aplicación será el más bajo. Respecto al uso de coadyuvante, como se mencionó en los resultados, no se presentaron diferencias significativas en la incidencia ni en la severidad, al usar o no coadyuvante junto con Lecano. Resultados similares obtuvieron Wraight *et al.* (2001) que no encontraron un efecto sinérgico del coadyuvante con el biocontrolador. Por ende se podría aplicar únicamente el producto, disminuyendo los costos de adicionar un coadyuvante y obteniendo los mismos resultados en el control de la roya.

Por otra parte al observar el índice de incidencia de roya, en la figura 6, y de acuerdo al análisis estadístico presente en el anexo 1, se encontró que los mejores tratamientos para el combate de la roya fueron el testigo y el tratamiento de 1,5kg/ha. En el caso del tratamiento testigo, se obtuvo un resultado congruente con lo reportado por otros autores, como García (2013) donde probó diferentes alternativas químicas para el combate de la roya, obteniendo que los triazoles mostraron los mejores resultados en aplicaciones consecutivas. Sin embargo no recomendó este tratamiento, debido a la “probabilidad de desarrollo de resistencia del hongo”. La disminución de la incidencia en el caso de *Lecanicillium lecanii* se puede deber, como menciona Saksirirat y Hope (1991) a que este hongo tiene la capacidad de producir enzimas líticas, como la β -1,3-glucanasa, quitinasas, amilasas y proteasas. Estas enzimas facilitan la degradación de la pared celular de las uredósporas, la cual está compuesta principalmente de β -glucanos y quitina, y permiten la penetración de los apresorios en el interior del hospedero, luego se da el ingreso de las hifas de penetración, para continuar su desarrollo sobre el patógeno (Velez & Rosillo 1995).

6 Conclusiones

- El uso o no de coadyuvante junto a *Lecanicillium lecanii* no representó una diferencia para el combate de la enfermedad.
- Respecto a la incidencia, de las 3 dosis de Lecano evaluadas, y tomando en cuenta el costo del producto, la secuencia que incluía la dosis de Lecano a 1,5 kg/ha es la más eficiente para el combate biológico de la roya.

- El hongo *Lecanicillium lecanii* en una dosis de 1,5 kg/ha incluido en una rotación de productos químicos tuvo un comportamiento similar respecto a la incidencia al obtenido en rotación únicamente con productos químicos para el combate de roya.
- Debido a las condiciones de humedad y temperatura necesarias para el establecimiento de *Lecanicillium lecanii* se recomienda realizar las aplicaciones al inicio de la época lluviosa.
- Se requieren más trabajos de investigación sobre combate biológico de la roya, ya que las opciones de combate son limitadas.

7 Literatura citada

ALAVO, J. 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.

ASKARY, H., BENHAMOU, N., BRODEUR, J. 1997. Ultrastructural and cytochemical investigations of the antagonistic effect of *Verticillium lecanii* on cucumber powdery mildew. *Phytopathology* 87:359-368.

- AVELINO, J., ESQUES, A., SANTACREO, R.B., RAPIDEL, B. 1999. La roya anaranjada del cafeto: mito y realidad. Desafíos de la caficultura en Centroamérica. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). 193-241.
- AVELINO, J., RIVAS, G. 2013. La roya anaranjada del cafeto. hal-01071036. Consultado en HAL archives-ouvertes.fr.
- AYALA, M.A., MIER, T., SÁNCHEZ, J., TORIELLO, C. 2005. Variabilidad intraespecífica del crecimiento de *Lecanicillium Lecanii* (*verticillium lecanii*) por efecto de la temperatura. Revista Mexicana de Micología. 20: 93-97.
- BARQUERO, M. 2013. Recomendaciones para el combate de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*). Instituto del café de Costa Rica, centro de investigaciones en café (CICAFE). Barva, Heredia, Costa Rica. 63 p.
- CORTEZ, H. 2006. Efecto de Coadyuvantes en *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare y Gams y su Virulencia hacia *Toxoptera aurantii* Boyer. Revista mexicana de fitopatología. 24 (1): 59-64.
- CRISTANCHO A.M., ESCOBAR O.C., OCAMPO, J.D. 2007. Evolución de razas de *Hemileia vastatrix* en Colombia. Cenicafé 58(4): 340-359.
- CUTHBERTSON A., NORTH J.P., WALTERS, K.F. 2005. Effect of temperature and host plant leaf morphology on the efficacy of two entomopathogenic biocontrol agents of *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae). Bulletin of Entomological Research. 95: 321-327.

- DE JONG, E., ESKES, A., HOOGSTRATEN, J., ZADOKS, J. 1987. Temperature requirements for germination, germ tube growth and appressorium formation of urediospores of *Hemileia vastatrix*. Netherlands Journal of Plant Pathology (2): 61-71.
- ESKES A.B., MENDES M.D., Robbs C.F. 1991. Laboratory and field studies on parasitism of *Hemileia vastatrix* with *Verticillium lecanii* and *V. leptobactrum*. Café Cacao Thé 35 (4): 275-282.
- FERNANDES, R.C., EVANS, H.C., BARRETO, R.W. 2009. Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. Tropical Plant Pathology. 34(2): 108-113.
- GARCIA, D. 2013. Incidencia y severidad de la roya del café (*Hemileia vastatrix*) y evaluación de alternativas químicas para su control. Tesis de licenciatura. Universidad Rafael Landívar. 61 p.
- INGLIS, G., GOETTEL, M., BUTT, T., STRASSER, H. 2001. Use of hyphomycetes fungi for managing insect pests. CABI publishing. Wallingford. United Kingdom. 401 p.
- INSTITUTO DEL CAFÉ DE COSTA RICA (ICAPE). 2011. Guía Técnica para el Cultivo del Café. Centro de investigación en café. 1a ed. Heredia, Costa Rica. 72 p.
- INSTITUTO DEL CAFÉ DE COSTA RICA (ICAPE). 2015. Informe sobre la actualidad cafetalera de Costa Rica. Costa Rica. 109 p.
- INSTITUTO DEL CAFÉ DE COSTA RICA (ICAPE). 2015. Regiones Cafetaleras de Costa Rica. Consultado el 15 de marzo 2016.

- INSTITUTO DEL CAFÉ DE COSTA RICA (ICAFFE). 2015. Variedad Obatá: Tolerante a la roya del cafeto y buena calidad de taza.
- INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y CENSOS (INEC). 2015. VI Censo Nacional Agropecuario: Resultados Generales. 1 ed. San José, Costa Rica. 146 p.
- 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: 89–97.
- JACKSON, D., ZEMENICK, K., HUERTA, G. 2012. Occurrence in the soil and dispersal of *Lecanicillium lecanii*, a fungal pathogen of the green coffee scale (*Coccus viridis*) and coffee rust (*Hemileia vastatrix*). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15: 389 – 401.
- LOPEZ, L. V., CARBONELL, T. 1999. Characterization of Spanish strains of *Verticillium lecanii*. *Revista Iberoamericana de Micología* 16(3): 136-142.
- MACDONALD, A.J., JACKSON, D., ZEMENICK, K. 2013. Indirect Effects of a Fungal Entomopathogen, *Lecanicillium lecanii* (Hypocreales: Clavicipitaceae), on a Coffee Agroecosystem Ant Community. *Community & ecosystem ecology*. 42 (4): 658-667.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA (MAG). 2007. Plan estratégico de la cadena productiva de café. Costa Rica. 103 p.
- OLIVER, R.P 2014. A reassessment of the risk of rust fungi developing resistance to fungicides. *Pest Management Science*. 70 (11):1641–1645.

- ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA (FAO). 2015. Manejo agroecológico de la roya del café. Panamá. 96 p.
- PAIVA, B.R., DE SOUZA, P.E., SCALCO, M.S., ALVARENGA S. 2011. Progress of rust in coffee plants in various densities of cultivation in irrigated planting after pruning. *Ciencia e Agrotecnologia*. 35(1): 137-143.
- PERFECTO, I., VANDERMEER, J. 2015. *Coffee Agroecology: A New Approach to Understanding Agricultural Biodiversity, Ecosystem Services and Sustainable Development*. 1 ed. Editorial Routledge. New York, U.S.A. 358 p.
- RAYNER, R.W. 1961. Germination and penetration studies on coffee rust (*Hemileia vastatrix* B. & Br.). *Annals of Applied Biology*. 49(3): 497-505.
- RETANA, X.D. 2006. Descripción del hongo *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium lecanii*) y su papel en el control biológico de plagas. Tesis de licenciatura. Universidad de Costa Rica. San Jose, Costa Rica. 62 p.
- RETANA, X.D. 2006. Descripción del hongo *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium lecanii*) y su papel en el control biológico de plagas. Tesis de licenciatura. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 54 p.
- RIVILLAS, O.C., SERNA, G.C., CRISTANCHO, A.M., GAITÁN, B.A. 2011. La Roya del Cafeto en Colombia (Impacto, manejos y costos del control, resultados de investigación). Centro Nacional de Investigación del Café (CENICAFÉ). Chinchiná, Caldas, Colombia. 53 pp.

SAKSIRIRAT, W., HOPPE, H. 1991. Secretion of extracellular enzymes by *Verticillium psalliotae* Treschow and *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas during growth on uredospores of the soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in liquid cultures. J. Phytopathology (131): 161-173.

SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN (SAGARPA). 2013. Ficha técnica roya del café *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México 28 p.

SISTEMA NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA FITOSANITARIA. 2013. Ficha técnica roya del cafeto *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome. 28 p.

SUBERO, L. 2005. La roya del café (en línea). Consultado 8 junio 2016. Disponible en: <http://www.infocafes.com/descargas/biblioteca/136.pdf>

TRINIDAD, J. 2014. Efecto de la sombra del café y el manejo sobre la incidencia, severidad, cantidad de inóculo y dispersión de *Hemileia vastatrix* en Turrialba, Costa Rica. Tesis de Maestría. Centro Agronómico tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica 79 p.

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: 636–64.

- VELEZ, P., ROSILLO, A. 1995. Evaluación del antagonismo del hongo *Verticillium lecanii*, sobre *Hemileia vastatrix*, en condiciones de. Invernadero y de campo. CENICAFE. 46(1): 45-55.
- VIRGINIO, E., ASTORGA, C. 2015. Prevención y control de la roya del café. Manual de buenas prácticas para técnicos y facilitadores. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Manual técnico no. 131. 98 p.
- WILLIAMS, M., EDMONDSON, R.N., GILL, G. 2000. The potential of some adjuvants in promoting infection with *Verticillium lecanii*: laboratory bioassays with *Myzus persicae*. Ann. appl. Biol. 137: 337—345.
- WRAIGHT, S., JACKSON, M., KOCK, L. 2001. Fungi as Biocontrol Agents Progress, Problems and Potential. 1. Ed. Cabi Publishing. New York, USA. 391 p.
- ZAMBOLLIN, L. 2013. Simposio sobre roya del cafeto. Universidad de Costa Rica (UCR). Turrialba, Costa Rica, Consultado el 13 de junio 2016.
- ZARE, R., Grams, W. 2001. A revisión of *Verticillium* section protata. IV. The genera and *simplicillium* gen. nov. Nova Hedwigia. 73: 1-50.

8 Anexos

Anexo 1. Análisis estadístico de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) respecto a la incidencia de roya para las tres dosis utilizadas junto con el testigo durante la práctica.

Análisis de la varianza					
Incidencia					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamiento	9454797,35	6	1575799,56	2,97	0,0093
Test:DGC Alfa=0,05					
Dosis prod.	Medias	n	E.E.		
testigo	962,39	20	162,81	A	
lecano 1,5 kgcon coady.	1047,02	20	162,81	A	
lecano 2 kgcon coady.	1085,71	20	162,81	A	
lecano 1,5 kgsin coady.	1129,56	20	162,81	A	
lecano 2 kgsin coady.	1430,14	20	162,81		B
lecano 1kgsin coady.	1473,14	20	162,81		B
lecano 1kgcon coady.	1726,05	20	162,81		B
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)					

Anexo 2. Análisis estadístico de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) respecto al uso de coadyuvante para las tres dosis utilizadas en base a la incidencia.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
coadyuvante	100998,89	1	100998,89	0,18	0,6718
coadyuvante	Medias	n	E.E.		
con coady.	1286,26	60	96,58		A
sin coady.	1344,28	60	96,58		A
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)					

Anexo 3. Análisis estadístico de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) respecto a la severidad de roya para de las tres dosis utilizadas junto con el testigo durante la práctica.

Análisis de la varianza					
Severidad					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamiento	756329,19	6	126054,86	1,62	0,146
Test:DGC Alfa=0,05					
Dosis prod.	Medias	n	E.E.		
lecano 1,5 kgcon coady.	313,79	20	62,35	A	
lecano 1,5 kgsin coady.	358,13	20	62,35	A	
testigo	361,36	20	62,35	A	
lecano 2 kgcon coady.	410,08	20	62,35	A	
lecano 1kgsin coady.	439,18	20	62,35	A	
lecano 2 kgsin coady.	490,64	20	62,35	A	
lecano 1kgcon coady.	538,04	20	62,35	A	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)					

Anexo 4. Análisis estadístico de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) respecto al uso de coadyuvante para las tres dosis utilizadas en base a la severidad.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
coadyuvante	2259,3	1	2259,3	0,03	0,8682
Test:DGC Alfa=0,05					
coadyuvante	Medias	n	E.E.		
con coady.	420,64	60	36,9	A	
sin coady.	429,32	60	36,9	A	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)					