

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE EL ALTO
VICERRECTORADO
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN, EXTENSIÓN AGRÍCOLA Y POSGRADO-
INGENIERÍA AGRONÓMICA



**“EVALUACIÓN DE DIFERENTES SUSTRATOS DE REPRODUCCIÓN DEL
HONGO *Lecanicillium* spp. Y PATOGENICIDAD SOBRE LA ROYA DEL CAFÉ
(*Hemileia vastatrix*) A NIVEL LABORATORIO”**

PROYECTO FINANCIADO CON RECURSOS PROPIOS

Resolución “HCC” N° 549/2021

EQUIPO DE INVESTIGADORES:

Ing. MSc. Rogelio Maydana Apaza
Univ. Joaquín Quispe Ventura
Univ. Verónica María Chambi Paye

EL ALTO – BOLIVIA

2022

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE EL ALTO

AUTORIDADES

Dr. Carlos Condori Titirico

RECTOR

Dr. Efraín Chambi Vargas Ph. D.

VICERRECTOR

Dr. Antonio López Andrade Ph. D.

DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

MSc. Ing. Laoreano Coronel Quispe

DECANO ÁREA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS, PECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

Ing. Daniel Condori Guarachi

DIRECTOR DE CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Ing. Edwin Guarachi Laura

COORDINADOR INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN, EXTENSIÓN, AGRÍCOLA Y POSGRADO

DERECHOS RESERVADOS: Universidad Pública de El Alto

Dirección UPEA: Av. Sucre s/n Zona Villa Esperanza

Diciembre. 2022

El Alto – Bolivia

PRESENTACIÓN

La Universidad Pública de El Alto “UPEA”, institución de formación académica y recursos humano sobre todo del conocimiento como factor de desarrollo, se encuentran en el centro del análisis ya que, es importante el capital humano con conocimientos técnicos y científicos, como apoyo al desarrollo del país, que mediante la investigación puede acelerar los procesos de crecimiento y desarrollo tecnológico.

Ante la necesidad de impulsar el desarrollo tecnológico agrícola, la carrera de Ingeniería Agronómica, de la Universidad Pública de El Alto, institución encargado de promover innovaciones tecnológicas, al servicio de la sociedad, buscando el bienestar de las familias Bolivianas mediante el uso de productos alternativos de control de la roya del café (*Hemileia vastatrix*), de acuerdo a los objetivos planteados, se realizó el aislamiento, purificación, prueba de patogenicidad y la determinación del sustrato de crecimiento de *Lecanicillium spp.* Para que posteriormente sea aplicado en el cultivo de café como una alternativa de control biológico y además orientado a la producción orgánica del cultivo de café, en el marco de las políticas del Estado Boliviano.

Los aportes de los investigadores son de mucha importancia en el tema agrícola y sobre todo en el manejo de la roya del café, siendo una enfermedad muy agresiva, que permanentemente provoca daños económicos a los productores, con los resultados del proyecto de investigación, posteriormente se puede orientar a una investigación a nivel industrial para mayores volúmenes, para la aplicación en los cultivos extensivos.

Ing. Edwin Guarachi Laura

COORDINADOR

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN, EXTENSIÓN AGRÍCOLA Y POSGRADO
INGENIERÍA AGRONÓMICA**

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A nuestra casa superior de estudios Universidad Pública de El Alto "UPEA", Carrera de Ingeniería Agronómica, por darnos la oportunidad de contribuir con nuestros conocimientos técnicos y científicos en la EVALUACIÓN DE DIFERENTES SUSTRATOS DE REPRODUCCIÓN DEL HONGO *Lecanicillium spp.* Y PATOGENICIDAD SOBRE LA ROYA DEL CAFÉ (*Hemileia vastatrix*) A NIVEL LABORATORIO, trabajo de investigación que permitirá profundizar los estudios a mayor detalle hasta contar con un paquete tecnológico de uso de *Lecanicillium spp.* Como biofungicida en la prevención de la incidencia de la roya del café, como una alternativa de producción de café orgánico.

De la misma manera agradecer al director de la Carrera de Ingeniería Agronómica, Coordinador del Instituto de Investigación, Extensión Agrícola y Posgrado "IINEAP", por habernos apoyado en la labor y ejercicio como docente investigador y permitirnos desarrollar actividades de investigación en la elaboración y conclusión exitosa del proyecto de investigación.

Finalmente, agradecer al Univ. Tesista Félix Cuno Bautista y Univ. Pasante Alejandra Mayta Fernández. Por su colaboración permanente desde el Municipio de Caranavi y como también a los auxiliares de investigación, con apoyo de todos los actores se tiene los resultados del proyecto de investigación.

Ing. MSc. Rogelio Maydana
INVESTIGADOR PRINCIPAL
INSTITUTO DE INVESTIGACION, EXTENSION AGRICOLA Y POSGRADO
INGENIERÍA AGRONÓMICA

ÍNDICE

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Producción de café.....	1
1.2. El problema.....	4
3. Objetivo de la investigación.....	5
Objetivo General.....	5
Objetivo Específico.....	5
Hipótesis de la investigación.....	5
4. Justificación.....	5
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Mención de otros estudios relativos al tema.....	7
2.2. Mención de los puntos de vista de otros investigadores.....	10
2.3. Corriente o enfoque elegido por el investigador.....	14
2.4. Identificación de fuentes.....	15
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO.....	20
3.1. Tipo de investigación.....	20
3.2. Diseño de la investigación.....	20
3.3. Variables de investigación.....	20
3.3.1. Variables de estudio:.....	21
3.4. Población y muestra.....	21
3.5. Ambiente de la investigación.....	21
3.6. Técnicas e instrumentos.....	22
3.7. Procedimientos de la investigación.....	22
3.7.1. Siembra de muestras.....	22
3.7.2. Aislamiento del Hongo <i>Lecanicillium spp</i>	23
3.7.3. Evaluación de crecimiento de <i>Lecanicillium spp</i>	23
3.7.4. Caracterización macroscópica y microscópica de <i>Lecanicillium spp</i>	23

3.8. Procedimiento de Investigación.....	25
CAPÍTULO IV: RESULTADOS.....	26
4. Caracterización morfológica de <i>Lecanicillium spp.</i>	26
4.1. Roya del café (<i>Hemileia vastatrix</i>).....	26
4.2. Signos o señales de <i>Lecanicillium spp.</i>	27
4.3. Características macroscópicas de <i>Lecanicillium spp.</i>	28
4.4. Crecimiento radial promedio de <i>Lecanicillium spp.</i>	29
4.5. Características microscópicas.....	31
4.6. Crecimiento del hongo <i>Lecanicillium spp.</i> en diferentes sustratos orgánicos...32	
4.6.1. Crecimiento de <i>Lecanicillium spp.</i> en sustrato arroz.....	32
4.6.2. Crecimiento del <i>Lecanicillium spp.</i> en sustrato maíz.....	34
4.6.3. Crecimiento del <i>Lecanicillium spp.</i> en sustrato avena.....	35
4.7. Patogenicidad de <i>Lecanicillium spp.</i> sobre roya del café.....	36
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES.....	40
CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES.....	41
BIBLIOGRAFÍA.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de investigación.....	25
Figura 2: Síntomas de roya de café.....	26
Figura 3: Muestras de <i>Lecanicillium spp.</i>	27
Figura 4. Colonias de <i>Lecanicillium spp.</i> en diferentes medios de cultivo de SDA.....	28
Figura 5. Comparación de tratamientos de crecimiento de <i>Lecanicillium spp.</i>	29
Figura 6. Crecimiento radial de <i>Lecanicillium spp.</i>	30
Figura 7. Morfología de conidios de <i>Lecanicillium spp.</i>	31
Figura 9. Estructuras reproductivas de <i>Lecanicillium spp.</i>	32
Figura 10. Crecimiento de <i>Lecanicillium spp.</i> en el sustrato de arroz.....	33
Figura 11. Producción de conidios aislados de <i>Lecanicillium spp.</i> en el sustrato de maíz.....	34
Figura 12. Producción de conidios aislados de <i>Lecanicillium spp.</i> sustrato de avena.....	35
Figura 13. Prueba de patogenicidad de <i>Lecanicillium spp.</i>	37
Figura 14. Hiperparasitismo de <i>Lecanicillium spp.</i> sobre pústulas de roya del café.....	37
Figura 15. Parasitismo de <i>Lecanicillium spp.</i> sobre uredosporas de (<i>Hemileia vastatrix</i>).....	38

RESUMEN

El cultivo de café es uno de los rubros más cultivados en el mundo sobre todo en la región de los Yungas del Departamento de La Paz es uno de los sitios más apropiados para la producción de café, debido a los fuertes ataques de las enfermedades por la roya del café que afecta en el rendimiento y es de gran importancia económica es necesario para contribuir al desarrollo de nuevas alternativas de manejo biológico en el control de la roya de café, con la aplicación de cepas promisorios de *Lecanicillium spp.* Como institución académica de formación es responsabilidad nuestra proponer proyectos que vaya en respuesta a problemáticas ambientales, sociales, productivos, entre otras. Es en este sentido que las Carreras de ingeniería de Agronomía, proponen el siguiente “EVALUACIÓN DE DIFERENTES SUSTRATOS DE REPRODUCCIÓN DEL HONGO *Lecanicillium spp.* Y PATOGENICIDAD SOBRE LA ROYA DEL CAFÉ (*Hemileia vastatrix*) A NIVEL LABORATORIO”.

De acuerdo a las pruebas de efectividad de *Lecanicillium spp.* En diferentes sustratos la producción masiva del hongo *Lecanicillium spp.* el más eficiente fue en el sustrato de arroz presentando unas condiciones físicas adecuadas en cuanto a la aireación para la producción de conidios bajo un ambiente en condiciones de laboratorio donde presentó un mayor porcentaje de desarrollo y crecimiento de conidios en un periodo de veinte días con una temperatura de 25°C.

La patogenicidad de *Lecanicillium spp.* en hojas de café sobre las pústulas roya (*Hemileia vastatrix*), donde se pudo observar una efectividad en el hiperparasitismo en un periodo de evaluación de veinte dos días en condiciones de laboratorio dándole la humedad requerida con un comportamiento similar, mostrándose mayor porcentaje de parasitismo sobre las pústulas de la roya de café logrando una disminución de la enfermedad.

La inoculación de *Lecanicillium spp.* Sobre la roya del café, se observó su efectividad de infección al tercer día después de la inoculación, y a los 12 días se observó completamente infectado la roya por *Lecanicillium spp.*

ABSTRACT

The cultivation of coffee is one of the most cultivated items in the world, especially in the Yungas region of the department of La Paz, it is one of the most appropriate places for the production of coffee, due to the strong attacks of diseases caused by coffee rust that affects yield and is of great economic importance is necessary to contribute to the development of new biological management alternatives to control coffee rust, with the application of promising strains of *Lecanicillium spp.* As an academic training institution, it is our responsibility to propose projects that respond to environmental, social, and productive problems, among others. It is in this sense that the Agronomy Engineering Careers propose the following "EVALUATION OF DIFFERENT SUBSTRATES FOR THE REPRODUCTION OF THE FUNGUS *Lecanicillium spp.* AND PATHOGENICITY ON COFFEE RUST (*Hemileia vastatrix*) AT THE LABORATORY LEVEL".

According to the effectiveness tests of *Lecanicillium spp.* In different substrates, the massive production of the fungus *Lecanicillium spp.* the most efficient was in the rice substrate presenting adequate physical conditions in terms of aeration for the production of conidia under an environment in laboratory conditions where it presented a higher percentage of development and growth of conidia in a period of twenty days with a temperature of 25°C.

The pathogenicity of *Lecanicillium spp.* in coffee leaves on rust pustules (*Hemileia vastatrix*), where an effectiveness in hyperparasitism could be observed in an evaluation period of twenty-two days under laboratory conditions, giving it the required humidity with a similar behavior, showing a higher percentage of parasitism on coffee rust pustules achieving a decrease in the disease.

The inoculation of *Lecanicillium spp.* On the coffee rust, its effectiveness of infection was observed on the third day after inoculation, and at 12 days the rust by *Lecanicillium spp.*

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. Producción de café

El cultivo de café (*Coffia arábica L.*) es uno de los rubros más cultivados en el mundo con una producción aproximadamente de 167.9 millones de saco de 60 kilogramos en el año 2019-2020. (OIC, 2020)

La producción del cultivo de café en Bolivia es de mucha importancia, con una producción anual de 14.123 toneladas en mote, que a nivel mundial representa el 0,067 % la región de los Yungas del departamento de La Paz es uno de los sitios más apropiados para la producción de café aportando con el 96,43% del volumen total nacional, por ser uno de los principales rubros de exportación, el 73.5 % de toda la producción es destinada a la exportación y solo el 26.5 % para el consumo interno. (Cortez, 2015)

En Bolivia más de 15.000 familias que trabajan directamente con la producción de café, siendo Caranavi en el departamento de La Paz, el principal productor del país con el 90,5. % y en menor cantidades como los departamentos de Cochabamba y Santa Cruz, Tarija, Beni y Pando. De acuerdo a los datos de subasta Internacional del Torneo Taza de calidad café presidencial 2020 el precio llegando a \$160 la libra.

La roya es una enfermedad del café ocasionada por el hongo (*Hemileia vastatrix*) y está relacionada con la alta carga fructífera, falta de manejos, hacen más susceptible a ataques severos de la plaga. La enfermedad arrasó hace tres años los cultivos de café en Costa Rica, Nicaragua y Panamá. Posteriormente, el hongo se diseminó por América del Sur y afectó cafetales de Colombia, Ecuador y Perú hasta llegar a Bolivia, en 2014. (IBCE, 2015).

“La Roya del cafeto es un patógeno biográfico que afecta hojas de café y se considera la enfermedad más importante en el cultivo a nivel mundial. Este hongo causa defoliación y reduce el rendimiento de los cafetos”. (Avelino, 2015)

Las alternativas de los agroquímicos para el control de la roya presentan un gradiente de toxicidad, precio y efectividad, entre ellos están los preventivos como el caldo sulfocálcico, EVALUACIÓN DE DIFERENTES SUSTRATOS DE REPRODUCCIÓN DEL HONGO *Lecanicillium spp.* Y PATOGENICIDAD SOBRE LA ROYA DEL CAFÉ (*Hemileia vastatrix*) A NIVEL LABORATORIO

que es el menos tóxico y permite alguna protección contra la infección de las hojas cuando no han sido infectadas previamente. Los compuestos que utilizan cobre dan mayor protección contra ataque de hongos, sin embargo, son más tóxicos al inhalarlos (cuando se preparan o aplican las mezclas), al contacto con la piel y son nefastos para la vida acuática. (Álvarez, 2018)

Lecanicillium lecanii fue reportado por Álvarez, Ramírez, y Escobar (2015) como hiperparásito de la roya del café en el estudio: bioprospección de hiperparásitos de *Hemileia vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café el cual evidenció la capacidad de *L. lecanii* como potencial biocontrolador de *H. vastatrix*. Se evaluaron las dos cepas promisorias y los métodos de producción con sustrato orgánicos a nivel artesanal de producción para establecer la capacidad reproductiva de *L. lecanii*, además métodos de aplicación y el grado de control que puede alcanzar bajo condiciones naturales sobre la roya del café y la capacidad como biocontrolador para poder incluirlo dentro de programas de manejo integrado del cultivo para alternarlo con el control químico tradicional y así ofrecer una alternativa amigable con el ambiente.

Cañarte (2018) indica que el *Verticillium sp.* para el control biológico de la roya del café, que las colonias obtenidas, fueron purificadas y transferidas a placas de petri que contenían papa-dextrosa agar (PDA.) al 2% para su conservación los tratamientos estuvieron formulados (4 medios sólidos y 4 medios líquidos), cada tratamiento sólido (con agar) 25 ml y líquidos (sin agar) en igual número se utilizó frascos Erlenmeyer conteniendo 25 ml. Los estudios demuestran que los diferentes medios de cultivos que tuvieron mayor desarrollo de conidios.

Alonzo (2017) indica sobre el “Efecto de la aplicación de *Lecanicillium Lecanii* en combinación con fungicidas químicos sobre la incidencia y severidad de la roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo de café”, que cada grano de producto posee una concentración de $1,0 \times 10^9$ conidios viables del hongo, y cuenta con una germinación y pureza de mayor de 95%. el ingrediente activo son conidios o esporas del hongo. Este producto viene en una presentación en polvo, se recomienda utilizar el tratamiento 1,5 kg/ha.

El hongo *Lecanicillium* 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 hongo *Lecanicillium spp.* se ha encontrado en áreas tropicales y subtropicales, parasitando insectos, royas y otros hongos superiores; es un habitante común del suelo, donde sobrevive saprofitica mente en restos de plantas y otros tipos de materia en descomposición. No obstante, Monzón (1992), Lo ha señalado principalmente como un hongo entomopatígeno muy importante para controlar plagas fundamentales de cultivos, tales como áfidos y escamas y se han observado epizootias en las regiones tropicales y subtropicales. (Cuellar, 2006)

Halpay M, (2020) describe para prevalencia y diseminación de *Verticillium sp.* para el control biológico de la roya, se realizaron ensayos *in vitro* con el fin de determinar su capacidad supresora, sobre la germinación de las uredosporas de *Hemileia vastatrix*. Los ensayos realizaron en placas petri en agar-agar que se obtuvieron los géneros *Lecanicillium lecanii* y *Trichoderma spp.* ambos micoparásitos resultaron exitosos en el control de fitopatógeno, de control biológico de la roya del café.

Romero (2020) demuestra el estudio realizado del aislado nativo de *Lecanicillium sp* en tres etapas, la primera en la colecta de muestras partir de hojas de café infectadas con roya (*Hemileia vastatrix*), en la segunda etapa, evaluó en condiciones de laboratorio. La tercera etapa consistió en la evaluación de los aislados sobre *Hemileia vastatrix*, mediante aplicaciones en campo. En la investigación logró mayores porcentajes de pústulas parasitadas en la primera y última fecha, correspondiente a los 15 y 60 días después de la aplicación de *Lecanicillium sp.*

González D. (2020) menciona la caracterización morfológica del *L. lecanii* que se realizaron en diluciones seriadas a partir de colonias puras de los aislados en medio de cultivos Papa Dextrosa Agar (PDA), para la obtención de cultivo monospóricos. Posteriormente, se sembraron en sustrato PDA y se incubaron a 26°C en oscuridad y se obtuvieron 14 aislados

cultivados en el medio de PDA, presentaron colonias blancas con fina estructura algodonosa y de un color amarillo claro por el reverso a los 10 días.

Sucaticona F. (2018) que los hongos *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.* aislados en cultivos *in vitro* frente al hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix* en donde llegó a observar una competencia por espacio y nutriente así presentó los hongos antagonistas un diámetro de crecimiento de 5.8 cm y 4.9 cm así existiendo diferencia significativa entre los hongos antagonistas y el patógeno, también presentaron el grado cuatro de mico parasitismo según el tiempo de cobertura y alcanzaron en un 75% en el cubrimiento del micelio al fitopatógeno así mostrando una buena actividad antagonista.

“El control biológico de organismos tipo roya ha sido evaluado en muchos cultivos con buenos resultados y en el caso del café se han usado hongos y bacterias para su control” (Álvarez, Santos & Cantes, 2015).

El control biológico es una de las alternativas a los plaguicidas químicos, pero también 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).

1.2. El problema

En Bolivia se han presentado problemas en la producción de café, debido a los fuertes ataques de las enfermedades por la roya del café, ya que esta enfermedad afecta en el rendimiento en la producción de café y bajos ingresos económicos en todas las zonas productoras de café, esto se debe por varios factores como ser: cultivares viejos, carencia de fertilización, condiciones climáticas no favorables, falta del manejo de control de plagas y enfermedades y otros. Sin embargo, también la producción de café es orgánica y no es aceptable el uso de ninguno producto químico o mejor dicho plaguicidas, lo que puede generar problemas de exportación por instancias comercializadoras, bajo estas condiciones la roya del café puede devastar todo el cultivo de café en caso de no aplicar planes de producción por los productores.

3. Objetivo de la investigación

Objetivo General.

Evaluar la reproducción de cepas nativas del hongo *Lecanicillium spp.* en diferentes sustratos y su patogenicidad sobre la roya del café (*Hemileia vastatrix*).

Objetivo Específico.

Determinar el sustrato óptimo de reproducción y producción de las cepas del hongo *Lecanicillium spp.*

Determinar la capacidad antagónica del hongo *Lecanicillium spp.* sobre la roya del café (*Hemileia vastatrix*).

Determinar los costos de producción del hongo *Lecanicillium spp.*

Hipótesis de la investigación

Mediante la realización del presente trabajo de investigación se pretende dar respuesta a la siguiente interrogante:

¿Cuáles son los determinantes de la eficiencia en sustratos para la reproducción y producción del hongo *Lecanicillium spp.*? y el efecto de patogenicidad sobre la roya del café?

4. Justificación

Los cultivos de café en los últimos años, fue atacado por la enfermedad conocida comúnmente Roya del café (*Hemileia vastatrix*), el agente causante se prolifera rápidamente en ambientes adecuados de crecimiento del fitopatógeno e incide directamente al cultivo de café, generalmente durante la fase de macollamiento, floración y fructificación de las cerezas, dicha enfermedad tiene un grado de patogenicidad muy virulento, donde genera daños económicos a la producción del cultivo de café, además permanentemente los granos de café son rechazados por los comercializadores y de esa manera los productores carecen de ingresos económicos y están obligados a la emigración

en otros cultivos, ciudades hasta a otros países. Y por la importancia económica del cultivo de café y para contribuir al desarrollo de nuevas alternativas de manejo biológico en el control de la roya de café, con la aplicación de cepas promisorios de *Lecanicillium spp.* el propósito del presente trabajo de investigación es determinar y perfeccionar una metodología eficiente de uso de sustratos de reproducción masiva de *Lecanicillium spp.*, para caficultores que puedan comercializar café orgánico que resultan más rentables, bajos costos y amigables con el medio ambiente.

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Mención de otros estudios relativos al tema

Romero (2020) demuestra el estudio realizado del aislado nativo de *Lecanicillium sp.* en tres etapas, la primera en la colecta, la segunda etapa en condiciones de laboratorio y la tercera en la evaluación de los aislados sobre (*Hemileia vastatrix*). También determino el crecimiento radial de aislados de *Lecanicillium sp* a los 20 días después de inoculación, en tres medios de cultivo, a temperatura de 24°C, con luz y 14 horas de oscuridad.

Cortez (2007) Se realizó un estudio la relación entre producción conidial del hongo *Lecanicillium lecanii* en diferentes sustratos (medios nutritivos y soporte) y su patogenicidad, como sustratos utilizados en los que se evaluaron fueron en: sorgo, grano de arroz, grano de arroz quebrado (“granillo”) polvo de arroz (“pulido”), y como soportes: bagazo de caña, cascarilla de arroz y “olote” de maíz. Los sustratos se conformaron por dos componentes: medios nutritivos y soportes en una proporción en los que se evaluó grano de sorgo, arroz entero y sus subproductos industriales, grano de arroz quebrado (“granillo”) y polvo de arroz (“pulido”), como medios nutritivos y como soporte se utilizaron: “olote” de maíz, “bagazo” de caña de azúcar y “cascarilla” de arroz. La combinación entre medios y soportes dio origen a doce tratamientos y como testigo se usó el grano de arroz entero solo.

González (2020) menciona la caracterización morfológica de *Akanthomyces lecanii* que se realizaron en diluciones seriadas a partir de colonias puras de los aislados en medio de cultivos Papa Dextrosa Agar (PDA), para la obtención de cultivo monospóricos posteriormente, se sembraron en sustrato PDA y se incubaron a 26°C en oscuridad, presentaron colonias blancas con fina estructura algodonosa y de un color amarillo claro.

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).

Sucaticona (2018) Demostró la capacidad antagonica de los hongos *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.* los hongos fueron aislados de las hojas de café y del suelo circundante a la planta de café usando los medios de cultivos agar Sabouraud y dextrosa papa (PDA). Los cuales fueron identificados mediante la observación microscópica usando las claves dicotómicas seguidamente estos hongos fueron sometidos a la prueba de antagonismo in vitro en donde se evaluaron la competencia por espacio y nutrientes.

Álvarez (2013) Menciona la determinación de la producción de conidios de tres hongos entomopatógenos: *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii*, en cinco sustratos orgánicos: arroz, trigo, cebada, sorgo y maíz machacado, bajo condiciones de laboratorio a una temperatura de 26°C, 76% de humedad relativa y un fotoperiodo de 14/10 durante 17 días. El método de producción fue por fermentación en sustrato sólido para lo cual se colocaron 200 gramos de sustrato previamente hidratado y esterilizado en una bolsa de polipropileno, donde se inoculó 5 ml de una suspensión conteniendo 10⁶ UFC/mL del hongo entomopatógeno en evaluación.

La producción de hongos entomopatógenos se basa en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas en un sustrato natural y hasta la fecha a nivel de países de Latinoamérica como Nicaragua, Cuba, Colombia y Brasil, se han evaluado diferentes tipos de sustratos naturales abundantes de encada localidad, pero el más utilizado es el arroz y trigo, así mismo se han 3 hecho muchos avances en los métodos de producción artesanal e industrial (Robinson et al., 2002).

La producción de hongos entomopatógenos para el control de plagas, se basa en la multiplicación masiva del mismo y de sus estructuras reproductivas (esporas y/o conidias) en un sustrato natural. Hasta la fecha se han evaluado diferentes tipos de sustratos naturales, principalmente arroz, trigo, maíz, fríjol y soya. De éstos los que más se comercializa son el arroz y el trigo (Jiménez 2010).

El hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii*, presenta la mayor producción de conidios en el sustrato arroz de $2,66 \times 10^9$ UFC/g con un porcentaje de humedad de 53,54% en 17 días de fermentación.

Según Gómez et al. (2011), presenta micelio tabicado, conidióforos simples o verticilados, más anchos en la base y adelgazándose hacia los extremos, en donde se encuentran los conidios agrupados en cabezuelas, rodeados de una sustancia mucilaginoso, unicelulares, hialinos, de forma cilíndricos a ovoides.

Ramírez (2018) Indica que se realizó la evaluación de *Lecanicillium lecanii* en las localidades de Villa Canales, Guatemala y San Miguel Dueñas Sacatepéquez, se evaluaron las cepas de San Sebastián y Corral Viejo recomendadas en la bioprospección antes mencionada, se evaluaron tres sustratos de crecimiento para ambas cepas en arroz blanco, arroz precocido y maíz amarillo quebrado, solo la cepa de San Sebastián pudo ser propagada en maíz amarillo quebrado, y se obtuvo mayor concentración de conidios 1.02×10^8 (9.97×10^1) UFC/g ($p < .001$) en promedio (desviación estándar) a los siete días de cultivo. Donde el control de calidad y los porcentajes de germinación y pureza fueron del 100% en ambos casos.

Las aplicaciones en campo determinaron que el porcentaje de infección de *L. lecanii* sobre *H. vastatrix* oscila entre 46% y 65% según la localidad y no existe diferencia significativa entre utilizar dosis de 300 g y 600 g de inóculo con concentración de conidios de 1.02×10^8 (9.97×10^1)UFC/g ($p > .05$), también se considera que se deben evaluar aplicaciones próximas y posteriores a la cosecha, cuando el inóculo primario permanece latente a la espera de las condiciones ideales para la reproducción de la roya, considerando el comportamiento de la cepa en ambas localidades también sugiere que deben realizarse nuevas prospecciones para obtener una cepa con mayor virulencia y capacidad de adaptación, donde se evaluaron tres sustratos; arroz blanco, arroz precocido y maíz amarillo quebrado.(Romero, 2020)

Se utilizaron dos cepas; San Sebastián y Corral Viejo en tres períodos de incubación, siete, 14 y 21 días, se arreglaron factorialmente ($3 \times 2 \times 3$) y se realizaron cinco repeticiones por factor previo a la inoculación, los sustratos fueron tratados con antibiótico y esterilizados en tres etapas a 121°C , 20 PSI como lo sugiere Elósegui (2006). Posterior a la esterilización

EVALUACIÓN DE DIFERENTES SUSTRATOS DE REPRODUCCIÓN DEL HONGO *Lecanicillium spp.* Y PATOGENICIDAD SOBRE LA ROYA DEL CAFÉ (*Hemileia vastatrix*) A NIVEL LABORATORIO

se inoculó una concentración de conidios de 1×10^6 UFC/mL de *Lecanicillium lecanii* en suspensión, se incubaron durante tres días a 25 °C, posteriormente se colocaron en bandejas a una temperatura entre 18 y 22 °C en oscuridad para favorecer el proceso de crecimiento y esporulación, se efectuaron 15 repeticiones por tratamiento y se realizó el conteo de conidiósporas y control de calidad estandarizado por el Centro Nacional de Investigaciones del Café (CENICAFE, 1997).

Lecanicillium lecanii fue reportado por Álvarez, Ramírez, y Escobar (2015), como hiperparásito de la roya del café en el estudio: Bioprospección de hiperparásitos de *Hemileia vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café el cual evidenció la capacidad de *Lecanicillium lecanii* como potencial biocontrolador de *Hemileia vastatrix*. Se evaluaron las dos cepas promisorias y los métodos de producción con sustrato orgánicos a nivel artesanal de producción para establecer la capacidad reproductiva de *Lecanicillium lecanii*, además métodos de aplicación y el grado de control que puede alcanzar bajo condiciones naturales sobre la roya del café y la capacidad como biocontrolador para poder incluirlo dentro de programas de manejo integrado del cultivo para alternarlo con el control químico tradicional y así ofrecer una alternativa amigable con el ambiente.

2.2. Mención de los puntos de vista de otros investigadores

Romero (2020) Menciona que los resultados en su 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 conidios por gramo de sustrato, indica que hubo diferencias significativas entre sustratos ($p < 0.0001$), entre aislados ($p < 0.0039$) y además la interacción aislada*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. Debido estos resultados se procedió a realizar un análisis de varianza par cada sustrato con cada uno de los aislados para determinar el comportamiento en términos de rendimientos de cada aislado.

Para considerar un sustrato como idóneo para la producción masiva debe estimular una alta concentración de conidios 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 conidios 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 conidios 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 *Lecanicillium lecanii* produce mayor cantidad de conidios 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 conidios 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 conidios. Volcy y Pardo (1994), quienes mencionan que un buen sustrato para la producción de conidios 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.

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.

Fernández (2007), señala que para la selección del método de producción es importante tener en cuenta no sólo la factibilidad tecnológica y económica, sino el mecanismo de acción ya que en el producto final deben estar presentes las estructuras infectivas y los metabolitos activos de forma estable y con su mayor potencial biológico. Se debe tomar en cuenta: 1) Selección de la cepa adecuada, 2) Selección de un medio de cultivo que permita obtener un desarrollo del hongo con máximo potencial patogénico y con eficiencia económica, 3) La posibilidad tecnológica y económica a nivel de producción, 4) Formulación que permita

EVALUACIÓN DE DIFERENTES SUSTRATOS DE REPRODUCCIÓN DEL HONGO *Lecanicillium spp.* Y PATOGENICIDAD SOBRE LA ROYA DEL CAFÉ (*Hemileia vastatrix*) A NIVEL LABORATORIO

periodos de almacenamiento prolongados, facilidad de aplicación y estabilidad en condiciones de campo.

En función de la forma de propagación de hongos entomopatógenos, se pueden obtener diferentes tipos de productos; masa micelial dispersa, agregados miceliales, blastoporos, conidios aéreos y conidios sumergidos. Las formas infectivas de los hongos son los blastoporos y los conidios, el micelio que no es infectivo, se utiliza en el control de algunas plagas, para formar conidios aéreos con la humedad ambiental. La producción de conidios puede hacerse en medio sólido, líquido y empleando un sistema mixto (Hernández y Velázquez, 1996; citado por Alcázar, 2007).

Según Monzón et al., (2001) y Caro et al., (2005), en la producción comercial y artesanal se utilizan como sustrato granos de cereales y leguminosas, esto es corroborado por Assaf et al. (2006) y Elías (2002); quienes a su vez indican que el arroz molido, arroz entero, cáscara de arroz, coco, sorgo y maíz son los sustratos utilizados en las fermentaciones sólidas, siendo el más empleado el arroz entero, aunque este en algunas ocasiones es muy caro o escaso; razón por la cual es importante buscar nuevos sustratos en cada región y estandarizar sus métodos de producción.

Este es uno de los motivos por el que en el presente trabajo de investigación se evaluó la producción de conidios de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* y *Lecanicillium lecanii*, sobre granos de sorgo, trigo, maíz chancado y cebada, bajo condiciones de laboratorio con una temperatura promedio de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa del 75% y un fotoperiodo de 14/10 horas luz, con el fin de determinar la mejor producción de conidios por gramo de sustrato y así contribuir con un conocimiento alternativo sobre el empleo de un sustrato orgánico para la masificación comercial y artesanal de hongos biocontroladores que a su vez conlleva a que sean menores los costos de producción para ser distribuidos a los agricultores a precios cómodos para el control de los insectos plaga. (Álvarez, 2013)

Al evaluar la producción promedio de conidios de *Lecanicillium lecanii*, sobre los diferentes sustratos, se determinó que este hongo entomopatógeno presenta la más alta producción en el tratamiento T11 con $2,66 \times 10^9$ UFC/g sobre los granos de arroz, seguido en segundo lugar por los tratamientos T12 con $1,51 \times 10^9$ UFC/g en el trigo y T5 con $1,36 \times 10^9$ UFC/g

sobre los granos de cebada, mientras 110 que la producción más baja se obtuvo en el maíz chancado precocido con $4,47 \times 10^7$ UFC/g. A pesar de que *Lecanicillium lecanii*, obtiene la mayor producción de conidios sobre los granos de arroz con $2,66 \times 10^9$ UFC/g, es bajo en comparación con los producidos por los otros hongos en el mismo sustrato. (Álvarez, 2013)

De acuerdo a Cortez (2007), la baja producción de conidios de *Lecanicillium lecanii* pudo deberse a la alta compactación que ejerce el hongo sobre el arroz como medio, lo que evita que exista aireación interna y consecuentemente, se reduzca la producción de conidios, lo cual también es mencionado por Madrigal et al., (2003), quienes demostraron que el hongo *L. lecanii* produce mayores cantidades conidios cuando se cultiva en sustratos que le permiten mayor aireación.

Según Barranco (2004), la temperatura de 26°C empleada en el cuarto de cultivo influyó negativamente durante la producción de conidios, porque los conidios de *Lecanicillium lecanii* requieren para germinar temperaturas entre los 20 y 25°C y un crecimiento óptimo se logra entre 23 y 24°C, por tanto, la germinación y el crecimiento disminuye excesivamente arriba de los 25°C.

Ramírez, (2018) Menciona que los resultados de concentración de conidios de la cepa San Sebastián procesados con análisis de varianza factorial y prueba de medias de Tukey indican diferencias significativas entre sustratos, tiempos y hubo interacción sustrato-tiempo (maíz amarillo quebrado, arroz blanco y arroz precocido a los siete, 14 y 21 días de sembrado) ($p < .001$). Donde observó que el comportamiento de la concentración de conidios en los diferentes sustratos y períodos de tiempo, a los siete días la concentración de conidios en el maíz amarillo quebrado del promedio de esporas por gramos de sustrato 1.02×10^8 (9.97×10^1) UFC/g es superior a la del arroz blanco 3.93×10^7 (6.49×10^1) UFC/g y arroz precocido 4.72×10^7 (8.17×10^1) UFC/g, a los 14 días empieza a decrecer la concentración en los tres sustratos y a los 21 días continuó con la misma tendencia. En el control de calidad (germinación y pureza) de la cepa, en los tres sustratos y períodos de tiempo evaluados y se observa que a los siete días el porcentaje de germinación y pureza para los sustratos oscilo de la siguiente manera, maíz amarillo quebrado 100%, arroz blanco 100% y arroz precocido 80%, a los 14 y 21 días disminuye el porcentaje de germinación y pureza en los tres sustratos lo que descarta su selección, con los resultados descritos anteriormente se demuestra que el maíz amarillo quebrado en un período de tiempo de

siete días obtiene la mejor concentración de conidios con el 100% de germinación y pureza, la cepa Corral Viejo no se reprodujo en ningún sustrato.

Avalo (2014), evaluó el efecto de *Lecanicillium lecanii* (Zimm) sobre *Planococcus citri* (Risso) en condiciones de laboratorio, donde empleó hojas de limón, conteniendo 20 ninfas de *P. citri*, fueron infestados los insectos a dosis de 106 y 107 conidios/mL del entomopatógeno con ayuda de un aspersor manual. La muerte de las ninfas de *P. citri* a las 72 horas después de la aplicación la mortandad fue 81,5 y 80 % a las concentraciones de 106 y 107 conidios/mL.

2.3. Corriente o enfoque elegido por el investigador

Según (Barrantes 2002) que paradigma naturalista es denominado también naturalista – humanista o interpretativo y, según los pensadores que lo han analizado a fondo, su interés se centra en el estudio de los significados de las acciones humanas y de la vida social, además menciona que paradigma positivista conduce al enfoque cuantitativo y paradigma naturalista al enfoque cualitativo, asimismo la investigación cualitativa postula una concepción fenomenológica, inductiva, orientada al proceso busca descubrir o generar teorías pone énfasis en la profundidad y sus análisis no necesariamente son traducidos a términos matemáticos.

El enfoque cualitativo se apoya en la recolección y se trabajó con un enfoque cualitativo; los datos se recopilaban mediante entrevistas abiertas, talleres y recorridos por el entorno y observación en campo abierto. Flamini, Marco, Robledo, Gerardo L, & Suárez, María E. (2015).

Como el trabajo de investigación se trata de evaluar la reproducción de cepas nativas del hongo *Lecanicillium spp* en diferentes sustratos de reproducción y producción, para la aplicación en el campo agrícola del cultivo de café, se determinó elaborar el proyecto de investigación mediante el enfoque cualitativo y enfoque cuantitativo, determinar la capacidad antagónica del hongo *Lecanicillium spp*. sobre la roya del café (*Hemileia vastatrix*) envasado a ello también se quiere lograr un banco de germoplasma para el apoyo e identificación de muestras a variedades de café tolerante a algunas enfermedades y de esta manera los productores tendrán una opción de cultivo en café con recolección,

EVALUACIÓN DE DIFERENTES SUSTRATOS DE REPRODUCCIÓN DEL HONGO *Lecanicillium spp*. Y PATOGENICIDAD SOBRE LA ROYA DEL CAFÉ (*Hemileia vastatrix*) A NIVEL LABORATORIO

inclusive haciendo visitas a las colonias también realizando talleres de información a los productores de café.

2.4. Identificación de fuentes

Cortez, (2007) Se realizó un estudio Producción de *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* en diferentes sustratos y patogenicidad, la relación entre producción conidial del hongo *Lecanicillium lecanii* en diferentes y su patogenicidad. Como medios se evaluaron: sorgo, grano de arroz, grano de arroz quebrado (“granillo”) polvo de arroz (“pulido”), y como soportes: bagazo de caña, cascarilla de arroz y “olote” de maíz. Los sustratos se conformaron por dos componentes: medios nutritivos y soportes en una proporción 1:1. Se evaluó grano de sorgo, arroz entero y sus subproductos industriales, grano de arroz quebrado (“granillo”) y polvo de arroz (“pulido”), como medios nutritivos. Como soporte se utilizaron: “olote” de maíz, “bagazo” de caña de azúcar y “cascarilla” de arroz, la combinación entre medios y soportes dio origen a doce tratamientos. Como testigo se usó el grano de arroz entero solo.

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 conidios 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 conidios 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 conidios. Volcy y Pardo (1994), quienes mencionan que un buen sustrato para la producción de conidios debe poseer un alto contenido de carbohidratos, nitrógeno, microelementos, vitaminas.

El medio de cultivo es importante para la producción masiva de hongos entomopatógenos descrita por (Easwaramoorthy y Jayaraj, 1977), ya que el éxito en su producción dependerá del medio utilizado y de la especie y/o raza del hongo en cuestión. (Cortez et al. 2003) encontraron diferencias importantes en la producción masiva de 15 cepas poliespóricas y monospóricas del hongo *Verticillium lecanii* en grano de arroz. Recientemente renombrado como *Lecanicillium lecanii* (Zare y Gams, 2001), este hongo es un importante biorregulador de insectos, principalmente áfidos, cóccidos y aleyrodidos (Hall, 1981), por lo que es uno

de los hongos entomopatógenos con mayor potencial en el manejo de plagas agrícolas. Los objetivos de la presente investigación fueron: evaluar la producción de *Lecanicillium lecanii* en diferentes sustratos y medios nutritivos y su patogenicidad sobre áfidos, los resultados indican que se obtuvieron sustratos más económicos y eficientes que el tradicional (arroz) para la producción masiva del hongo *Lecanicillium lecanii* al abatir el costo de producción, se abren perspectivas para su mayor uso como biorregulador de insectos nocivos para la agricultura.

Romero, (2020) Menciona el estudio realizado del aislado nativo del hongo *Lecanicillium sp.* para el manejo de la roya *Hemileia vastatrix* en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.), donde describe que la roya del café es causada por el hongo *Hemileia vastatrix* que puede reducir la producción de café, 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 conidios en los sustratos orgánicos: soya, sorgo y arroz, se evaluó en condiciones de campo la capacidad parasítica de los aislados.(Romero, 2020)

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. (Romero, 2020)

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

conidios 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. (Romero, 2020)

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, y 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. (Romero, 2020)

Martínez (2017) Realizo el estudio Efecto de *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams cepa VL-01 sobre *Myzus persicae* nicotianae Blackman (Hemiptera: Aphididae) en condiciones de laboratorio para evaluar el efecto de la cepa VL-01 del hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams sobre los últimos dos instares de *Myzus persicae* nicotianae Blackman, se realizaron ensayos de laboratorio mediante el método de aspersión, utilizando tres concentraciones del hongo y un tratamiento control. Se demostró que la mayor mortalidad de *M. persicae* se produjo entre las 48 y 72 horas de la aplicación a la concentración de 1×10^9 conidios mL^{-1} , mientras que la esporulación del hongo en cámara húmeda se manifestó entre los dos y tres días.

Álvarez. (2013) Menciona la determinación de la producción de conidios de tres hongos entomopatógenos: *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii*, en cinco sustratos orgánicos: arroz, trigo, cebada, sorgo y maíz chancado, bajo condiciones de laboratorio a una temperatura de 26 °C, 76% de humedad relativa y un fotoperiodo de 14/10 durante 17 días. El método de producción fue por fermentación en sustrato sólido para lo cual se colocaron 200 gramos de sustrato previamente hidratado y esterilizado en

una bolsa de polipropileno, donde se inoculó 5 ml de una suspensión conteniendo 10^6 UFC/ML del hongo entomopatógeno en evaluación.

La producción de hongos entomopatógenos se basa en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas en un sustrato natural, hasta la fecha a nivel de países de Latinoamérica como Nicaragua, Cuba, Colombia y Brasil, se han evaluado diferentes tipos de sustratos naturales abundantes de encada localidad, pero el más utilizado es el arroz y trigo, así mismo se han 3 hecho muchos avances en los métodos de producción artesanal e industrial (Robinson et al., 2002). El objetivo del trabajo de investigación fue determinar la producción de conidios de tres hongos entomopatógenos: *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii*, en cinco sustratos orgánicos: arroz, trigo, cebada, sorgo y maíz chancado, bajo condiciones de laboratorio a una temperatura de 26 °C, 76% de humedad relativa y un fotoperiodo de 14/10 durante 17 días. (Álvarez, 2013)

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).

El método de producción fue por fermentación en sustrato sólido para lo cual se colocaron 200 gramos de sustrato previamente hidratado y esterilizado en una bolsa de polipropileno, donde se inoculó 5 ml de una suspensión conteniendo 10^6 UFC/mL del hongo entomopatógeno en evaluación. Se determinó que *Isaria fumosorosea* presenta la mayor producción de conidias en el sustrato arroz con $8,47 \times 10^9$ UFC/g y una humedad de 58,21%, *Metarhizium anisopliae* en el maíz machacado con $2,35 \times 10^{10}$ UFC/g y una humedad de 52,31%, mientras que *Lecanicillium lecanii* produjo la mayor concentración de conidios en el arroz con $2,66 \times 10^9$ UFC/g a 53,54% de humedad en 17 días de fermentación. Los conidios de *Isaria fumosorosea* producidas en el arroz, presentan el mejor porcentaje de germinación con 96,91%; mientras que *Metarhizium anisopliae* lo hace en los sustratos maíz y arroz con 94,85% y 94,74% respectivamente; los conidios de *Lecanicillium lecanii*, producidas en los sustratos maíz y trigo presentan los mejores porcentajes de germinación con 97,51% y 94,66% respectivamente, a 26 °C durante 18 horas. (Álvarez, 2013)

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 Saboread maltosa agar más extracto de levadura (Bustillo, 1986).

CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO

El presente proyecto de investigación está orientado dentro el enfoque cualitativo y cuantitativo, para tal efecto el marco metodológico se mostrará lineamientos claros en el proceso de la investigación.

3.1. Tipo de investigación

Como el proyecto de investigación se trata de EVALUACIÓN DE DIFERENTES SUSTRATOS DE REPRODUCCIÓN DEL HONGO *Lecanicillium spp.* Y PATOGENICIDAD SOBRE LA ROYA DEL CAFÉ (*Hemileia vastatrix*) A NIVEL LABORATORIO, para tal efecto dicho proyecto se elaboró mediante recolección de información primaria y secundaria, con toda la información obtenida el proyecto es de tipo aplicada y descriptivo, para que posteriormente dicho proyecto pueda ser implementado y aplicable para la producción orgánica del cultivo de café.

3.2. Diseño de la investigación

Como el proyecto se trata de Evaluar diferentes sustratos en la producción del hongo *Lecanicillium spp.* para la producción orgánica, por tipo de investigación se aplicará un diseño al muestreo al azar, para los variables no se consideró ningún diseño por ser cualitativos

3.3. Variables de investigación

Para el presente proyecto de investigación se consideró los variables de estudio como se detalla a continuación.

3.3.1. Variables de estudio:

Características microscópicas y macroscópicas de *Lecanicillium spp.*

- Tipo de conidios
- Tipo de hifas
- Tipo de conidióforos
- Color del micelio
- Color de la colonia
- Textura de micelio

Efectividad de crecimiento sobre sustratos

- Germinación del inóculo sobre los sustratos
- Crecimiento de inóculo sobre el total del sustrato
- Color de la colonia de inóculo
- Pigmentación de la colonia

Patogenicidad de *Lecanicillium spp.* Sobre la roya del café a nivel laboratorio

- Parasitismo de *Lecanicillium spp.* sobre la roya

3.4. Población y muestra

Las muestras se recolectaron de la comunidad Oro verde, cantón San Lorenzo, Caranavi, se recolectaron 20 ramas de café con incidencia de roya y parasitado con *Lecanicillium spp.* Del cual se aislaron *Lecanicillium spp.* Para su estudio correspondiente.

3.5. Ambiente de la investigación

El proyecto de investigación se realizó en el laboratorio de la Carrera de Ingeniería Agronómica.

3.6. Técnicas e instrumentos

Para la elaboración del diseño del proyecto se utilizaron consultas bibliográficas, artículos científicos, publicación de tesis y observación de información como un enfoque más apropiado en el presente modelo de investigación, además la aplicación de metas, aptitudes, creatividad como marco de referencia.

3.7. Procedimientos de la investigación

El proyecto de investigación se realizó bajo el siguiente procedimiento que se detalla a continuación:

Fase 1. Recolección de la muestra

Inicialmente se realizó una planificación coordinada para iniciar con el trabajo de investigación.

Se recolectaron las muestras de ramas de café infectada con Roya del café (*Hemileia vastatrix*) parasitada con *Lecanicillium spp.* En el municipio de Caranavi mismo que fueron trasladados en sobre manila con datos correspondientes, inmediatamente fue trasladado al laboratorio de la Carrera de Ingeniería Agronómica, para su siembra, aislamiento, purificación y caracterización del hongo mico parásito.

3.7.1. Siembra de muestras

Las muestras de hojas de café infectadas con roya y parasitas con *Lecanicillium spp.* Fueron retirados del sobre sobre un mesón, del cual se seleccionaron muestras con inóculo de *Lecanicillium spp.* Sobre la masa de uredosporas, que observaron sobre la superficie de las hojas de café, se hicieron cortes de 0.5 cm², se colocaron en medios de cultivo de agar Sabouraud preparados en placas Petri, y se dejaron en la incubadora para su crecimiento a una temperatura de 22°C.

3.7.2. Aislamiento del Hongo *Lecanicillium spp.*

A los 15 días de crecimiento de *Lecanicillium spp.* En la incubadora, se procedió a levantar con un sacabocado un taquito de micelio puro de *Lecanicillium spp.* Y colocado en otra placa Petri con medio de cultivo, sellar con Parafilm y posteriormente se colocó a la incubadora.

Al observar el crecimiento del hongo, se realizó tinción para observación microscópica para estar seguro que es el crecimiento de *Lecanicillium spp.* Una vez verificada las características del hongo micoparásito mediante claves taxonómicas (Zare y Gams, 2001). se procedió a la evaluación de crecimiento del hongo *Lecanicillium spp.* Para su evaluación macroscópica y microscópica.

3.7.3. Evaluación de crecimiento de *Lecanicillium spp.*

Se realizó la siembra de *Lecanicillium spp.* en 10 placas Petri con medio de cultivo agar saboraud, y la evaluación se realizó cada 4 días, para determinar el ritmo de crecimiento del hongo sobre la placa Petri, se realizó un dibujo en el envés de la placa una cruz marcando en el centro, cada placa con un número y código, los cuatro radios identificados con letras (a, b, c, d) en el centro el inóculo de *Lecanicillium spp.* Posteriormente incube hasta su crecimiento definitivo del hongo, marcando el punto de avance en función al tiempo, el ritmo de crecimiento se calculó dividiendo el incremento total por el tiempo.

3.7.4. Caracterización macroscópica y microscópica de *Lecanicillium spp.*

Después de aislar y purificar los aislados de *Lecanicillium spp.* se procedió a la caracterización macroscópica donde se incluyeron aspectos cualitativos como color de las colonias, tipo de crecimiento, textura 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 placas Petri. La técnica consistió en colocar el inóculo en el centro la placa que contiene el medio de cultivo y luego dibujar una cruz en la parte de atrás de la placa 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 EVALUACIÓN DE DIFERENTES SUSTRATOS DE REPRODUCCIÓN DEL HONGO *Lecanicillium spp.* Y PATOGENICIDAD SOBRE LA ROYA DEL CAFÉ (*Hemileia vastatrix*) A NIVEL LABORATORIO

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 4 días por un período de 25 días. Para cada aislamiento se utilizaron 10 placas.

Para las características microscópicas se observó la estructura morfológica de *Lecanicillium spp.*, tales como tipo de hifas, tipo de conidióforos, tipo de conidios, tamaño de conidios, y para realizar las mediciones se utilizó un microscopio VX-52 previamente calibrado y un lente micrométrico ocular, se usó el lente de 100x. Los datos fueron tomados a los 25 días después de haber fructificado el hongo en estudio.

Fase 2. Prueba de crecimiento de *Lecanicillium spp.* En diferentes sustratos

Se preparó tres sustratos diferentes de Arroz, Maíz y Avena con volumen de 100 g. de cada uno, inicialmente se procedió a lavar los sustratos arroz, maíz se lavó durante 15 min el maíz y arroz en una bandeja se depositaron los sustratos por separados y posteriormente se remojaron con agua tibia durante 15 minutos, luego se sacó en otra bandeja y se cernió todo el agua, los sustratos se depositaron en frascos de vidrio, como 5 repeticiones cada sustrato, se enroscaron herméticamente y posteriormente los frascos fueron esterilizados mediante calor húmedo a una temperatura de 121°C en auto clave. Una vez esterilizadas y enfriadas los frascos, se procedió a inocular con 1g. de suspensión de inóculo. La inoculación se realizó en una cámara de flujo laminar, el inóculo se depositó al medio del sustrato, posteriormente los frascos fueron colocados en una incubadora con temperaturas aproximada de 24°C en condiciones de oscuridad.

La evaluación de crecimiento, se realizó cada 4 días, hasta que el hongo tenga un desarrollo completo de todo el sustrato.

Fase 3. Prueba de Patogenicidad de *Lecanicillium spp.*

Se estableció un bioensayo en condiciones de laboratorio para determinar la efectividad de parasitismo de *Lecanicillium spp.* 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. En 5 placa Petri se depositaron hojas de café con signos y señales de roya de

EVALUACIÓN DE DIFERENTES SUSTRATOS DE REPRODUCCIÓN DEL HONGO *Lecanicillium spp.* Y PATOGENICIDAD SOBRE LA ROYA DEL CAFÉ (*Hemileia vastatrix*) A NIVEL LABORATORIO

café, sobre ellas se inocularon con una aguja de disección cepas de *Lecanicillium spp.* Y posteriormente se depositaron en incubadora, la evaluación se realizó cada 5 días, para evaluar el nivel de patogenicidad del hongo *Lecanicillium spp.*

3.8. Procedimiento de Investigación

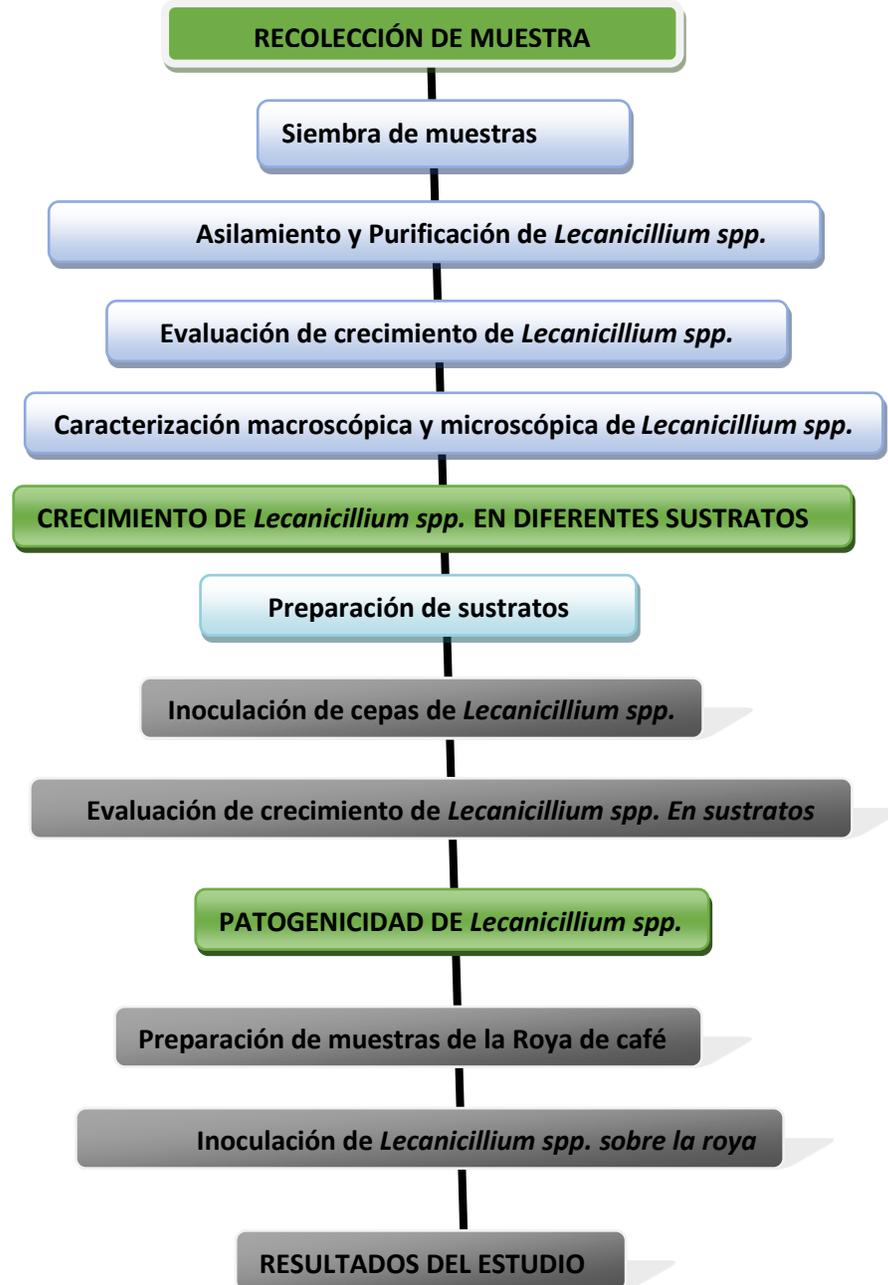


Figura 1: Estructura de investigación

EVALUACIÓN DE DIFERENTES SUSTRATOS DE REPRODUCCIÓN DEL HONGO *Lecanicillium spp.* Y PATOGENICIDAD SOBRE LA ROYA DEL CAFÉ (*Hemileia vastatrix*) A NIVEL LABORATORIO

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4. Caracterización morfológica de *Lecanicillium spp.*

4.1. Roya del café (*Hemileia vastatrix*).

La roya del Café es causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, patógeno que sólo puede sobrevivir en las hojas vivas del café. La presencia de la enfermedad se reconoce por manchas redondas de color amarillo claro en la parte superior de la hoja y presencia de un polvo color naranja en la parte inferior. En las lesiones viejas se puede observar tejido muerto de color café. El daño principal de la roya se presenta con la caída de hojas, afectando la maduración normal del café cuando los ataques son tempranos y provocando un agotamiento prematuro de las plantas

La roya del café es una enfermedad que ataca a los cultivos de café, el agente causante es el *Hemileia vastatrix*, de la División: Eumycota, Subdivisión: basidiomycotina, Clase: Hemybasidiomycetes, Orden: Uredinales y de la Familia: Pucciniaceae, el fitopatógeno es muy virulento en ambientes favorables como el cambio brusco de temperaturas, altas humedades, ambientes sin sombra y por supuesto carencia de fertilización.



Figura 2: Síntomas de roya de café.

Como se puede observar en la figura 2. En el haz de la hoja se pueden observar unas manchas de color amarillo intenso brillante con halos de crecimiento amarillo, disperso en

toda la superficie de la hoja, en el envés de la hoja se observa masas pulverulentas (uredosporas) de color amarillo anaranjado.

4.2. Signos o señales de *Lecanicillium spp.*

En la Figura 3. En las hojas de café se pueden observar sobre las masas pulverulentas de color amarillo anaranjado (uredosporas) ubicadas generalmente en el envés de las hojas, sobre el cual existe crecimiento de micelios de color blanco hialino justamente sobre las uredosporas que va invadiendo toda la masa pulverulenta de la roya de café, inicialmente se ven unos puntos blancos y posteriormente se observa como un manto en toda zona de la roya del café y de esa manera evita el avance o la proliferación de uredosporas de la roya del café en toda la planta.



Figura 3: Muestras de *Lecanicillium spp.*

De acuerdo a la observación de la ubicación de las cepas de *Lecanicillium spp.* Se puede mencionar que el ambiente apropiado para el hongo mico parásito es donde existe mayor humedad y oscuridad, tales que se parasita generalmente en las primeras hojas de primeras ramas, donde no ingresa la luminosidad, tal cual se observa en la figura 3.

4.3. Características macroscópicas de *Lecanicillium spp.*

En la figura 4, se puede observar la purificación de los aislados del hongo *Lecanicillium spp.*, en medios de cultivo de Papa Dextrose Agar (PDA), se realizó la caracterización macroscópica.



Figura 4. Colonias de *Lecanicillium spp.* en diferentes medios de cultivo de SDA

Esta variable fue evaluada el crecimiento en cajas petri, cada 3 a 6 días donde se visualizó el crecimiento del hongo *Lecanicillium spp.* de los aislados de las seis muestras incubadas a una temperatura que vario 22° C a 21° C con una humedad de 70 a 71%, los cuales fueron completando su crecimiento de manera similar.

Todos los aislados de la cepa del hongo *Lecanicillium spp.* presentaron características macroscópicas similares entre las colonias de los aislados en medios de cultivo de PDA, las cuales presentaron una colonia de color blanco hialino con una textura algodonosa generalmente simétricamente y al reverso presentaron estrías o arrugamiento en el medio durante su crecimiento, con un halo de crecimiento de color blanco hialino, además las colonias presentaron mayor crecimiento vertical en la parte superior debido al abundante micelio.

Según el estudio realizado por Romero (2020) encontró resultados similares donde describe que *Lecanicillium spp.* presentaron colonias algodonosas, pero no polvorientas, debido a

que este hongo su micelio y sus conidios se adhiere fuerte al medio de cultivo, esto se observó en los tres medios evaluados de PDA, SDA y EMA. 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 en el medio durante su crecimiento. 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).

4.4. Crecimiento radial promedio de *Lecanicillium spp.*

El crecimiento radial de *Lecanicillium spp.* no fue significativo para el factor período de evaluación ($p > 0.3655$), donde se registró la velocidad de crecimiento en el medio de cultivo de PDA, donde se midió con una regla en milímetros (mm) desde el centro de inoculación en las cajas petri, utilizando la metodología de French y Hebert (1982).

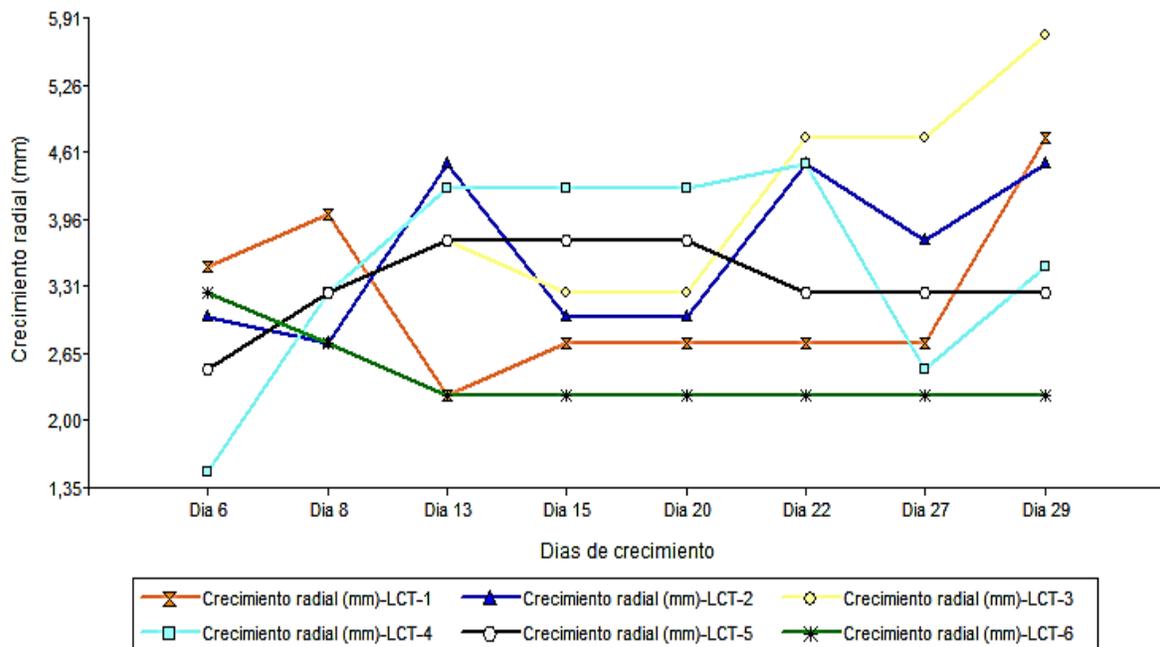


Figura 5. Comparación de tratamientos de crecimiento de *Lecanicillium spp.*

En la figura 5, se observa todos los aislados del hongo *Lecanicillium spp.* presentaron el mismo patrón de crecimiento a diferencia muy variado de durante el tiempo de evaluación de los 29 días incubadas.

El tiempo de evaluación fue realizada en días a una temperatura de 25°C con una humedad relativa del 71%, el ritmo de crecimiento fue muy variado donde la mayoría de las cepas alcanzo un mayor rango de crecimiento radial de 3,91 mm por la muestra LCT-3 y con un menor crecimiento de 2,44 mm por la muestra LTC-6, con un crecimiento lento y casi uniforme en el desarrollo de micelios de *Lecanicillium spp.* y otros finalizando un mayor crecimiento en los 22 días, cómo se puede observar en la (figura 5).

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 spp.* 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.

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 usados por los patólogos de insectos.

En la figura 6, se observa el crecimiento radial en los 29 días de los aislados de *Lecanicillium spp.* las cepas de Taypiplaya, donde se presentó con un mayor crecimiento alto de 3,91 mm de la muestra LTC-3, seguido por las muestras LTC-1, LTC-2, LTC-4, LTC-5 con un

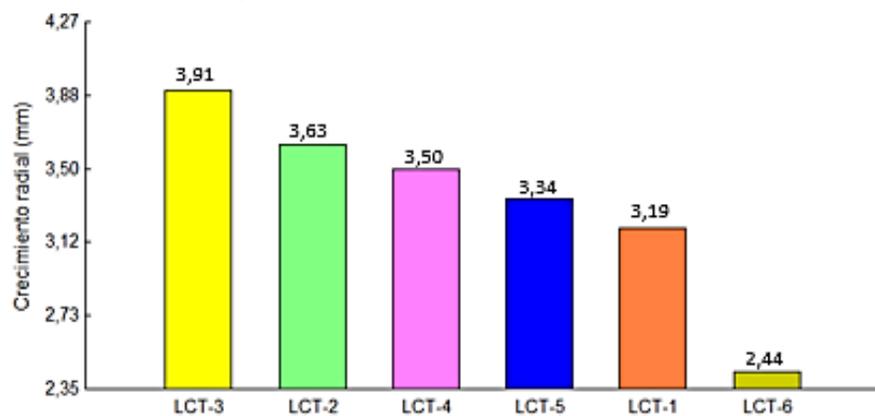


Figura 6. Crecimiento radial de *Lecanicillium spp.*

grado de crecimiento entre 3,63 a 3,19 mm con un crecimiento lento afectado por la temperatura o contaminación y en menor crecimiento fue de 2,44 mm por la muestra LTC-6.

4.5. Características microscópicas

La observación microscópica de todos los aislados del hongo *Lecanicillium spp.* en el medio de cultivo de SDA, con una forma de micelio cenocítico tal esto no presenta tabicados también se pudo observar el color de conidios un aspecto importante de este hongo de color hialino, el tamaño de las conidios oscila entre 3.5 a 4.7 μ de largo y de 2.4 a 3.2 μ de ancho con una presencia de conidios en el extremo de las fiálides con una sucesión basípeta de cabezuelas a solitarias también presenta los conidióforos del tipo ramificado, en cuanto a los fiálides son erectos , anchos en base y terminan en una punta delgada, y con una estructura de reproducción asexual anamórfica, las formas de los conidios se observó formas cilíndricas o elipsoidales. (Figura 6 y 7).



Figura 7. Morfología de conidios de *Lecanicillium spp.*

Según el estudio realizado por Romero (2020) encontró resultados similares donde describe que *Lecanicillium spp.* presentaron características microscópicas similares en los tres medios evaluados SDA y PDA. El tamaño de las conidios fue similar, oscilando entre 2.5 y 7.5 μ de largo y de 1.5 a 2 μ de ancho, con presencia de conidios en el extremo de las fiálides en forma de cabezuelas o solitarias, de color hialinas y de formas cilíndricas o

elipsoidales. 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 conidios generalmente en grupos de dos a seis, algunas veces solitarias.

Icochea (2004) describe fiálides (células conidiógenas) erectas, anchos en la base y terminan en una punta delgada por donde salen las conidios, 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 conidios elipsoidales de 2 a 4 x 1 a 1,5 μ . fiálides solitarias o en verticilos originados en conidióforos rectos.



Figura 9. Estructuras reproductivas de *Lecanicillium spp.* con conidióforos verticilados por fiálides.

4.6. Crecimiento del hongo *Lecanicillium spp.* en diferentes sustratos orgánicos

4.6.1. Crecimiento de *Lecanicillium spp.* en sustrato arroz

Se pudo observar un mayor crecimiento en el sustrato de arroz con diferentes rendimientos en los aislados del hongo *Lecanicillium spp.* debido a que presenta buena consistencia en el proceso de reproducción masiva, ya que algunos se vieron favorecidos en la multiplicación de los conidios de *Lecanicillium spp.* y otros no se vieron favorecidos en el mismo sustrato con las mismas condiciones del laboratorio a una temperatura de 25°C con

una humedad relativa del 70% presentando una buena aireación lo que nos permite tener una mayor viabilidad.



Figura 10. Crecimiento de *Lecanicillium spp.* en el sustrato de arroz.

Cortez (2007), menciona en su estudio que el 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 los conidios y afecta de una manera sustancial su rendimiento. En algunos hongos como *Lecanicillium lecanii*, la cantidad de conidios puede disminuir debido a la alta compactación que ejerce el hongo sobre el arroz, lo que evita aireación interna y reducción de la producción conidial.

Según Sahayaraj y Namasivayam (2008), la producción masiva de hongos entomopatógenos comúnmente se usa como sustrato sólido el grano de arroz por mantener las condiciones físicas con una adecuada superficie efectiva para el crecimiento micelial, un adecuado balance nutricional y condiciones específicas acordes a los requerimientos del aislamiento en aireación y humedad.

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 conidios 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 conidios 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 conidios.

4.6.2. Crecimiento del *Lecanicillium spp.* en sustrato maíz

El sustrato menos eficiente fue el de maíz ya que en la evaluación realizada no mostró ningún desarrollo y solo se pudo observar que el crecimiento solo llegó a un dos por ciento en los días desde su inoculación ya que en las pruebas preliminares la reproducción del hongo *Lecanicillium spp* no se logró la multiplicación de los conidios debido a la falta de condiciones de laboratorio y baja humedad en el sustrato no permitió la aireación interna lo cual no permitió el desarrollo obteniendo un gran porcentaje de contaminación en los sustratos de maíz.

Según Samsinakova y Kalalova (1980), las principales condiciones que se deben tener en cuenta para la producción de microorganismos entomopatógenos son la selección de cepas capaces de producir esporas altamente virulentas, un medio adecuado para la producción óptima de estos conidios a bajo costo, y procesos de formulación y almacenamiento adecuados.

(Gervais & Molin, 2002), según en el estudio de producción masiva en maíz determinó por análisis de varianza factorial con prueba de medias de Tukey que el medio idóneo para la reproducción masiva de *L. lecanii* fue el maíz amarillo quebrado.



Figura 11. Producción de conidios aislados de *Lecanicillium spp.* en el sustrato de maíz.

Figuroa 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 su estudio pudo observar que el sustrato que no se desarrolló esto puede ser por que 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.

4.6.3. Crecimiento del *Lecanicillium spp.* en sustrato avena

El aislado de *Lecanicillium spp.* logro tener un crecimiento similar al sustrato de maíz lo cual indica que cada aislado tiene ciertas características muy particulares en cuanto a su crecimiento ya que el sustrato de avena no se vio favorecido para la producción del hongo donde se pudo observar que debido a la humedad existió un compacto lo cual ocasiono que no exista una aireación y pueda permitir el desarrollo del aislado *Lecanicillium spp.* y consecuentemente no exista la producción conidial, dado que tuvo las mismas condiciones de del laboratorio.

También cabe indicar que el soporte (frascos) con los sustratos causo un efecto en la producción del hongo donde no mostro ningún desarrollo.



Figura 12. Producción de conidios aislados de *Lecanicillium spp.* en el sustrato de avena

Uno de los problemas más comunes cuando se utiliza un sustrato para la producción de conidios se relaciona con la alta compactación que se ejerce sobre el sustrato. Cortez M. (2007) reportó en su estudio que en hongos como *Lecanicillium lecanii*, la cantidad de conidios se puede ver afectada por este factor, que evita aireación interna y, por consiguiente, reduce en la producción conidial.

Volcy y Pardo (1994), quienes mencionan que un buen sustrato para la producción de conidios 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.

Cortez (2001) indicó que la baja producción de conidios de la cepa de *Lecanicillium lecanii* pudo deberse a la alta compactación que ejerce el hongo sobre el arroz como medio, lo que evita que exista aireación interna y, consecuentemente, se reduzca la producción conidial. Los resultados obtenidos demuestran que el hongo *Lecanicillium lecanii* produce mayor cantidad de conidios cuando se cultiva en sustratos que le permiten mayor aireación.

Para considerar un sustrato como idóneo a los fines de la producción de conidios de una cepa o aislado de un hongo entomopatógeno debe tomarse en cuenta su bajo costo, fácil adquisición, producción de alta concentración de conidios y capacidad para mantener la virulencia de la cepa (Roberts y Yendol, 1971).

4.7. Patogenicidad de *Lecanicillium spp.* sobre roya del café *Hemileia vastatrix* en condiciones de laboratorio

En este el estudio se pudo observar el parasitismo del *Lecanicillium spp.* en hojas de café sobre las pústulas roya *Hemileia vastatrix* en condiciones de laboratorio con una aplicación con un medio líquido de hongo *Lecanicillium spp.* donde el comportamiento se mostró efectivo el hiperparasitismo sobre la roya durante el periodo 22 días de evaluación.



Figura 13. Prueba de patogenicidad de *Lecanicillium spp.* sobre pústulas de *Hemileia vastatrix* en condiciones de laboratorio.

Las evaluaciones iniciaron 5 días luego de la inoculación de *Lecanicillium spp.* sobre pústulas de roya (*Hemileia vastatrix*) en las hojas de café donde se observó un mayor aumento de parasitismo del hongo sobre la roya llegando a cubrir el 100% de las pústulas de la roya del café en los 12 días, cabe mencionar que la humedad favoreció en el desarrollo de *Lecanicillium spp.* aumentando su crecimiento a una temperatura de 25 °C por consiguiente una disminución en la incidencia de roya, el grado de parasitismo sobre las pústulas de *Hemileia vastatrix* mostro diferencias ya que otras lograron mayor desarrollo durante el periodo de observación.



Figura 14. Hiperparasitismo de *Lecanicillium spp.* sobre pústulas de roya del café (*Hemileia vastatrix*)

Según Romero, S. (2020), Los hallazgos encontrados en su 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 *Hemileia 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.

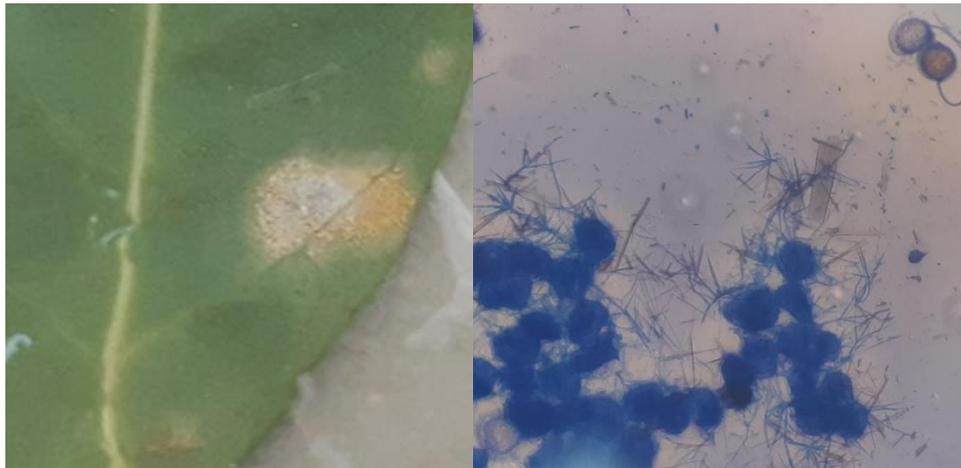


Figura 15. Parasitismo de *Lecanicillium spp.* sobre uredosporas de (*Hemileia vastatrix*)

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.

Por lo tanto, es importante no sólo conocer el proceso y eficiencia de producción de conidios sino también la calidad de éstos en cuanto a su patogenicidad.

Los porcentajes de parasitismo están estrechamente relacionados a la incidencia de enfermedad. Es importante remarcar que *Lecanicillium spp.* 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).

El análisis de varianza no paramétrica (Kruskal Wallis) para el parasitismo in vitro de *Lecanicillium spp.* 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 37 que todos los aislados se comportaron de una manera similar sobre el parasitismo en hojas.

Canjura et al. (2002) obtuvieron resultados similares cuando hicieron aplicaciones de *Lecanicillium spp.* 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.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

Se logro el aislado de *Lecanicillium spp*, los que de acuerdo a su caracterización macroscópica y microscópica presentaron una similitud en los medios de cultivo de PDA y SDA utilizados en la investigación.

Los resultados indican que se obtuvo para la producción masiva del hongo *Lecanicillium spp*. el más eficiente fue en el sustrato de arroz presentando unas condiciones físicas adecuadas en cuanto a la aireación para la producción de conidios bajo un ambiente en condiciones de laboratorio donde presento un mayor porcentaje de desarrollo y crecimiento de conidios en un periodo de veinte días con una temperatura de 25°C.

La patogenicidad de *Lecanicillium spp*. en hojas de café sobre las pústulas roya (*Hemileia vastatrix*), donde se pudo observar una efectividad en el hiperparasitismo en un periodo de evaluación de veinte dos días en condiciones de laboratorio dándole la humedad requerida con un comportamiento similar, mostrándose mayor porcentaje de parasitismo sobre las pústulas de la roya de café logrando una disminución de la enfermedad.

CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

- Al realizar investigaciones con el hongo *lecanicillium spp.* Se recomienda tener todos los equipos y materiales de laboratorio para no tener inconvenientes como contaminaciones, al momento de aislar.
- Realizar más investigación sobre el hongo *lecanicillium spp.* Para tener una buena aceptación hacer más estudios de producción conidial de *Lecanicillium spp.* en diferentes sustratos.
- Continuar con los aislados nativos de *Lecanicillium spp.* para su evaluación e identificación.
- Elaborar un estudio alternativo del comportamiento de hiperparasitismo de *Lecanicillium spp.* sobre *Hemileia vastatrix* en condiciones de laboratorio y campo.
- Evaluar la persistencia de patogenicidad de *Lecanicillium spp.* en las hojas de café.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, G. A., Ramírez, S. S., & Escobar, J. M. (2015). Bioprospección de hiperparásitos de *Hemileia vastatrix* en reservas naturales voluntarias con café. (Inf-2015-07). Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación y Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales.
- Alonzo, A. 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*). *Escuela De Agronomía Facultad de Ciencias Agroalimentaria Universidad de Costa Rica*, 4.
- Avalo, K. 2014. Efecto de *Lecani* (Zimm) y *Beauveria Bassiana* (Bals) vuill sobre *Planococcus citri* (Risso), en condiciones de laboratorio. *tesis, Biologo Microbiologia Trujill, Perú*, Lima, Perú, 62 P.
- 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).
- Avelino, J., & Rivas, G. G. (2013). La roya anaranjada del cafeto. Recuperado de hal.archives-ouvertes.fr/hal01071036/file/LA_ROYA_ANARANJADA_DEL_CAFETO_V1.pdf
- Alvarez, G. A., Santos, M. C., & Centes, L. F. (2015). Extracción y formulación artesanal de *Cladosporium uredinicola* biocontrolador de *Puccinia horiana*. (Inf-2015-31). Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación y Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales.
- 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 p .
- Cañarte , C. J., Fuentes Figueroa , T. R., Manobanda Guamàn, M. M., y Agosto, N. F. (2018). Prevalencia y diseminación de *Verticillium Sp.* para el control biológico de la roya del café. *Revista Científica de Investigación actualización del mundo de las Ciencias.*, Vol. 2 núm., 3, Septiembre.

- 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 . 1 3-1 9
- Cortez, M., H. (2007). Producción de *Lecanicillium (= Verticillium) lecanii* en diferentes sustratos y patogenicidad. Agricultura técnica en México, 33(1), 83-87.
- 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.
- Flamini, Marco, Robledo, Gerardo L, & Suárez, María E. (2015). Nombres y clasificaciones de los hongos según los campesinos de La Paz (Valle de Traslasierra, Córdoba, Argentina). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, 50(3), 265-289. Recuperado en 18 de mayo de 2022, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-23722015000300001&lng=es&tlng=es.
- French, E., R; Hebert, TT. (1982). Metodología de investigación fitopatología. ed. M de la Cruz. Sn José, CR. IICA. 290 p.
- Figueroa. L.M., Varela A, Corredor D (2007) Evaluación de sustratos naturales para la propagación masiva del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* (*Deuteromycotina: Hyphomycetes*). Rev. Invest. 7: 127-131.
- Halpay, M., Silverio , L., Mateo, A., Pimentel, A., & Cueto , J. (2020). Evaluación in vitro de micoparásitos con potencial de control sobre la enfermedad Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*). Revista APF. Editada por la Sociedad Dominicana de Investigadores Agropecuarios y Forestal -SODIAFR Agropecuaria y Forestal.en la provincia San Juan, República Dominicana, 2.
- IBCE.2015. Instituto Boliviano de Comercio Exterior. Obtenido de <https://ibce.org.bo/principales-noticias-boliviana/noticias-nacionales-detalle=5744-y-idPeriodico=1yfecha>
- Icochea, T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos Entomopatógenos. International Potato Center.
- Mezòn, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entopatogenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de plagas. Costa Rica* , 63: 95-103 p.

- 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.
- Romero, I. D. 2020. Aislados nativos de *Lecanicillium spp* para el manejo de cafe (*Coffea arábica* L). UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA FACULTAD DE AGRONOMIA , Managua, Nicaragua.
- 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.
- Sucaticona Vilca, F. Puno- Perú 2018. ACTIVIDAD ANTAGÓNICA in vitro DE LOS HONGOS *Trichoderma spp* y *Lecanicillium spp*. FRENTE AL HONGO DE LA ROYA AMARILLA DEL CAFÉ (*Hemileia vastatrix*) EN CONDICIONES DE LABORATORIO. Universidad Nacional del Altiplano Facultad de Ciencias Biológicas Escuela Profesional de Biología, 37 p.
- 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.
- Volcy, C y Pardo. V. (1994) Principios de Micología. 19ª ed. Universidad Nacional de Colombia. 141 pp.

ANEXOS

ANEXOS



Anexo 1: Preparación de materiales para la investigación y crecimiento del hongo *Lecanicillium spp.* en medios de cultivo PDA.



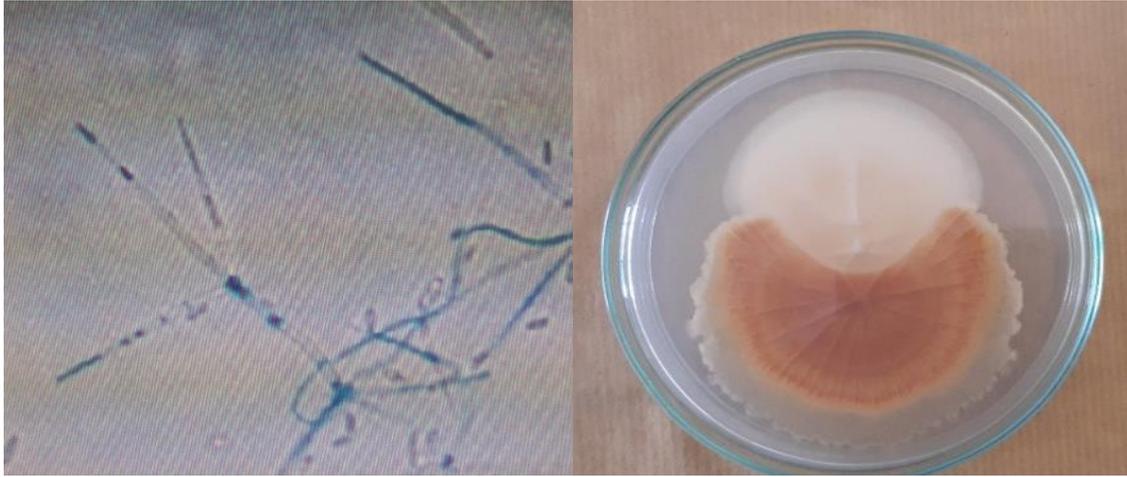
Anexo 2: Hojas con la presencia del hongo *Lecanicillium spp.* y roya (*Hemileia vastatrix*).



Anexo 3: Crecimiento del hongo *Lecanicillium* spp. en sustratos



Anexo 4: Evaluación de patogenicidad del hongo *Lecanicillium* spp. sobre la roya del café (*Hemileia vastatrix*).



Anexo 5: Caracterización microscópica del hongo *Lecanicillium* spp.