

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**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**

**TESIS**

**PRESENTADO POR:**

**Br. FANNY SUCATICONA VILCA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

**PUNO – PERÚ**

**2018**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**

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

**TESIS**

**PRESENTADO POR:**

Br. FANNY SUCATICONA VILCA



**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

**APROBADA POR:**

**PRESIDENTE**

:  .....

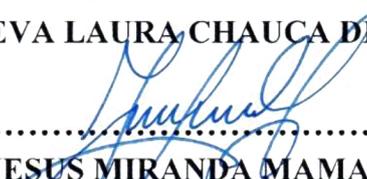
**Dra. ROXANA DEL CARMEN MEDINA ROJAS**

**PRIMER MIEMBRO**

: .....

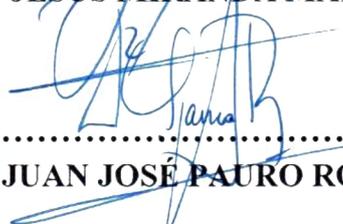
**M.Sc. EVA LAURA CHAUCA DE MEZA**

**SEGUNDO MIEMBRO**

:  .....

**M.Sc. JESUS MIRANDA MAMANI**

**DIRECTOR / ASESOR**

:  .....

**D.Sc. JUAN JOSÉ PAURO ROQUE**

**Área : Ciencias Biomédicas**

**Tema : Biotecnología Ambiental**

**Fecha de sustentación: 31 de diciembre 2018.**

## DEDICATORIA

*Con mucho amor a mi Dios  
todo poderoso por brindarme salud,  
sabiduría y esperanza para  
alcanzar mis objetivos.*

*A mis queridos padres: Sabino  
Sucaticona Sucaticona y Felicitas Vilca  
Mamani por su amor y apoyo  
incondicional, quienes me enseñaron a ser  
perseverante en el transcurso de mis  
estudios.*

*A mi esposo quien es mi motor  
y motivo para seguir adelante, a mis  
queridos hermanos quienes con todo  
cariño me dieron su apoyo moral  
para culminar mis estudios.*

## AGRADECIMIENTO

*En primer lugar, agradezco a mi Dios maravilloso y todo poderoso por darme la fuerza y fe para creer en mí misma y terminar con éxito mi estudio profesional.*

*A la Universidad Nacional del Altiplano, a la Facultad de Ciencias Biológicas, a todos los docentes y al personal administrativo quienes fueron parte de mi formación académica y profesional.*

*Un agradecimiento especial a mis queridos padres quienes me brindaron su apoyo incondicional para la culminación de mis estudios superiores.*

*Con gratitud al D. Sc. Juan José Pauro Roque. Director de la tesis, por ser un gran docente y por haberme brindado su confianza y su apoyo en la realización y culminación del presente trabajo y así también a mis jurados de tesis.*

*Y, a todas aquellas personas que me apoyaron moralmente y a cada uno de los docentes que fueron parte de toda mi formación profesional.*

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTO.....	4
ÍNDICE GENERAL.....	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS .....	8
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS .....	11
RESUMEN.....	12
ABSTRACT .....	13
I. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1 Objetivo General.....	15
1.2 Objetivos específicos .....	15
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	17
2.1 Antecedentes .....	17
2.2 Marco teórico.....	20
2.2.1 Reseña Histórica del café en el Perú .....	20
2.2.2 Antagonismo .....	20
2.2.3 Mecanismo de acción.....	21
2.2.4 La competencia .....	21
2.2.5 La antibiosis. ....	21
2.2.6 El hiperparasitismo.....	22
2.2.7 Micoparasitismo.....	22
2.2.8 El Género Trichoderma.....	22
2.2.9 Género <i>Lecanicillium spp</i> .....	29

2.2.10	Roya amarilla ( <i>Hemileia vastatrix</i> ).....	31
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
3.1	Ámbito de estudio.....	34
3.2	Población y muestra.....	35
3.3	Tipo de investigación.....	36
3.4	Metodología.....	36
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
4.1	Aislar e identificar a los hongos <i>Trichoderma spp.</i> , <i>Lecanicillium spp.</i> y al hongo fitopatógeno <i>Hemileia vastatrix</i> de las hojas de café y del suelo circundante a la plata de café del sector Miraflores Lanza y del sector Uycusmayo. ....	47
4.2	Evaluación de la capacidad antagónica de los hongos <i>Trichoderma spp.</i> Y <i>Lecanicillium spp</i> sobre el hongo de la roya amarilla <i>Hemileia vastatrix</i> en cultivos <i>in vitro</i> . ....	59
V.	CONCLUSIONES.....	73
VI.	RECOMENDACIONES .....	74
VII.	REFERENCIAS .....	75
	ANEXOS.....	83

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tratamiento empleado en la investigación .....	41
<b>Tabla 2.</b> Tratamientos empleados en la investigación .....	43
<b>Tabla 3.</b> La evaluación de antagonismo se basó en lo recomendado por Elías y Arcos (1984) citada en Ezziyyani (2004), de acuerdo a la medida de invasión de la superficie, colonización y esporulación del antagonista sobre los hongos fitopatógenos. ....	45
<b>Tabla 4.</b> Escala de micoparasitismo, según Royse y Ries (1978).....	46
<b>Tabla 5.</b> Media de desarrollo para el antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp y <i>Lecanicillium</i> spp sobre el hongo fitopatógeno <i>Hemileia vastatrix</i> de sector Miraflores Lanza .....	60
<b>Tabla 6.</b> Media de desarrollo para el antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp y <i>Lecanicillium</i> spp sobre el hongo fitopatógeno <i>Hemileia vastatrix</i> de sector Uycusmayo.....	64
<b>Tabla 7.</b> Tiempo de cobertura de los antagonistas sobre el patógeno <i>Hemileia vastatrix</i> y el grado de micoparasitismo según Elías y Arcos, (1984) citado por Ezziyyani, (2004). ....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Características de crecimiento de <i>Trichoderma inhamatum</i> , A. a las 48 h luego de la siembra del inóculo se observa crecimiento algodonoso blanquecino. B. 72 h empiezan la esporulación, formando un halo verde característicos, C se observa a las 96 h el crecimiento de un segundo halo completando la totalidad de la caja Petri. Fuente: (García et al., 2016).....	25
<b>Figura 2.</b> Imagen microscópica (Izquierda) y esquematización (derecha) de <i>Trichoderma harzianum</i> Donati, (2011). .....	25
<b>Figura 3.</b> Elementos implicados en el micoparasitismo ejercido por <i>Trichoderma</i> frente a otro hongo. Tomado de Drushinina et al., (2011), citado por (Vargas, 2014). .....	28
<b>Figura 4.</b> Imagen microscópica de <i>Lecanicillium lecanii</i> (Cortez, 2003).....	30
<b>Figura 5.</b> Ciclo biológico del hongo <i>Hemileia vastatrix</i> (OIRSA, 2013).....	31
<b>Figura 6.</b> Mapa de la provincia de Sandia con los dos sectores de estudio, abril 2018.....	34
<b>Figura 7.</b> Hojas de café infectados con hongos. Sandia, abril 2018. ....	35
<b>Figura 8.</b> Muestreo de suelo de cultivo de café. Sandia, abril 2018. ....	35
<b>Figura 9.</b> Observación macroscópico y microscópico del desarrollo del hongo <i>Trichoderma spp</i> , en el laboratorio de Microbiología de la FCCBB-UNA PUNO, junio 2018.....	48
<b>Figura 10.</b> Observación macroscópico y microscópico del desarrollo del hongo <i>Lecanicillium spp</i> , en el laboratorio de Microbiología de la FCCBB-UNA PUNO, junio 2018.....	49
<b>Figura 11.</b> Observación macroscópica y microscópica del desarrollo del hongo <i>Hemileia vastatrix</i> , en el laboratorio de Microbiología de la facultad de Ciencias Biológicas De la Universidad Nacional del Altiplano Puno, junio 2018.....	50
<b>Figura 12.</b> Descripción del diámetro de crecimiento in vitro de cepas de hongos nativos aislados de hojas de café ( <i>Hemileia</i> y <i>Lecanicillium</i> ) y de suelo circundante ( <i>Trichoderma</i> ) en campos de cultivo de café del sector Uycusmayo. Laboratorio de Microbiología en la FCCBB-UNA PUNO, julio 2018. ....	52

- Figura 13.** Observación macroscópica y microscópico del hongo *Trichoderma spp.*, en el laboratorio de Microbiología de la FCCBB-UNA PUNO, junio 2018..... 53
- Figura 14.** Observación macroscópica y microscópica del desarrollo del hongo *Lecanicillium spp.*, en el laboratorio de Microbiología de la FCCBB-UNA PUNO, junio 2018..... 54
- Figura 15.** Observación macroscópico y microscópico del hongo *Hemileia vastatrix*, en el laboratorio de Microbiología de la facultad de Ciencias Biológicas De la Universidad Nacional del Altiplano Puno, junio 2018. .... 55
- Figura 16.** Diámetros de crecimiento in vitro de cepas de hongos nativos aislados de hojas de café (*Hemileia* y *Lecanicillium*) y de suelo circundante (*Trichoderma*) en campos de cultivo de café del sector Miraflores Lanza, laboratorio de Microbiología en la FCCBB-UNA PUNO, julio 2018..... 57
- Figura 17.** Enfrentamiento dual de los hongos antagonistas *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.*, frente al hongo patógeno *Hemileia vastatrix*. en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológica de la Universidad Nacional del Altiplano Puno, junio 2018. .... 59
- Figura 18.** Actividad antagónica in vitro de los hongos *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.*, frente al hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix*, laboratorio de Microbiología de la FCCBB-UNA PUNO, julio 2018..... 61
- Figura 19.** Enfrentamiento dual de los hongos antagonistas *Trichoderma spp.*, y *Lecanicillium spp.*, frente al hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix*. Pruebas realizadas en el laboratorio de Microbiología de la FCCBB-UNA PUNO, julio 2018. .... 63
- Figura 20.** Actividad antagónica in vitro de los hongos *Trichoderma spp.*, y *Lecanicillium spp.* Frente al hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix*, Laboratorio de Microbiología de la FCCBB-UNA PUNO, julio 2018. .... 65
- Figura 21.** Micoparasitismo de los hongos antagonistas sobre el hongo patógeno A. *Trichoderma spp* frente a *Hemileia vastatrix*, B. *Trichoderma spp* frente a *Hemileia vastatrix* y C. hongos *Lecanicillium spp* frente a *Hemileia vastatrix*. Laboratorio de Microbiología FCCBB- UNA PUNO, julio 2018. .... 67

<b>Figura 22.</b> Grado de micoparasitismo (MICMO) correspondiente de la interacción del patógeno frente a los antagonistas, al 10 día después de la siembra.....	70
<b>Figura 23.</b> Terrenos de Cafetales A) cafetal del sector Miraflores Lanza del Distrito de San Pedro de Putina Punco B) cafetal del sector Uycusmayo del Distrito San Juan del Oro. Sandia, abril 2018. ....	83
<b>Figura 24.</b> Procedimiento para el aislamiento del hongo <i>Trichoderma spp.</i> , Puno, abril 2018.....	83
<b>Figura 25.</b> Procedimiento para el aislamiento del hongo <i>Lecanicillium spp.</i> , Puno, abril 2018.....	84
<b>Figura 26.</b> Aislamiento del hongo patógeno <i>Hemileia vastratrix</i> . Puno, mayo 2018. ....	84
<b>Figura 27.</b> Identificación de los hongos desarrollados, observación microscópica en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno, en junio 2018. ....	84
<b>Figura 28.</b> Variedad de hongos identificados que fueron aislados de las muestras de los dos sectores de la provincia de Sandia. En la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano, Puno en abril a Julio del año 2018.....	85
<b>Figura 29.</b> Hojas de café infectados con hongos A) hojas de café infestados con el hongo <i>Lecanicillium spp</i> los cuales fueron seleccionados para realizar las tomas de muestras, B) hojas de café infectados con los hongos de la roya amarilla <i>Hemileia vastatrix</i> los cuales también fueron seleccionados para aislar estos hongos para nuestro experimento. En la Facultad de Ciencias Biológicas dela Universidad Nacional del Altiplano – Puno Abril 2018.....	86

## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

PDA	Agar Papa Dextrosa
DCA	Diámetro de Crecimiento Antagonista
DCP	Diámetro de Crecimiento Patógeno
PICR	Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial
MICMO	Grado de Micoparasitismo
CECOVASA	Central de Cooperativas del Valle de Sandia.
ha	Hectárea
ml	Mililitro
mm	Milímetro
g	Gramos
cm	Centímetro
nm	Nanómetro
HR	Humedad Relativa

## RESUMEN

La investigación fue realizada en la ciudad de Puno en abril, junio del 2018 donde se realizó la experimentación en cultivos *in vitro* de la actividad antagónica de los hongos nativos frente al hongo de la roya amarilla del café (*Hemileia vastatrix*) los objetivos planteados para esta investigación fueron: a) aislar e identificar los hongos *Trichoderma spp.*, *Lecanicillium spp.* y el hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix* de las hojas de café y del suelo circundante a la planta de café del sector Miraflores Lanza y del sector Uycusmayo y b) evaluar la actividad antagónica de *Trichoderma spp* y *Lecanicillium spp* sobre el hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix* en cultivo *in vitro*. 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), luego de ello se seleccionaron a los hongos antagonistas *Trichoderma spp.*, *Lecanicillium spp.* y al hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix* los cuales fueron identificados mediante la observación al microscopio 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, y el grado de micoparasitismo. En donde resultó que los hongos aislados *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.* de los dos sectores de la provincia de Sandia presentaron una actividad antagónica frente al hongo fitopatógeno *H. vastatrix* así alcanzando un diámetro de crecimiento de 5.40 cm, 5.80 cm y 4.90 cm, 4.80 cm así existiendo diferencia significativa con  $P < 0.05$  así también los cuales se clasificaron en el grado 4 de micoparasitismo y una actividad antagónica de 75% en condiciones de laboratorio.

**Palabras Clave:** Antagonismo, cepas, fitopatógeno, hongos, roya amarilla.

## ABSTRACT

The research was carried out in the city of Puno in April, 2018, where experimentation was carried out in in vitro cultures of the antagonistic activity of native fungi against the fungus of yellow coffee rust (*Hemileia vastatrix*) the objectives set for this Research were: a) Isolate and identify the fungi *Trichoderma spp.*, *Lecanicillium spp.* and the phytopathogenic fungus *Hemileia vastatrix* of the coffee leaves and the surrounding soil of the Miraflores Lanza coffee plant and the Uycusmayo sector and b) evaluate the antagonistic activity of *Trichoderma spp* and *Lecanicillium spp* on the fungal pathogen *Hemileia vastatrix in vitro* culture . The fungi were isolated from the coffee leaves and from the soil surrounding the coffee plant using the Sabouraud agar and potato dextrose (PDA) culture media, after which the antagonistic fungi *Trichoderma spp.*, *Lecanicillium spp.* and the phytopathogenic fungus *Hemileia vastatrix*, which were identified by observation under the microscope using the dichotomous keys. These fungi were then subjected to the in vitro antagonism test, where competition for space and nutrients and the degree of mycoparasitism were evaluated. Where it turned out that isolated fungi *Trichoderma spp.* and *Lecanicillium spp.* of the two sectors of the province of Sandia presented an antagonistic activity against the phytopathogenic fungus *H. vastatrix* thus reaching a growth diameter of 5.40 cm, 5.80 cm and 4.90 cm, 4.80 cm thus existing significant difference with  $P < 0.05$  so also, they were classified in grade 4 of mycoparasitism and anatagonic activity of 75% under laboratory conditions.

**Keywords:** Antagonism, strains, phytopathogen, fungi, yellow rust.

## I. INTRODUCCIÓN

El café es el principal producto agrícola de exportación en el Perú, nuestro país es uno de los líderes en la producción de cafés especiales es decir se distingue de los demás cafés por tener mejores cualidades físicas y organolépticas con una creciente demanda del mercado internacional. En la región de Puno, el cultivo de café se inicia entre los años 1950 y se consolida en la década del 70 con la formación de 5 cooperativas y la constitución de la central CECOVASA en el año 1970, quien se encarga de la comercialización internacional.

En los últimos años los cultivos de café ha experimentado significativos cambios debido a la proliferación de la roya amarilla del café (*Hemileia vastatrix*) esta enfermedad ha provocado en las plantas de café defoliación total y la muerte de la planta, se indica que ha devastado un 60% de las áreas del cultivo de café en los valles de Tambopata e Inambari, provocando un bajo producción y por ello los cafetaleros se ven perjudicados y para combatir esta enfermedad utilizan los productos químicos como fungicidas que hoy en día se emplean en el campo cafetal para la roya en donde se observó si, una mejoría en las plantas de café. Pero sin embargo existe una contaminación ambiental, debido al empleo continuo de fungicidas a base de cobre que ha causado; apariciones bruscas y masivas del minador de hoja (*Leucoptera coffeella*) así mismo una acumulación de cobre en los suelos de las plantaciones y concentraciones foliares de cobre en los niveles tóxicos para la propia planta. Los efectos de estos fungicidas sobre la salud humana están en evaluación.

El hongo *Trichoderma sp.*, es un habitante natural del suelo y puede desempeñarse como saprofito o como parásito de otros hongos y además este género es muy conocido debido a su conducta antagonista y es ampliamente utilizada para el biocontrol. Así mismo

*Lecanicillium lecanii* es considerado un hongo hiperparásito de *Hemileia vastatrix* en donde se observó en forma natural parasitarla a este hongo.

Para tal caso se plantea realizar esta investigación para que a través de la prueba de antagonismo sobre el hongo de la roya amarilla del café (*Hemileia vastatrix*) pueda realizarse el biocontrol de esta enfermedad usando esta nueva biotecnología vegetal a través de estos hongos *Trichoderma spp* y *Lecanicillium spp*. el cual beneficiara a los agricultores que tienen plantaciones de café registradas como café orgánico y que tiene prohibido el uso de los fungicidas a base de cobre por lo tanto tienen la necesidad de recurrir a otras alternativas para controlar esta enfermedad de la roya del café. Por lo antes expuesto se plantearon los siguientes objetivos.

### **1.1 Objetivo General**

Evaluar la capacidad antagónica en cultivos *in vitro* de los hongos *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.* frente al hongo de la roya amarilla del café (*Hemileia vastatrix*) aislados de las hojas de café y del suelo provenientes de los dos sectores de la provincia de Sandía.

### **1.2 Objetivos específicos**

- Aislar e identificar los hongos *Trichoderma spp.*, *Lecanicillium spp.* y el hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix* de las hojas de café y del suelo circundante a la plata de café del sector Miraflores Lanza y del sector Uycusmayo.
- Evaluar la actividad antagonica de *Trichoderma spp* y *Lecanicillium spp* sobre el hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix* en cultivo *in vitro*.

Asi tambien, las hipotesis fueron:

**Hipótesis general:**

-Los hongos aislados e identificados *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.* tienen la capacidad antagonica frente al hongo de la roya amarilla del café (*Hemileia vastatrix*).

**Hipótesis específicas:**

- Se lograron aislar e identificar a los hongos *Trichoderma spp.*, *Lecanicillium spp.* y al hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix* de las hojas de café y del suelo circundante a la plata de café del sector Miraflores Lanza y del sector Uycusmayo.

-Los hongos *Trichoderma spp* y *Lecanicillium spp* presentaron una actividad antagónica sobre el hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix* en cultivos *in vitro*.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Antecedentes

Rolz *et al.* (2013), observaron un posible antagonismo de *Trichoderma* sobre *Hemileia vastatrix* como resultado de una invasión de micelio de *Trichoderma* sobre la *H. vastatrix* en la lesión de la hoja, así mismo (Castro & Rivillas, 2006) observaron una detención en la producción de micelio de los hongos patógenos al entrar en contacto con el micelio de *T. harzianum* (TRICHO-D). A los 15 y 20 días, *Trichoderma harzianum* (TRICHO-D) invadió los diferentes hongos patógenos, esporulando sobre ellos, así también Hoyos *et al.* (2008), mencionan que los aislamientos de *T. asperellum* T51 y *T. harzianum* T53 resultaron tener antagonismo *in vitro* sobre los hongos fitopatógenos evaluados *Sclerotinia spp.* y *Rhizoctonia spp.*, también afirman que la mayoría de los hongos con actividad antagónica específica sobre los diferentes fitopatógenos corresponde a los aislamientos de *T. asperellum*, especie que constituye el 49% de sus aislamientos probados, así como *T. harzianum*, que es el 31,5% y el aislamiento de *T. harzianum* T21 solo demostró tener un grado de antagonismo muy bajo en todas las pruebas que realizaron.

Astorga *et al.* (2014), reportan que el hongo *Trichoderma* presentó un potencial muy alto, con valores de PICR de 40,210 frente a *S. cepivorum* y de 45,034 ante *Penicillium sp.*, por lo que indican que es un buen controlador y que sus resultados obtenidos apoyan el potencial de las cepas de *Trichoderma sp.*, como agentes de control biológico frente a la pudrición causada por *Penicillium* del ajo, la bacteriosis por *P. marginalis* y la pudrición blanca por *S. cepivorum*, también indica (Vargas, 2014), que observó una inhibición del crecimiento radial de *Fusarium oxysporum f. sp. cepae* por *Trichoderma harzianum* de 83,40%, *Trichoderma koningiopsis* con 77,45%, y de *Phyton 27* del 70,34%, así mismo

indica que la inhibición del crecimiento radial de *Phoma terrestris* por *Trichoderma harzianum* fue de 86,86% , de *Trichoderma koningiopsis* fue 84,78% ; y de *Phyton 27* del 78,16% finalmente alcanzando un micoparasitismo de grado 4, por tal indica que pueden ser considerados como un recurso valioso en el control biológico de fitopatógenos.

Rodríguez & Veneros (2011), reportan que el hongo *Trichoderma harzianum* demostró en cultivos duales, ser un efectivo controlador biológico de hongos patógenos de frutos postcosecha de *Carica* “papaya”, inhibiendo el crecimiento del fitopatógeno mediante su capacidad antagónica, sin embargo Arbito (2017), estudio las pruebas de antagonismo de *Trichoderma spp* frente al hongo fitopatógeno *Fusarium spp* a tres temperaturas diferentes de 20, 25 y 30°C, en donde indica que el Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) fue entre el 40 al 78% así concluye que el hongo *Trichoderma spp* demostró su adaptabilidad a variaciones de temperaturas gracias a sus diversos mecanismos que les permite colonizar diversos hábitats.

González *et al.* (2007), Indican que las mejores condiciones de micoparasitismo del hongo *Lecanicillium lecanii* frente a *Hemileia vastatrix* se encontraron a 25°C, pH entre 5 y 7, Hr superior a 80% y oscuridad continua con un porcentaje de parasitismo sobre los soros superior a 95%, donde se redujo el índice de infección de forma similar al oxiclورو de cobre, así también Jiménez *et al.* (2015), demostraron en su investigación que la germinación de *Hemileia vastatrix* fue inhibida por las dos cepas de *Lecanicillium lecanii* que evaluaron así mismo indican que los cuales presentaron diferentes capacidades inhibitorias según su origen geográfico.

Alavo (2015), menciona que el hongo *Lecanicillium lecanii* es uno de los más comunes eficientes entomopatógenos de áfidos, trips, dípteros, lepidópteros, homópteros y heminóptero e indica que gracias a esto logro aislar y en donde observó la capacidad de parasitar al hongo *Hemileia vastatrix*, de igual manera Eskes *et al.* (1991), Observaron que los aislamientos del hongo *L. lecanii* parasitaron con facilidad lesiones de la roya del café, e indican que fue en condiciones de elevada humedad relativa, en donde este hongo mostro propiedades hiperparasíticas y antibióticas en laboratorio pero sin embargo ellos indican que al realizar las pruebas en campo el hongo no presento el desarrollo hiperparasítico deseado, de lo cual indican que aplicaron en una baja humedad relativa y con otros factores ambientales.

Macdonal *et al.* (2013), así como Jackson *et al.*, (2012) mostraron el potencial epizootico de *Lecanicillium lecanii* de realizar un control biológico mediante las interacciones de mutualismos entre hormigas y la escama del café, en donde indican que *Lecanicillium lecanii* es un enemigo natural de la escama del café (*Coccus viridis*), el cual a su vez también posee una relación con la hormiga *Azteca instabilis* y en donde estas transportan y así mismo protegen a la escama de depredadores parasitoides, ya que en las escamas se producen un néctar rico en carbohidratos que las hormigas consumen y 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*.

## 2.2 Marco teórico

### 2.2.1 Reseña Histórica del café en el Perú

En el país, por la diversidad de combinaciones de clima, suelos, precipitación y luz solar constituye un escenario propicio para el cultivo del café (*Coffea arabica*) con distintos perfiles de sabor, aroma y acidez. Las variedades que se cultivan son: Caturra (70%), Catimor (13%), Bourbon (8%), Typica (7%), y otras (2%), en el Perú, la producción de café involucra el trabajo de más de 223,000 familias, que cultivan 425,000 hectáreas. De estas más de 155,000 están certificadas por algún esquema de comercio justo y mayoritariamente orgánicos (Marca, 2017). En nuestro país operan 75 empresas exportadoras de café y las organizaciones que ofertan cafés especiales están compuestas por un total de 28 productores y hasta el momento 20 empresas concentran el 90% de las exportaciones, de las cuales las 10 primeras superan el 75% del valor exportado, mostrando una tendencia a la concentración en el negocio cafetero, en similitud al comercio mundial acaparando por 7 grandes empresas. Perú es el tercer productor sudamericano de café, detrás de Brasil y Colombia (Jara, 2015), la zona sur, está integrada por los departamentos que son Apurímac, Ayacucho, Cusco y Puno que cultivan 53 mil hectáreas el cual comprende un 23% del área total.

### 2.2.2 Antagonismo

**Definición.** - El antagonismo es una interacción entre microorganismos donde uno interfiere con el otro, es decir causa la pérdida o la actividad de uno de ellos (Pérez, 2004), es esta la base sobre la que se sustenta el verdadero control biológico de microorganismos fitopatógenos en las plantas (Robles, 2014).

#### **-Hongos antagonistas**

En la rizosfera crecen diversos tipos de hongos antagonistas que son utilizados en controles biológicos (Almaraz *et al.* 2012), estos microorganismos poseen las capacidades de realizar múltiples efectos de control sobre fitopatógenos de interés, lo que les confiere su reconocido uso en el control de enfermedades agrícolas (Hernández *et al.* 2007).

### **2.2.3 Mecanismo de acción**

Algunos mecanismos de acción de los hongos antagonistas son la antibiosis, competencia por espacio o por nutrimentos, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia. En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de éstos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico (Larrea, 2001). Por otra parte, los mecanismos antagónicos de combate biológico también incluyen la competencia, la antibiosis o alelopatía, el hiperparasitismo y la depredación (Arauz, 1998).

### **2.2.4 La competencia**

La competencia es el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, esto siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás y la competencia más común es por nutrimentos, oxígeno o espacio (Larrea, 2001). La principal causa de muerte de los microorganismos es la falta de nutrientes, por lo que la competencia por ellos es un modo de ejercer biocontrol sobre hongos fitopatógenos (Vargas, 2014).

### **2.2.5 La antibiosis.**

La antibiosis se define como el fenómeno mediante el cual un microorganismo antagonista inhibe o destruye a un organismo por medio de la producción metabólica de

pequeñas moléculas tóxicas, compuestos volátiles y de enzimas líticas, las cuales se van a encargar de disolver o dañar polímeros estructurales de la pared celular de los microorganismos fitopatógenos como lo son la quitina y  $\beta$  (1-3) glucano (Alfaro, 2013).

### **2.2.6 El hiperparasitismo**

El parasitismo se puede definir como una relación entre dos especies en la cual una, denominada parásito, se alimenta de la otra, denominada hospedante, mediante la absorción por periodos prolongados o la utilización directa de sustancias elaborada por esta, (Arauz, 1998). Generalmente, están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasa, celulasa,  $\beta$  1, 3 - glucanasa y proteasa, que rompen las estructuras de los hongos parasitados. Los ejemplos más conocidos de hongos hiperparásitos son *Trichoderma* y *Gliocladium*. (Larrea, 2001).

### **2.2.7 Micoparasitismo**

El micoparasitismo es la acción antagónica entre dos hongos, el uno (hiperparásito) parasita al otro (micoparásito) a través de una síntesis de exoenzimas hidrolíticas esto para facilitar la degradación de la pared celular del hospedante así mismo un antagonista puede utilizar a un hongo como fuente de alimento (Pérez, 2004), y se dividen en dos grupos: biotrópicos, en donde tienen un rango restringido de hospedantes y necrotrópicos en donde matan a la célula antes o después de la invasión, excretan sustancias tóxicas y utilizan sus nutrientes (Robles, 2014).

### **2.2.8 El Género Trichoderma**

#### **a) Ecología del microorganismo**

*Trichoderma* es una especie que crece en casi todas las regiones climáticas y en una gran variedad de suelos, como pueden ser, praderas, suelos agrícolas, forestales, salinos y

desérticos así también *Trichoderma harzianum* es característico de temperaturas cálidas y/o templadas (Cabrera y Tejera 2002). Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces las cuales son colonizadas rápidamente por estos microorganismos y cabe mencionar que de las especies de *Trichoderma* que frecuentemente se utilizan para el biocontrol, son las especies *harzianum* y *viride*, de las cuales la primera ha sido la más estudiada. *Trichoderma* es un fungicida de amplio espectro de acción así también es eficaz contra diversos organismos y géneros de patógenos; tanto en el suelo contra pudriciones de raíces como *Armillaria*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Phytophthora*, *Fusarium*, enfermedades que se presentan en numerosas especies tanto anuales como perennes, o bien, contra géneros productores de enfermedades de órganos aéreos como *Botrytis* o *Stereum* (Romero *et al.*, 2015).

## **b). Factores que influyen en el crecimiento**

### **1. Temperatura.**

Dentro de los rangos ampliamente apropiados de temperaturas para el adecuado desarrollo de *Trichoderma* se encuentra entre los 10°C a los 40°C, considerándose una óptima de 25°C (Alexpoulos, 1996). Según otros estudios, se ha demostrado que el crecimiento saprofítico en el suelo de *Trichoderma* se presenta a una temperatura que oscila entre los 20°C y los 30°C, con una temperatura óptima de 25°C (Vargas, 2014), y las especies como *Trichoderma citrinoviride* y *Trichoderma saturnisporum*, parecen tener el óptimo de temperatura más alto (entre 38 y 44° C); *Trichoderma viridae* y *Trichoderma polysporum* el rango de temperatura óptimo y más fresco esta (entre los 20 a 25° C); y en términos medios,

especies como *Trichoderma harzianum* con un rango de temperatura cálido que oscila entre los 22 a 33° C, con una temperatura óptima de 27° C (Romero *et al.* 2015).

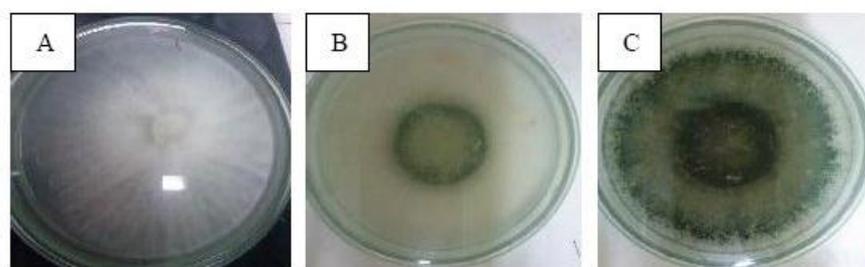
## **2. Humedad**

La humedad favorable para su desarrollo de *Trichoderma* está alrededor de 70% y 80%. Una de las limitaciones más importantes del uso de *Trichoderma* como biofungicida es su bajo nivel de tolerancia osmótica (0.5 M o menos). Las condiciones de agua afectan las actividades de este hongo, en especial la germinación de la espora y el crecimiento del tubo germinal, así como el crecimiento del micelio, y tiene un efecto crítico en la interacción con otros hongos y la producción de enzimas (Chavez, 2006).

## **3. pH**

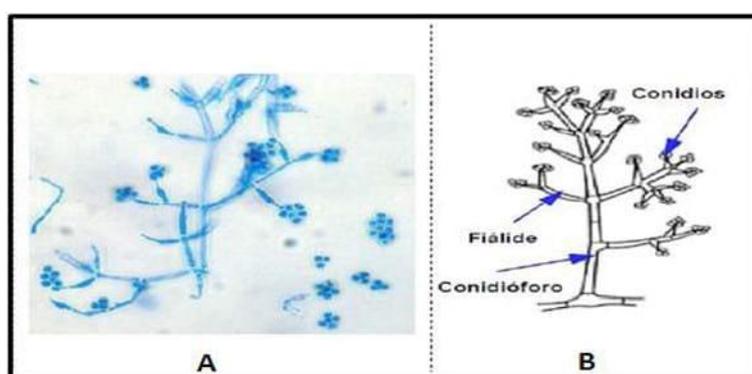
El pH juega un papel muy importante en regulación de la producción de enzimas extracelulares, *Trichoderma* presenta un amplio rango de crecimiento a valores de pH comprendidos entre 2,0 y 9,0 y con un pH óptimo que se encuentra entre 4,0 y 7,0 (Vargas, 2014). Así también el oxígeno es esencial para los hongos tales como el oxígeno y el dióxido de carbono *Trichoderma* es un hongo netamente aerobio obligado (Romero *et al.* 2015), así mismo la luz es importante como en la mayoría de especies del género *Trichoderma* son fotosensibles, esporulando rápidamente sobre sustratos naturales o artificiales, en patrones anulares con céntricos en respuesta a la luminoso. La máxima actividad fotoinductiva se encuentra entre los 380nm y 440nm rango visible, no ocurriendo esporulación bajo los 245nm (Chávez, 2006).

### **a). Características macroscópicas**



**Figura 1.** Características de crecimiento de *Trichoderma inhamatum*, A. a las 48 h luego de la siembra del inóculo se observa crecimiento algodonoso blanquecino. B. 72 h empiezan la esporulación, formando un halo verde característicos, C se observa a las 96 h el crecimiento de un segundo halo completando la totalidad de la caja Petri. Fuente: (García *et al.*, 2016).

Este género de hongo *Trichoderma* presenta las siguientes características que son; Conidioforos, fiálides, conidios y clamidosporas (Poalacin, 2015).



**Figura 2.** Imagen microscópica (Izquierda) y esquematización (derecha) de *Trichoderma harzianum* Donati, (2011).

La colonia de este género en un medio de cultivo con agar crece muy rápido y los conidios se forman rápido y abundantemente en forma de polvillo no hay micelio aéreo y la pigmentación es típica en tonos verdes, verdes-amarillos; algunos cultivos presentan un olor

parecido al coco y muchas de estas cepas crecen eficientemente que pueden ser en medios sólidos o líquidos y en un amplio rango de temperaturas, además son parcialmente tolerantes a humedades bajas y tienden a crecer en suelos ácidos (Robles, 2014).

#### **b). Mecanismo de acción de *Trichoderma***

Este género es bien conocido por tener la habilidad de reducir las enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos de los suelos (Inbar *et al.* 1995), los mecanismos considerados más importantes en la interacción de antagonismo de *Trichoderma* es; la competencia por los nutrientes indispensables para la germinación de esporas, la antibiosis por la producción de enzimas líticas y metabolitos secundarios que son la llave en muchas interacciones que causan la destrucción del patógeno y el micoparasitismo (Michel, 2001).

### **Mecanismos directos**

#### **1.- Micoparasitismo**

El parasitismo que es ejercido por *Trichoderma* es destructivo, causando la muerte del hongo huésped (Barnett & Binder, 1973). El micoparasitismo trata de una secuencia de eventos moleculares y bioquímicos involucrados en este fenómeno y en los mecanismos celulares de la interacción del micoparasitismo (Vargas, 2014).

Algunos eventos secuenciales implicados en el micoparasitismo

#### **a). Crecimiento quimiotrópico**

El quimiotropismo positivo dirige el crecimiento hacia un estímulo químico en la etapa de localización del hospedante, se ha demostrado que *Trichoderma* puede detectarlo a

distancia y sus hifas crecen en dirección al patógeno como respuesta a un estímulo químico (Vargas, 2014).

#### **b). Reconocimiento**

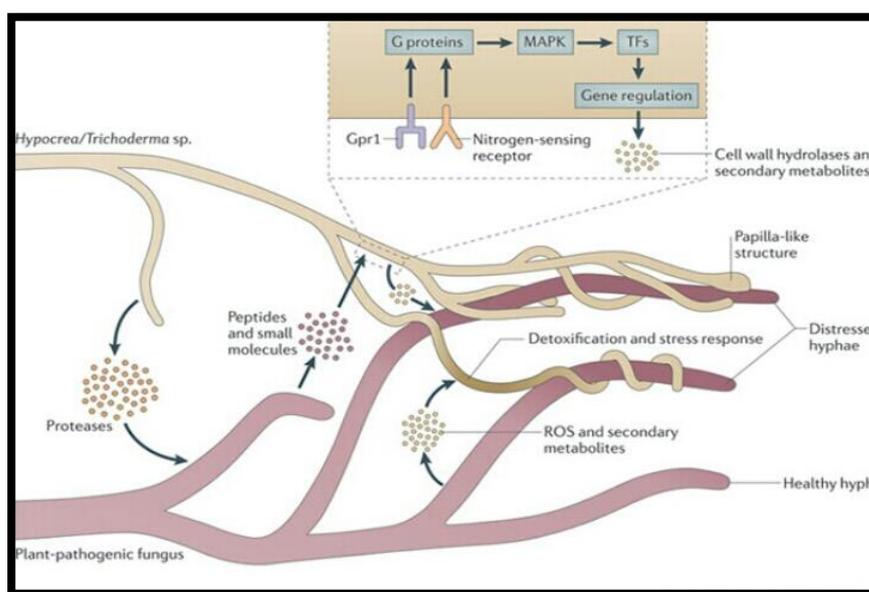
El reconocimiento se realiza a través de interacciones de lectinas y carbohidratos, las lectinas son proteínas enlazadas a azúcares o glicoproteínas, las cuales aglutinan células y esta involucradas en las interacciones entre los componentes de la superficie de las células y su ambiente extracelular (Vargas, 2014).

#### **c). Adhesión y enrollamiento**

Tras el reconocimiento, las hifas del *Trichoderma* se unen al hospedante a través de la formación de estructuras en forma de ganchos y apresorios alrededor de las hifas del patógeno la adherencia de las hifas de *Trichoderma* ocurre gracias a la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno (Vargas, 2014).

#### **d). Actividad Lítica**

En esta etapa ocurre la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas que degradan las paredes celulares del hospedante y posibilitan la penetración de las hifas del antagonista (Haram *et al.*, 1996). Por los puntos de contacto por donde se produce la lisis y aparecen los orificios, penetra la hifa del micoparásito en las del hongo hospedante y las especies de *Trichoderma* tienen un elevado potencial parasítico, con una actividad metabólica muy particular, que les permite parasitar eficientemente las estructuras fúngicas de los hongos (Sandoval & López, 2002).



**Figura 3.** Elementos implicados en el micoparasitismo ejercido por *Trichoderma* frente a otro hongo. Tomado de Drushinina *et al.*, (2011), citado por (Vargas, 2014).

#### d). Antibiosis

Entre una de las enzimas hidrolíticas que producen estas especies de *Trichoderma spp.* se reportan a las enzimas como; quitinasas, glucanas, proteasas y celulasas. Dichas enzimas están relacionadas en el fenómeno de antibiosis y micoparasitismo esto al degradar la pared celular y sin penetrar o micoparasitar al hospedero (Michel, 2001). La inducción de las enzimas quitinolíticas en *Trichoderma* es la fase inicial de reconocimiento, es la primera etapa en la cascada de eventos que presentaran en la actividad parasítica del antagonista (Inbar & Chet, 1995).

#### c). Especies del Género *Trichoderma*.

Actualmente se conoce las siguientes especies del género *Trichoderma*: *T. aggressivum*, *T. álbum*, *T. arundinaceum*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. aureoviride*, *T.*

*brevicompactum*, *T. citrinoviride*, *T. citrinoviridex*, *T. crassum*, *T. erinaceum*, *T. fasciculatum*, *T. fertile*, *T. gamsii*, *T. ghanense*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. koningiopsis*, *T. longibrachiatum*, *T. lignorum*, *T. minutisporum*, *T. oblongisporum*, *T. ovalisporum*, *T. pleurotica*, *T. polysporum*, *T. pseudokoningii*, *T. pubescens*, *T. reesei*, *T. saturnisporum*, *T. spirale*, *T. strictipile*, *T. strigosum*, *T. stromaticum*, *T. tomentosum*, *T. virens*, *T. viride*, *T. viridescens* (Robles, 2014).

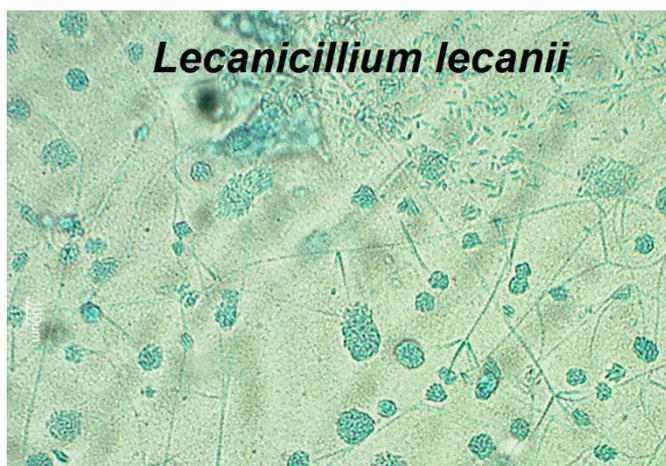
#### 2.2.9 Género *Lecanicillium* spp

##### **Ecología del microorganismo**

*Lecanicillium lecanii* posee una amplia distribución mundial, este hongo ha sido aislado de sustratos como suelo, de insectos en todas sus etapas de desarrollo. Puede crecer a una temperatura entre 4°C y 30°C y la humedad relativa óptima para la germinación de los conidios se encuentra entre 90 y 95%. Se han desarrollado cepas de *L. lecanii* altamente virulentas y epizooticas como agentes biocontroladores de ciertos insectos, *L. lecanii* también es un micoparásito de royas (Montalva, 2008).

##### **Características Macroscópicas y microscópicas**

Las colonias crecen de 1, 8-2,2 cm en 10 días a una temperatura de 20°C presentan blanco a amarillo pálido de aspecto algodonoso (Acosta, 2006), y microscópicamente podemos observar los conidióforos, las fiálides que miden de 11 a 30µ de largo x 1.5 a 2µ de diámetro y los conidios que salen del extremo de las fiálides en grupos formando cabezuelas que son elipsoidales de 2 a 4 x 1 a 1.5µ (Cañedo & Ames, 2004).



**Figura 4.** Imagen microscópica de *Lecanicillium lecanii* (Cortez, 2003).

### **Daño que produce el hongo**

El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan degradación del tejido en la zona de penetración, lo que facilita la penetración física (Monzón, 2001). Así mismos estudios *in vitro* realizados indican que en la digestión del integumento sigue una secuencia de las enzimas lipasa-proteasa y quitinasa (Tanada & Kaya, 1993).

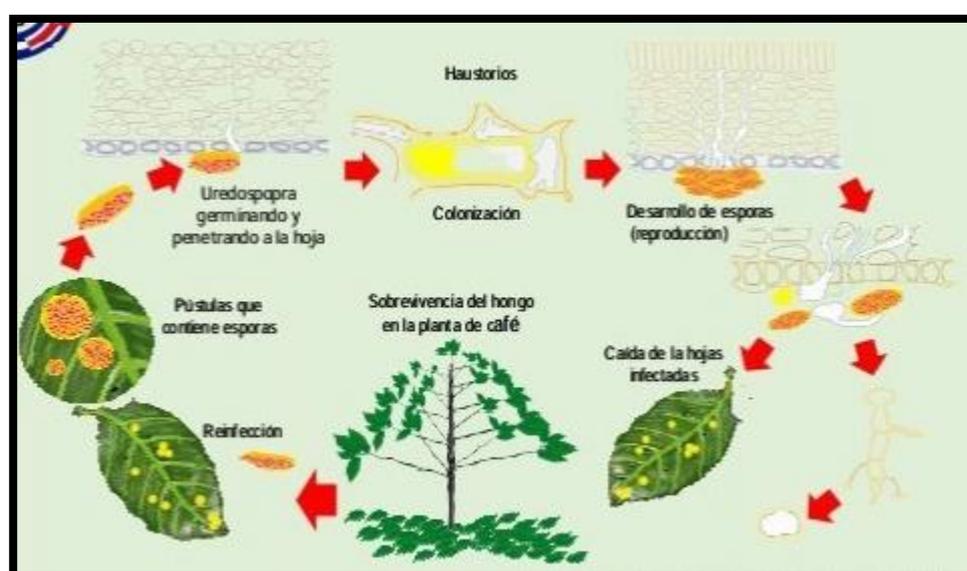
### **Mecanismo de acción**

El modo de acción de *Lecanicillium lecanii* es por contacto, hiperparasitando otros hongos. Una vez que las esporas de *L. lecanii* entran en contacto con el patógeno se da una liberación de enzimas, como la  $\beta$ -1,3-glucanasa, quitinasa, amilasa y proteasas, las cuales causan alteraciones en las paredes celulares del hospedero, permitiendo que las hifas de penetración de *L. lecanii* ingresen (Askary *et al.*1997), posteriormente se observa una desorganización del citoplasma en las células del patógeno debido a la pérdida de las células y contorsión de la pared celular. Por ultimo las células atacadas colapsan, reduciendo su

protoplasma debido a la extensa multiplicación del antagonista y al estar totalmente rodeado por este (Vargas, 2017).

### 2.2.10 Roya amarilla (*Hemileia vastatrix*)

La roya es la enfermedad causada por un parásito obligado que afecta las hojas de las especies del género *Coffea*, en especial *C. arabica*. El ciclo de vida de *Hemileia vastatrix* está comprendido por cuatro etapas que son: diseminación, germinación, colonización y reproducción (Rivillas *et al.*, 2011).



**Figura 5.** Ciclo biológico del hongo *Hemileia vastatrix* (OIRSA, 2013).

#### a). Sintomatología:

Los primeros síntomas de la enfermedad aparecen en el envés de las hojas, por donde penetra el hongo (Vargas, 2017). Consiste en pequeñas lesiones amarillentas que con el tiempo se vuelven coalescentes, 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 divisen manchas cloróticas. Finalmente, las lesiones se vuelven necróticas (Pico, 2014).

#### **b). Daños que provoca la roya**

El daño causado por este hongo es la caída prematura de las hojas, lo que trae como consecuencia una reducción severa del proceso fotosintético y de la capacidad productiva. Cuando los ataques son severos, se provoca la caída de grandes cantidades de hojas, que causan un debilitamiento general de la planta, una maduración muy irregular de la cosecha y una reducción de la producción para el siguiente año, estimándose alrededor de un 20 y 40 % (Barquero, 2013). Esta enfermedad está relacionada con la alta carga fructífera, falta de fertilización, uso inadecuado de fungicidas y variabilidad climática, entre otros factores que debilitan la planta, haciéndola más susceptible a ataques severos (Feijoo, 2014).

#### **c). Epidemiología**

Barquero, (2013), menciona que uno de los principales factores que vienen favoreciendo el desarrollo de la enfermedad depende de la relación ya sea entre el hospedante (plantas de café), el patógeno que viene a ser (el hongo) y el ambiente (las variaciones climáticas); además otro factor importante que influye también es el hombre (Feijoo, 2014).

#### **d). Taxonomía:**

La Roya del Cafeto, enfermedad causada por el patógeno *Hemileia vastratrix* es un hongo que pertenece a la familia Puccineaceae, orden Uredinales, clase Basidiomycetes. Todos los hongos pertenecientes a este orden, son parásitos obligados, desarrollados

únicamente en tejido vivo de su planta hospedera, en este caso las hojas del cafeto (Mora, 2016)

Clasificación taxonómica

Reino : Fungi

Phylum : Basidiomycota

Subphylum : Puccioniomycotina

Clase : Pucciniomycetes

Orden : Pucciniales

Género : Hemileia

Especie : *Hemileia vastatrix* Berk & Ber (Mora, 2016)

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Ámbito de estudio

La investigación se realizó en dos sectores de la Provincia de Sandía:

La primera recolección de muestra se realizó en el sector Miraflores Lanza ubicada a una latitud sur de  $14^{\circ}.5'49.30''S$  y longitud oeste de  $68^{\circ}53'31.63''O$  y una altitud de 942 m.s.n.m. perteneciente al distrito de San Pedro de Putina Punco, provincia de Sandía de la Región Puno. El segundo lugar de toma de muestra fue el sector Uycusmayo ubicada a una latitud sur  $14^{\circ}13'56.58'' S$ , Longitud oeste  $69^{\circ}2'27.88''O$  y una altitud de 1315 m.s.n.m. perteneciente al distrito de San Juan del Oro, provincia Sandía de la región de Puno. Todos los análisis, tratamientos y la identificación taxonómica de los hongos se realizaron en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno ubicado en las coordenadas UTM -15.824854, -70.017984 (Zona de trabajo), (Google Maps, 2018) (Figura 6).



**Figura 6.** Mapa de la provincia de Sandía con los dos sectores de estudio, abril 2018.

### 3.2 Población y muestra

Para esta investigación se consideró 1ha de cultivo de café para cada sector, de donde se seleccionaron 10 hojas de café (*Coffea arabica*) presuntivamente infectadas con el hongo de la roya amarilla (*Hemileia vastatrix*) y también 10 hojas infectadas por otros hongos de una apariencia blanquecina, luego estas hojas fueron colocadas en frascos de vidrio, en cada frasco se colocó solo 2 a 3 hojas y fueron tapados para su transporte hasta el laboratorio. Así también se realizó el muestreo del suelo por el método al azar, para la toma de muestra se cavo el suelo cafetal a una profundidad de 5cm de donde se tomó 100g de tierra el cual también fue colocado en un frasco para su transporte hasta el laboratorio de microbiología.



**Figura 7.** Hojas de café infectados con hongos. Sandia, abril 2018.



**Figura 8.** Muestreo de suelo de cultivo de café. Sandia, abril 2018.

### 3.3 Tipo de investigación

El tipo de investigación fue descriptivo y analítico, ya que se aisló los hongos tanto de las hojas del café como del suelo y se determinó que estos hongos aislados tienen la capacidad antagonica frente al hongo de la roya amarilla del café (*Hemileia vastatrix*).

### 3.4 Metodología

a). **Aislamiento e identificación de los hongos *Trichoderma spp.*, *Lecanicillium spp.*, y el hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix* de las hojas y suelo circundante a la planta del café del sector Miraflores Lanza y del sector Uycusmayo.**

#### 3.4.1. Aislamiento de los hongos *Trichoderma spp* (del suelo)

**-Cultivo de Hongos en placas Petri:** Para el cultivo y aislamiento de los microorganismos principalmente se tuvo en cuenta en brindarles las condiciones adecuadas como físicas, químicas y nutritivas para que estas puedan multiplicarse adecuadamente de forma controlada y para realizar el aislamiento se usó la metodología sugerida por (Astorga *et al.*, 2014).

**-Procedimiento.-** Se pesó 1g de muestra de suelo de cada lugar de muestreo y se suspendió en un matraz con 9ml de agua destilada estéril para cada uno y se homogenizo durante 3 a 5 minutos y seguidamente con una pipeta descartable se tomó lo preparado y se incorporó una alícuota de 0.5ml en el medio Agar Sabouraud ya preparada (gelificada) para cada sector se consideró a 2 repeticiones, con la ayuda de una Asa de digralsky se extendió uniformemente sobre la superficie de la placa, se selló y fue colocado a una temperatura de 28°C, las observaciones se realizaron a las 48 hora las colonias se reconocieron por su crecimiento rápido. Para el aislamiento del hongo *Trichoderma spp* se realizó la resiembra en Agar Papa

Dextrosa (PDA), con dos repeticiones para cada sector y fueron incubados a una T° de 28°C durante 4 a 6 días pasado el tiempo se observaron el crecimiento de los hongos con características morfológicas de color verdosas los cuales fueron observados al microscopio para su identificación correspondiente.

#### **3.4.2. Aislamiento de los hongos *Lecanicillium spp.* (De las hojas de café)**

Para el aislamiento de los hongos procedentes de las hojas de café se realizó según la metodología usada por (Molina *et al.*, 2006).

**-Procedimiento:** Se seleccionaron hojas infectadas con hongos de color blanco los cuales fueron cortadas todas las áreas afectadas en trozos pequeños de un tamaño de 2x2mm haciendo un total de 8 fragmentos los cuales se colocaron en placas Petri, en cada placa se colocó 4 fragmentos con papel absorbente humedecido en agua destilada estéril así formando una cámara húmeda para estimular su esporulación de los hongos durante 24 horas se incubo a una temperatura de 28 °C, pasado el tiempo se tomó con una pinza los cortes de hojas y estas se colocaron en placas Petri contenida ya con agar papa dextrosa (PDA) en los 4 puntos, y se incubo a 30 °C durante los días se controlaron el crecimiento de los hongos y también se realizó las respectivas identificaciones luego ya identificados se realizaron las resiembras de los hongos que nos interesa para la investigación hasta obtener los cultivos puros del hongo.

#### **3.4.3 Aislamiento del hongo de la roya amarilla del café (*Hemileia vastatrix*)**

Para realizar el aislamiento de los hongos de la roya amarilla del café se utilizó la misma metodología (Martínez *et al.*, 2013).

**Procedimiento:** Primeramente se seleccionaron todas las hojas infectadas con el hongo de la roya amarilla del café, de los cuales las áreas afectadas de las hojas se cortaron en trozos pequeños de un tamaño de 2x2mm haciendo un total de 4 fragmentos estas fueron sumergidas en etanol al 70% (durante 1 minuto) y en hipoclorito de sodio al 3% (durante 1 minuto) y finalmente en agua destilada también por 1 minuto para eliminar los restos que pudieran quedar de los desinfectantes, luego de inmediato se secó en papel filtro estéril y en seguida se colocaron en placas Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) para su desarrollo y fueron incubados a 28°C durante 6 días luego se realizó la identificación en un microscopio seguidamente se realizó la resiembra en otras placas con agar PDA y Sabouraud, los factores de crecimientos específicos para estos hongos es la humedad adecuada, las condiciones favorables de temperatura (21 a 25°C) y los sustratos necesarios en su medio de cultivo que es importante para un buen desarrollo.

#### **3.4.4. Identificación de los hongos *Trichoderma spp.*, *Lecanicillium spp.* y *Hemileia vastatrix*.**

Para la identificación de los hongos se usó las láminas porta y cubre objetos así mismo la cinta adhesiva transparente y tinta de azul de Lactofenol.

##### **-Observación microscópica.**

**-Técnica de cinta pegante:** Esta técnica es una de la más usada, debido a que se conserva la yuxtaposición original de las esporas y segmento de las hifas. Para su realización se toma una tira de cinta de 4cm y con el alado adhesivo de la cinta hacia fuera, sosteniendo con una pinza y presionando firmemente hacia la colonia del hongo que desea estudiar.

Posteriormente la tira de cinta se coloca en un portaobjetos con una gota de azul de Lactofenol (Arias & Piñeros, 2008).

### **-Tinción Azul de Lactofenol o de Algodón**

**-Fundamento:** Es una tinción simple posee características tintoriales que permiten observar cada uno de los componentes fúngicos y apreciar fácilmente las estructuras para una adecuada identificación. Asimismo, posee características importantes que lo hacen especial para observar dichas estructuras en los hongos del tipo moho obtenidos en los cultivos por aislamiento.

El fenol inactiva las enzimas líticas de la célula e impide que ésta se rompa; de igual forma, destruye la flora acompañante e inactiva la célula, quitándole el grado de patogenicidad; además, actúa como mordiente cuando se usa en combinación con colorantes. El ácido láctico preserva las estructuras fúngicas una vez provocada un cambio de gradiente osmótico con relación al interior fúngico, lo que esto genera es una película protectora. El azul de algodón es un colorante ácido, que tiñe el citoplasma y la quitina presente en las células fúngicas, mientras que el glicerol mantiene húmeda la preparación (López *et al.*, 2013).

**-Procedimiento:** Primeramente se seleccionaron las colonias de hongos desarrollados, seguidamente se cortaron segmentos de cintas adhesivas transparente con un aproximado de 1 cm luego esta se pegó en un asa de siembra, en una lámina portaobjetos se puso una gota de azul de lactofenol y con el lado adhesivo de la cinta se tocó la parte superior del hongo y esta cinta se colocó sobre el azul de lactofenol ya preparado en la lámina y encima una gota más de azul de lactofenol se agregó seguidamente se cubrió con una lámina de cubreobjetos

y después se llevó a la observación al microscopio con el objetivo de 40x para el reconocimiento de los hongos (López *et al.*, 2013).

#### **3.4.4. Identificación taxonómica de los hongos**

**-Claves taxonómicas.** Para la identificación de todos los hongos se utilizó diferentes claves taxonómicas, en las que se tomó en cuenta tanto las características macroscópicas como microscópicas y en especial las estructuras reproductivas, utilizando como referencia la literatura de los siguientes (Alexopoulos, 1996).

#### **Análisis estadístico**

Se utilizó el diseño completamente al azar (DCA), los tratamientos correspondieron a los sectores de donde procedieron las muestras de suelo y las muestras de hojas (dos sectores de la provincia de Sandia, cada uno con distintos puntos de muestreo) que formaron un total de 6 unidades experimentales. La variable respuesta fue los diámetros de crecimiento durante los diez días de cada hongo de ambos sectores, que fue comparada entre cada especie mediante un análisis de varianza y prueba de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) para su comparación entre sectores, todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de confianza del 95% y los datos se procesaron con el software estadístico INFOSTAT versión estudiantil 2017 para Windows. Teniendo en cuenta las siguientes variables:

#### **Evaluaciones**

**-Medición del crecimiento en diámetro de *Trichoderma spp*, *Lecanicillium spp* y *Hemileia vastatrix*.**

Se evaluó el Diámetro de Crecimiento de los Antagonistas (DCA) de ambos sectores y el Diámetro de Crecimiento del Patógeno (DCP) también de los ambos sectores dentro de las placas Petri en forma individual.

**Tabla 1.** Tratamiento empleado en la investigación

CLAVE	LUGAR	TRATAMIENTO
M1	M. Lanza	<i>Trichoderma spp.</i>
M1	M. Lanza	<i>Lecanicillium spp.</i>
M1	M. Lanza	<i>Hemileia vastatrix</i>
M2	Uycusmayo	<i>Trichoderma spp.</i>
M2	Uycusmayo	<i>Lecanicillium spp.</i>
M2	Uycusmayo	<i>Hemileia vastatrix</i>

**Donde:** M1 = Muestra 1, M2 = Muestra 2 y M. Lanza = Miraflores Lanza

**b). Evaluar la actividad antagónica de *Trichoderma spp* y *Lecanicillium spp* sobre el hongo *Hemileia vastatrix* en cultivos *in vitro***

### 3.4.5. Prueba de antagonismo *in vitro*

Para determinar la capacidad antagonista de los hongos *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.*, sobre el hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix* se aplicó un diseño completamente al azar, con cuatro repeticiones. La unidad experimental correspondió a la técnica de cultivos duales en placas Petri usando el medio de cultivo Papa Dextrosa Agra (PDA).

**-Procedimiento:** Primeramente, las placas se dividieron en dos secciones para realizar esta prueba, en 4 placas Petri con PDA se sembró a 5mm del extremo de la caja Petri el hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix* de 10 días de crecimiento y se incubó a 28°C durante tres días para que este inicie su crecimiento micelial (Hoyos *et al.*, 2008). Transcurrido este periodo de tiempo se observó un buen desarrollo del hongo, se sembró al lado opuesto, a una distancia de 7 cm, un disco de 5 mm de diámetro de un cultivo de aislamiento de *Trichoderma spp.* de 5 días de crecimiento y en otra placa de la misma forma con el hongo *Lecanicillium spp.* de 7 días de crecimiento de esta manera se dejó a las dos cepas, también como testigo se sembró de manera individual al hongo *Hemileia vastatrix*, todas las placas Petri se incubaron a una temperatura de 28°C durante una semana hasta la toma de datos. Se efectuaron mediciones cada 24 horas para constar el crecimiento de hongo patógeno y antagonista (Arbito, 2017).

#### **d). Lectura de ensayos**

Para ambos casos en cada ensayo se evaluaron los criterios de porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del patógeno (Royse & Ries, 1978). Después de sembrar el antagonista en las cajas, la actividad de los aislamientos de *Trichoderma spp* y *Lecanicillium spp* se clasificaron de acuerdo con el grado basado en una escala de 1 a 5 en la cual 1 es el

100% de micoparasitismo y 5 es 0% de micoparasitismo. Un aislamiento se considera antagonista contra el patógeno si el promedio es  $\geq 3$ . A un tratamiento que obtenga un promedio entre 2 y 3 no se le asigna clasificación según (Hoyos *et al.*, 2008).

**Tabla 2.** Tratamientos empleados en la investigación

Código de muestras	Clave	Lugar	Tratamiento	N° de repeticiones
			<i>Trichoderma</i>	
M1	T1	M. Lanza	<i>spp</i> y <i>Hemileia vastatrix</i>	2
			<i>Lecanicillium</i>	
M1	T2	M. Lanza	<i>spp.</i> y <i>Hemileia vastatrix</i>	2
			<i>Trichoderma</i>	
M2	T3	Uyusmayo	<i>spp</i> y <i>Hemileia vastatrix</i>	2
			<i>Lecanicillium</i>	
M2	T4	Uyusmayo	<i>spp.</i> y <i>Hemileia vastatrix</i>	2

**Donde:** M= Muestra, T= Tratamiento y M. Lanza= Miraflores Lanza

### e). Análisis estadístico

El diseño experimental fue aleatorio, se realizaron 2 repeticiones para cada uno de los tratamientos los cuales correspondieron al diámetro de crecimiento y a los tiempos de la actividad antagónica de los hongos *Trichoderma spp.*, y *Lecanicillium spp.* frente al hongo *Hemileia vastatrix* (a los 10 días de evaluación). Los resultados de cada prueba se realizó los análisis de varianza (ANOVA) y prueba de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) para la comparación entre los tratamientos de cada variable, todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de confianza de 95%. Los datos se procesaron con el software estadístico INFOSTAT versión estudiantil 2017 para Windows.

### f). Evaluaciones

**-Medición del crecimiento en diámetro de *Trichoderma spp.*, *Lecanicillium spp.* y *Hemileia vastatrix*.**

Se evaluó el diámetro de crecimiento tanto de los hongos antagonistas y del hongo patógeno, así mismo se evaluó la competencia por nutrientes y espacio se valoró comparando la velocidad de crecimiento para el cual se realizaron mediciones en milímetros para los diámetros de crecimiento esto de cada uno de los antagonistas (DCA) y del patógeno (DCP).

### **-Enfrentamientos duales**

Estas evaluaciones de las interacciones *in vitro* se realizaron midiendo en centímetro del crecimiento de cada hongo tanto al hongo antagonista como también al hongo patógeno. Se comprobó el efecto de antagonismo de los hongos *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.* Sobre el patógeno mediante la evaluación de la capacidad antagónica el cual se realizó

midiendo el grado de micoparasitismo de cada antagonista. Esta se determinó por la escala que propone (Ezziyani *et al.*, 2004).

Asimismo, para indicar el micoparasitismo del posible mecanismo de acción tanto de *Trichoderma spp.* y *Lecnicillium spp.* se realizaron las observaciones macroscópicas de los cultivos duales, observando el micoparasitismo existente la invasión del antagonista sobre el hongo patógeno.

**Tabla 3.** La evaluación de antagonismo se basó en lo recomendado por Elías y Arcos (1984) citada en Ezziyani (2004), de acuerdo a la medida de invasión de la superficie, colonización y esporulación del antagonista sobre los hongos fitopatógenos.

Grado	Capacidad Antagónica
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno
1	Invasión de $\frac{1}{4}$ de la superficie de la colonia del hongo patógeno
2	Invasión de $\frac{1}{2}$ de la superficie de la colonia del hongo patógeno
3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno esporulación sobre ella.

Para evaluar el grado de esporulación del antagonista se utilizó la siguiente escala:

**Tabla 4.** Escala de micoparasitismo, según Royse y Ries (1978).

<b>Grado</b>	<b>Micoparasitismo</b>	<b>Porcentaje de cubrimiento del antagonista de la superficie del medio</b>
	El antagonista cubre	
1	en un 100% el micelio del fitopatógeno	100%
	El antagonista cubre	
2	en un 75% el micelio del fitopatógeno	75%
	El antagonista cubre	
3	en un 50% el micelio del fitopatógeno	50%
	El antagonista cubre	
4	en un 25% el micelio del fitopatógeno	25%

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**4.1 Aislar e identificar a los hongos *Trichoderma spp.*, *Lecanicillium spp.* y al hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix* de las hojas de café y del suelo circundante a la plata de café del sector Miraflores Lanza y del sector Uycusmayo.**

**4.1.1 Aislamiento e identificación de los hongos nativos del suelo y de las hojas de la planta de café (*Coffea arabica*)**

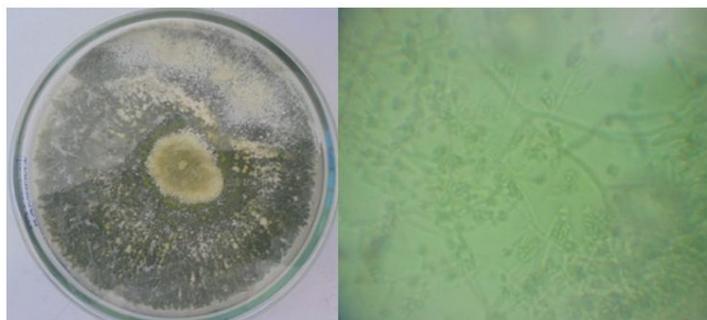
Los suelos de cafetales del sector Miraflores Lanza perteneciente al distrito de San Pedro de Putina Punco y del sector Uycusmayo perteneciente al distrito del San Juan del Oro de la provincia de Sandia presentaron diferentes tipos de hongos nativos. (Anexo A, Figura 28) pero sin embargo solo un total de 5 tipos de hongos fueron identificados, así como *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.* y al hongo patógeno de la roya amarilla del café *Hemileia vastatrix*.

**a). Crecimiento micelial e identificación de los hongos aislados del sector Uycusmayo.**

**-Crecimiento de *Trichoderma spp.***

El tiempo transcurrido del crecimiento del hongo de *Trichoderma spp.*, hasta el llenado total de placa Petri, fue de 10 días, el crecimiento de este hongo inicia con una aparición de su micelio algodonoso de color blanquecino de forma circular y en la parte central empieza a tornarse de un color verde claro, las pústulas tienen una forma de cojín, solitarias y agregadas dispuestas en anillos concéntricos, al centro un verde pálido las colonias son algodonosas y la cara envés se observa de un color amarillo claro, microscópicamente también se muestran los conidióforo con una forma erecto hialino y ramificado, fiálides de

color transparente, conidios en grupos de forma subglobosas característico de este género (Figura 9).



**Figura 9.** Observación macroscópico y microscópico del desarrollo del hongo *Trichoderma spp.*, en el laboratorio de Microbiología de la FCCBB-UNA PUNO, junio 2018.

Nuestros resultados fueron similares a lo que fue descrito por Vargas, (2014), así también cabe mencionar que desde el séptimo y octavo día de desarrollo es decir desde las 168 horas, las colonias del hongo *Trichoderma spp.*, presentaron un aspecto polvoriento esto debido a la alta concentración de esporas producidas por este hongo, similar a lo descrito por Arbito (2017), en su investigación de “Evaluación *in vitro* de la capacidad antagonista de *Trichoderma spp.* Frente a *Fusarium spp.*”.

#### **-Crecimiento de *Lecanicillium spp.***

El tiempo transcurrido en su crecimiento del hongo *Lecanicillium spp.* hasta el llenado completo de la placa Petri fue de 10 días. Su desarrollo inicia con un micelio de color blanco de aspecto algodonoso y a medida que van pasando los días empiezan a tornarse a un color amarillo palido, así también microscópicamente se observaron los conidióforos, las fiálides

y los conidios que salen del extremo de las fiálides en grupos formando cabezuelas que son elipsoidales que se muestran en la fotografía del lado izquierdo (Figura 10).



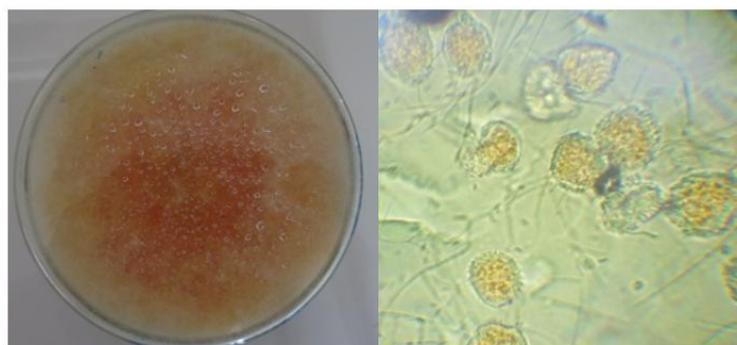
**Figura 10.** Observación macroscópico y microscópico del desarrollo del hongo *Lecanicillium spp*, en el laboratorio de Microbiología de la FCCBB-UNA PUNO, junio 2018.

En su investigación Acosta, (2006), en donde también menciona que el hongo *Lecanicillium lecanii* se caracteriza por presentar conidioforos alargados, ramificados, conidios hialinos y las colonias se desarrollan a una temperatura de 20°C que presentan un color blanco a amarillo pálido de aspecto algodonoso.

En sus investigaciones los autores Cabrera *et al.*, (2012) en donde también indican que las características de este género *Lecanicillium* son colonias ramificadas blancas a amarillo pálido, algodonosas, algo incoloras se muestran en el reverso de las placas, con el micelio más bien rastrero, así mismo indican que las hifas son finas, septadas e hialinas y los conidióforos son sencillos o verticilados que terminan portando los conidios incoloros o blancos cuando están en masas, cilíndricas a algo elipsoidales, las que se agrupan en cabezuelas en forma de globos.

**-Crecimiento micelial del hongo *Hemileia vastatrix*.**

El tiempo de crecimiento de *Hemileia vastatrix* hasta el llenado de toda la placa Petri fue de 240 horas (10 días), su desarrollo inicia con un color naranja en la parte central y al borde con un color blanco algodonoso y con el tiempo comienzan a tornarse de un color naranja amarillenta con una punta del micelio de color blanco, así también se muestra las características macroscópicas y microscópicas del hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix* como se puede ver en la imagen el característico color de las colonias de esta especie es de color naranja algodonosa con esporas media lisas y con bordes blanquecinas. También microscópicamente se observan las esporas denominadas urediniosporas en formas redondas u ovals casi semejantes a un riñón así mismo presentan estas espinas finas en todas sus superficies (Figura 11).

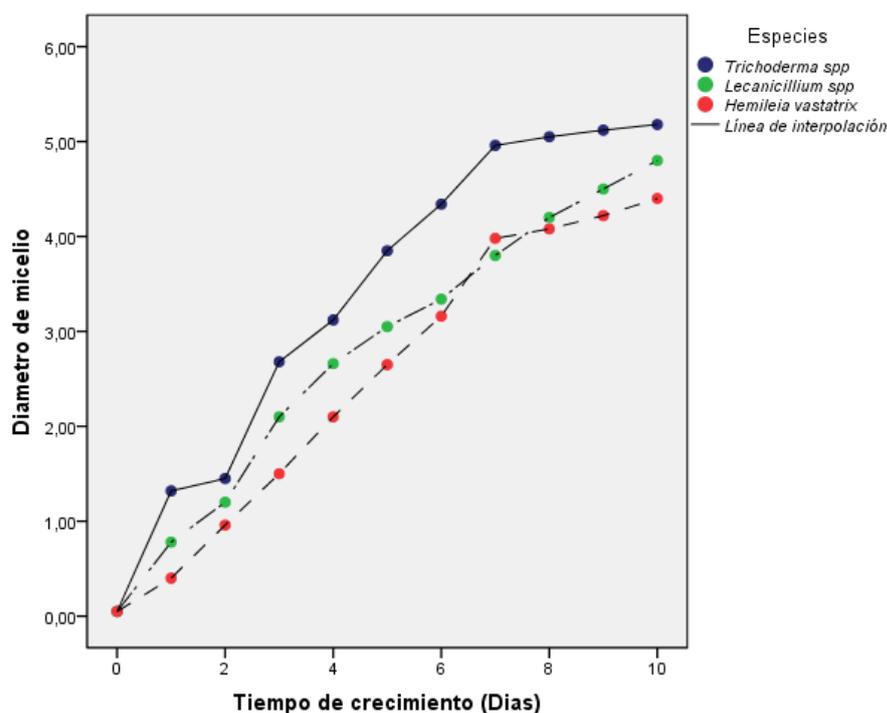


**Figura 11.** Observación macroscópica y microscópica del desarrollo del hongo *Hemileia vastatrix*, en el laboratorio de Microbiología de la facultad de Ciencias Biológicas De la Universidad Nacional del Altiplano Puno, junio 2018.

Estos resultados se asemejan a la descripción morfológica mencionado por Castro *et al.*, (2009). En donde indica que las esporas en observaciones microscópicas son de un tamaño de (30 $\mu$ m de largo x 20 $\mu$ m de ancho) de forma reniforme, lisas en la cara interna y rugosas en la externa, denominadas urediniósporas, y son producidas en grandes cantidades, y

corresponden al polvillo amarillo o naranja que se visualiza en el envés de las hojas de café y es característico de esta enfermedad. Las teliósporas, cuya ocurrencia es muy baja, son de forma redondeada de 20-25 $\mu$ m.

Podemos indicar que el desarrollo micelial para especies de hongos *Trichoderma spp.*, *Lecanicillium spp.* y el hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix* del sector Uycusmayo fueron con una media de desarrollo micelial de 2,8818 y una desviación estándar de 1,65156, indicándonos la poca dispersión de datos respecto a la media concordante, dando así una descripción pareja en el desarrollo micelial en las especies estudiadas. El hongo *Trichoderma spp.*, presento un buen crecimiento en donde podemos indicar que al décimo día de experimento alcanzo un diámetro de crecimiento de 5.18 cm con una correlación de  $r = 0.96$ , y el hongo *Lecanicillium spp.*, también presento un buen desarrollo así alcanzando en 10 días de experimento un diámetro de crecimiento de 4.8 cm con una correlación de  $r = 0.99$ , de la misma forma el hongo *Hemileia vastatrix* tuvo un buen crecimiento al 10 días de experimento en donde alcanzo un diámetro de crecimiento de 4.4 cm con una correlación de  $r = 0.99$ . (Figura 12).



**Figura 12.** Descripción del diámetro de crecimiento in vitro de cepas de hongos nativos aislados de hojas de café (*Hemileia* y *Lecanicillium*) y de suelo circundante (*Trichoderma*) en campos de cultivo de café del sector Uycusmayo.

Laboratorio de Microbiología en la FCCBB-UNA PUNO, julio 2018.

De acuerdo a nuestros resultados podemos indicar que la temperatura juega un papel muy importante para un buen crecimiento de estos hongos, los cuales se incubaron a una temperatura entre 26 °C a 30°C, como se puede ver cada uno de los hongos presentaron un buen crecimiento, Cortez & Ortiz, (2003) en su investigación sobre Caracterización Cultural de Cepas de *Lecanicillium lecanii* obtuvieron los resultados semejantes a lo nuestro en donde reportan que a 25°C observaron un mayor desarrollo de las cepas de conidios pequeños y mientras que a 30°C el mayor desarrollo se obtuvo con las cepas del otro grupo que fueron de conidios intermedios. Así también indican que todas las cepas de *L. lecanii* que evaluaron

requieren de alta humedad relativa (HR) para esporular, en la mayoría de ellas, superior a 90%.

## b). Crecimiento micelial e identificación de los hongos aislados del sector Miraflores

### Lanza.

#### - Crecimiento de *Trichoderma spp.*

El tiempo transcurrido del crecimiento del hongo de *Trichoderma spp.*, hasta el llenado total de placa Petri, fue de 10 días donde presento un buen crecimiento y se pueden observar las estructuras macroscópicas del género *Trichoderma* con su coloración típico de verde oscuro y con un micelio blanquecino algodonoso. así mismo en las observaciones microscópicas se puede ver el micelio el cual está constituido por hifas hialinas, septadas y presenta una ramificación abundante así mismo las clamidosporas se observan en cada terminación de hifas con formas globosas, elipsoidal, y las conidias exparcidas, y los conidioforos con fialides. Al observar estas características propias de este género se identificó como el hongo *Trichoderma spp.* (Figura 13).

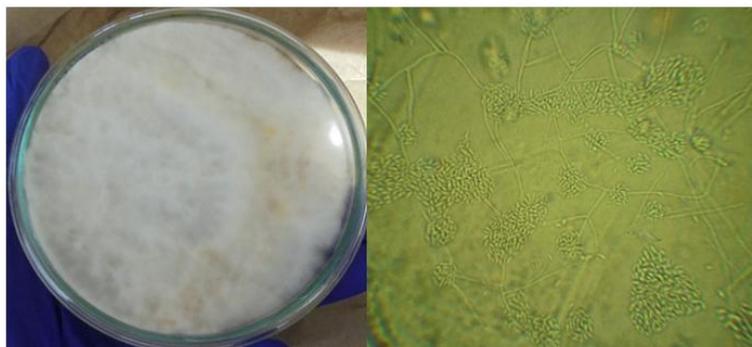


**Figura 13.** Observación macroscópica y microscópico del hongo *Trichoderma spp.*, en el laboratorio de Microbiología de la FCCBB-UNA PUNO, junio 2018.

Estas características mencionadas son similares a lo descrito por Michel, (2001).en donde indica que los el genero trichoderma se caracteriza por presentar conidioforo hialino muy rmificado no verticilado, sus fialides individuales o en grupos y los conidos hialinos de 1 celula, ovoides, nacidos en pequeños racimos terminales.

#### - Crecimiento de *Lecanicillium spp*

El tiempo transcurrido en su crecimiento del hongo *Lecanicillium spp.* hasta el llenado completo de la placa Petri fue de 10 dias. Su desarrollo inicia con un micelio de color blanco de aspecto algodonoso y dentro de los 8 a 10 dias el micelio empieza a tornarse a un color amarillo palido, asi tambien microscopicamente se pueden observar las hifas hialinas y muy delgadas y sus conidioforos alargados y en la parte final se pueden observar la conidias exparcidas en agrupaciones que son incoloras con formas elipsoidales. Tales caracteristicas identifican a este genero *Lecanicillium spp.* (Figura 14).



**Figura 14.** Observación macroscópica y microscópica del desarrollo del hongo *Lecanicillium spp.*, en el laboratorio de Microbiología de la FCCBB-UNA PUNO, junio 2018.

Las características observadas son similares a lo que indica Cañedo & Ames, (2004). que el hongo *Lecanicillium spp.* presentan los conidioforos, fialides que miden de 11 a 30 $\mu$  de lrgo y 1.5 a 2 $\mu$  de diametro y los conidios que salen del extremo de las fialides en grupos formando cabezuelas que son elipsoidales.

#### - Crecimiento micelial del hongo *Hemileia vastatrix*

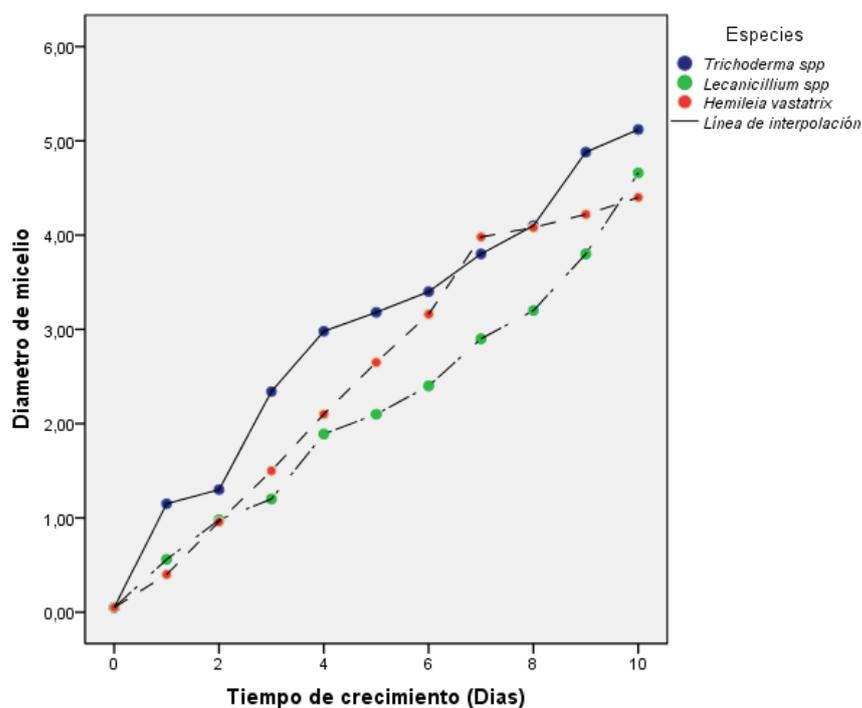
El tiempo de crecimiento de *Hemileia vastatrix* hasta el llenado de toda la placa Petri fue de 240 horas (10 días), macroscópicamente su desarrollo inicia con un color naranja en la parte central y al borde con un color blanco algodonoso y con el tiempo comienzan a tornarse de un color naranja amarillenta con una punta del micelio de color blanco y microscópicamente se observan las urediniosporas en formas redondas u ovales casi semejantes a un riñón así mismo presentan estas espinas finas en todas sus superficies (Figura 15).



**Figura 15.** Observación macroscópico y microscópico del hongo *Hemileia vastatrix*, en el laboratorio de Microbiología de la facultad de Ciencias Biológicas De la Universidad Nacional del Altiplano Puno, junio 2018.

Estos resultados se asemejan a la descripción morfológica hecho por Castro *et al*, (2009). En donde indica que las esporas en observaciones microscópicas son de un tamaño de (30µm de largo x 20µm de ancho) de forma reniforme, lisas en la cara interna y rugosas en la externa, denominadas urediniósporas, y son producidas en grandes cantidades, y corresponden al polvillo amarillo o naranja que se visualiza en el envés de las hojas de café y es característico de esta enfermedad, las teliósporas, cuya ocurrencia es muy baja, son de forma redondeada de 20-25µm.

El desarrollo micelial para especies de hongos *Trichoderma spp.*, *Lecanicillium spp.*, y el hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix* de las hojas de café y del suelo circundante a la planta de café del sector Miraflores lanza fueron con una media de desarrollo micelial de 2,5315 y una desviación estándar de 1,52593, indicándonos la poca dispersión de datos respecto a la media, dando así una descripción pareja en el desarrollo micelial en las especies estudiadas. Podemos indicar que el desarrollo de cada uno de los hongos nativos aislados tanto del suelo como de las hojas de café del sector Miraflores lanza, en donde se puede observar que el género *Trichoderma spp.*, presenta un buen desarrollo a los 10 días de experimento en donde alcanzo un diámetro de crecimiento de 5.12 cm con una correlación de  $r = 0.98$  seguidamente el hongo *Lecanicillium spp.*, también presento un buen desarrollo así al décimo día de experimento alcanzando un diámetro de crecimiento de 4.66 cm con una correlación de  $r = 99$  y finalmente la especie *H. vastatrix* que también presento un crecimiento alcanzando así un diámetro de 4.44 cm con una correlación de  $r = 0.99$ , de todo ello podemos indicar que el hongo *Trichoderma* y *Lecanicillium spp* presentaron un buen desarrollo frente a *Hemileia vastatrix* (Figura 16).



**Figura 16.** Diámetros de crecimiento in vitro de cepas de hongos nativos aislados de hojas de café (*Hemileia* y *Lecanicillium*) y de suelo circundante (*Trichoderma*) en campos de cultivo de café del sector Miraflores Lanza, laboratorio de Microbiología en la FCCBB-UNA PUNO, julio 2018

Cada uno de los hongos presentó un buen crecimiento los cuales fueron incubados a una temperatura de 28 °C, pero sin embargo el hongo *Trichoderma spp.*, presentó un buen desarrollo desde el primer día, así también podemos indicar que nuestros resultados tiene semejanza con los resultados obtenidos por Michel, (2001), en donde las especies de *T. harzianum* y *T. koningii* presentaron las mayores tasas de crecimiento con 34,83 y 43,67 mm/día respectivamente con esporulaciones abundantes cada una de ellas.

El hongo *Trichoderma spp.*, desde el segundo día presento un buen desarrollo a comparación de otros hongos por lo cual podemos indicar que este género de hongo presenta un crecimiento acelerado tal resultado es semejante por Hoyos *et al.*, (2008), en donde indica que las especies de *Trichoderma* son de crecimiento rápido y en pocas horas pueden cubrir la superficie de la caja de Petri. Así mismo Astorga *et al.*, (2014), Indica que el hongo *Trichoderma sp* al cabo de 72 horas a una temperatura de 28°C observo un crecimiento activo que al transcurso de una semana llego a cubrir por completo la placa Petri.

De igual manera Chávez (2006), reporto que las colonias del hongo *Trichoderma sp*, presentaron un crecimiento rápido solo en lapso de cinco a seis días a una temperatura a 25°C y menciona que el hongo *Trichoderma sp.*, presento una coloración amarilla – verdoso con un revés amarillo.

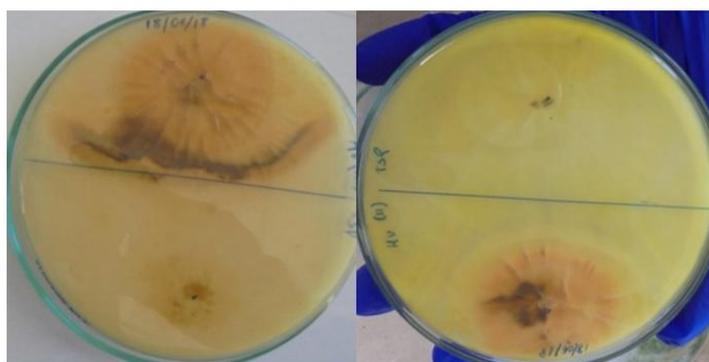
Así también Montalva, (2008) reporto que el hongo *Lecanicillium lecanii* en cultivos *in vitro* con PDA a los 33 días de incubación, todas las colonias evaluadas alcanzaron el borde de la placa Petri con un 90 mm de diámetro de crecimiento lo cual indica que el crecimiento de esta especie es lento a comparación de otros hongos.

## 4.2 Evaluación de la capacidad antagónica de los hongos *Trichoderma spp.* Y *Lecanicillium spp* sobre el hongo de la roya amarilla *Hemileia vastatrix* en cultivos *in vitro*.

### 1. Evaluación de la competencia por nutrientes y espacio.

#### 1.1. Diámetro de crecimiento de los antagonistas del género *Trichoderma spp.*, y *Lecanicillium spp.*, frente a *Hemileia vastatrix* (DCA) pertenecientes al sector Miraflores Lanza

Se llegó a evaluar los tratamientos T1 y T2 los diámetro de crecimiento de los hongos antagonistas del género *Trichoderma spp.*, y *lecanicillium spp* frente a *Hemileia vastatrix* en cultivos duales en donde se muestra la confrontación por espacio y nutrientes de un color verde amarillo y el hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix* que presenta un color anaranjado, incluso se pude observar allí un margen de detención y competencia de un hongo contra el otro lo cual vendría a ser la prueba de que existe antagonismo entre ambas especies, (Figura 17).



**Figura 17.** Enfrentamiento dual de los hongos antagonistas *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.*, frente al hongo patógeno *Hemileia vastatrix*. en el laboratorio de

Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológica de la Universidad Nacional del  
Altiplano Puno, junio 2018.

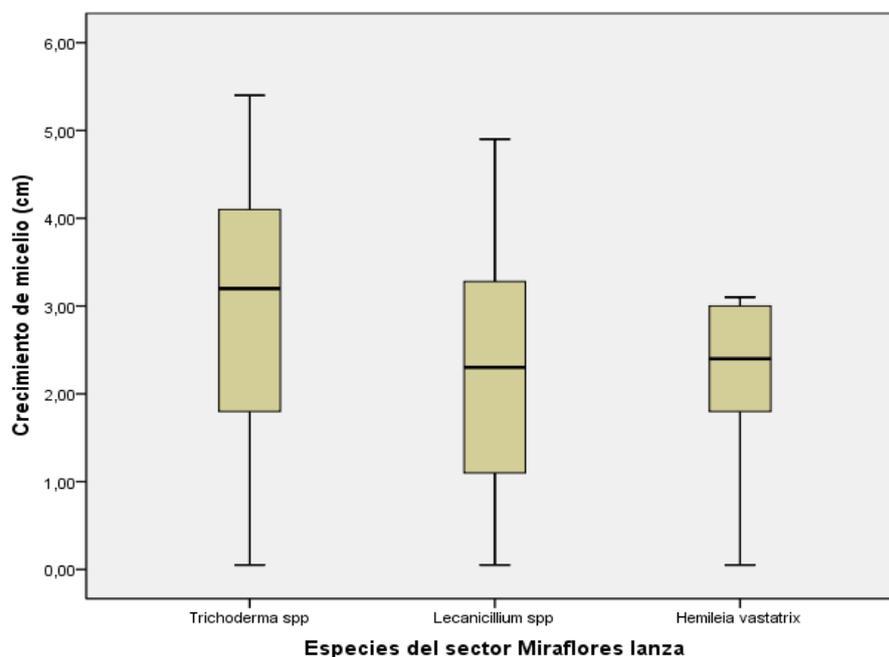
Podemos observar claramente que los hongos *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.*, de la provincia de Sandia son muy buenos antagonistas frente a los hongos fitopatógenos *Hemileia vastatrix* presentando un diámetro de crecimiento máximo en las dos repeticiones significativo de 5.8 cm y 4.85 cm así mismo el otro hongo presento un diámetro de crecimiento significativo de 5.2 cm y con una correlación de  $r = 0.93$  lo cual indica que este género de hongo actuó de una forma positiva frente al hongo fitopatógeno *H. vastatrix* (Figura 18).

**Tabla 5.** Media de desarrollo para el antagonismo de *Trichoderma spp* y *Lecanicillium spp* sobre el hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix* de sector  
Miraflores Lanza

Especies en el sector Miraflores Lanza	Media de desarrollo micelial
<i>Trichoderma spp</i>	2,9679
<i>Lecanicillium spp</i>	2,3127
<i>Hemileia vastatrix</i>	2,2476

Fc = 4.029, gl = 2, Sig. 0.020

Según nuestros análisis estadísticos podemos indicar que  $F = 4.029$  con  $P=0.020 < a$  0.05, nos señala que hay suficiente evidencia para afirmar diferencias entre las medias de desarrollo para la actividad antagónica de *Trichoderma spp* y *Lecanicillium spp* sobre el hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix* en el sector Miraflores Lanza.



**Figura 18.** Actividad antagónica *in vitro* de los hongos *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.*, frente al hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix*, laboratorio de Microbiología de la FCCBB-UNA PUNO, julio 2018.

Los resultados obtenidos en esta evaluación del género *Trichoderma spp* son similares a los obtenidos por Vargas, (2014) quien obtuvo un radio de crecimiento de 4. 15 cm en el hongo *Trichoderma koningiopsis* frente al hongo *Fusarium oxysporum*. Por otro lado, otros autores indican al respecto, (Michel, 2001) indica que entre menor sean los días al contacto, es mayor la agresividad que existe por parte del hongo antagónico y menor la resistencia del fitopatógeno, (Hernández, 2005) reporta contacto desde el segundo día después de la siembra, entre *Trichoderma spp.* y *S. rolfsii*; Por su parte Michel, (2001), encontró valores al primer contacto entre cepas nativas de *Trichoderma spp.* y *F. oxysporum* de 3 a 6 días y con *F.*

*subglutinans* de 3 a 10; mientras que Solano (2004) de 3 a 4 días con *F. oxysporum* y de 2 a 3 con *F. subglutinans*.

De la misma forma Vélez & Rosillo, (1995) indica que *V. lecanii* es capaz de penetrar las uredinosporas de la roya del frijol en se observa que la hifa entra a través de los poros germinales de las uredinosporas o forma estructuras similares a apresorios que le permite penetrar la pared celular, además indica que se han detectado niveles de actividad enzimática de lipasas, proteasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinanasas en cultivos de esta especie filtrados. Mencionan que dichas enzimas facilitan la degradación de la pared celular de las uredinosporas, la cual está compuesta principalmente por B- glucanos y quitina. Es este el mecanismo de acción para lograr la reducción de la infección por roya en condiciones de invernadero y campo.

## **1.2. Diámetro de crecimiento de los antagonistas *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.* Frente a *Hemileia vastatrix* (DCA) pertenecientes al sector Uycusmayo**

Se llegó a evaluar la prueba de antagonismo de los tratamientos T3 y T4 de los hongos *Trichoderma spp* y *Lecanicillium sp* frente a *H. vastatrix* en donde al séptimo día ya se observó la confrontación con el hongo fitopatógeno así llegando al décimo día con la invasión en donde en el reverso de la placa se puede observar un margen de detención y competencia de un hongo contra el otro lo cual vendría a ser la prueba de que existe antagonismo entre ambas especies y la coloración negruzca lo cual se debe a la liberación de enzimas de estas especies. (Figura 19).



**Figura 19.** Enfrentamiento dual de los hongos antagonistas *Trichoderma spp.*, y *Lecanicillium spp.*, frente al hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix*. Pruebas realizadas en el laboratorio de Microbiología de la FCCBB-UNA PUNO, julio 2018.

De acuerdo a nuestros resultados de antagonismo podemos indicar que el hongo *Trichoderma* resulto ser un hongo con capacidad antagonica, y Según Rolz *et al*, (2013), en su estudio también encontraron un posible antagonismo de cepas de *Trichoderma* sobre *Hemileia vastatrix* como resultado de una invasión del micelio de *Trichoderma* sobre el patógeno en la lesión de la hoja. Así también indican que el ataque de *Trichoderma* sobre *H. vastatrix* en las hojas de un árbol en el cafetal puede ser diferente al parasitismo clásico.

Así mismo en la confrontación del hongo *Lecanicillium* frente al hongo *Hemileia vastatrix* en cultivos duales donde se observó la presencia una coloración café negruzco y naranja pálido lo cual indica que esa coloración se debe a la acción de enzimas producidas por este hongo, Askary *et al.*, (1997) señala que cuando una vez que las esporas de *Lecanicillium* entra en contacto con el patógeno se da una liberación de enzimas, como la  $\beta$ -1,3-glucanasa, quitinasa, amilasas y proteasas, las cuales causan alteraciones en las paredes celulares del hospedero, así permitiendo que las hifas de penetración de *L. lecanii* ingresan y

el indica que posteriormente se observa una desorganización del citoplasma en las células del patógeno, esto debido a la pérdida de turgencia de las células y contorción de la pared celular y por lo último las células atacadas colapsan, así reduciendo su protoplasma debido a la extensa multiplicación del antagonista y al estar totalmente rodeado por este hongo y luego se da la liberación de las esporas de *Lecanicillium* de las células muertas del hospedero.

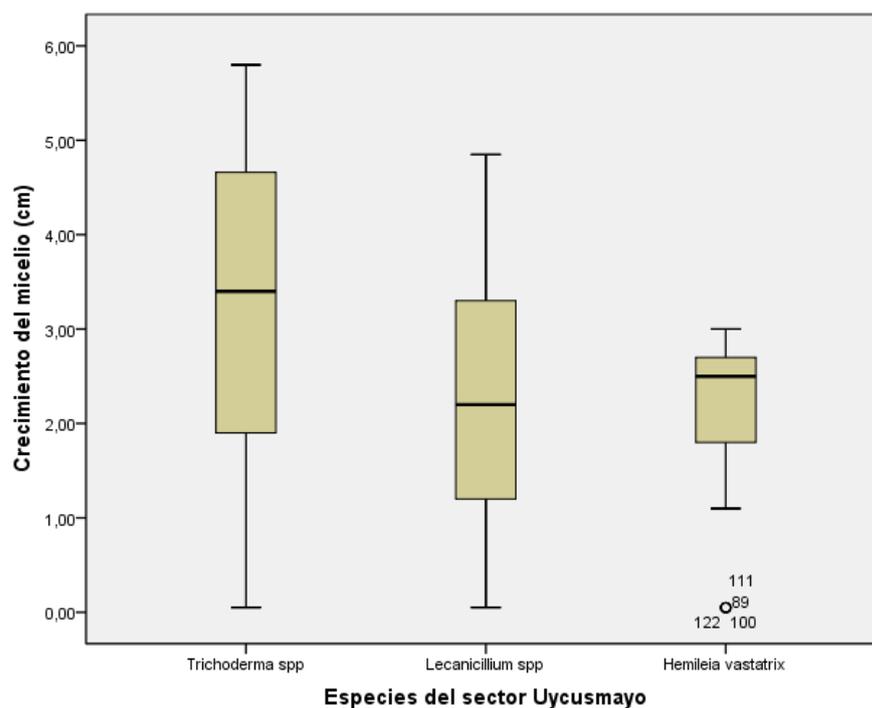
**Tabla 6.** Media de desarrollo para el antagonismo de *Trichoderma* spp y *Lecanicillium* spp sobre el hongo fitopatogeno *Hemileia vastatrix* de sector Uycusmayo

Especies en el sector	Media de desarrollo micelial
Uycusmayo	
<i>Trichoderma</i> spp	3,1955
<i>Lecanicillium</i> spp	2,2955
<i>Hemileia vastatrix</i>	2,1652

Fc = 7.672, gl = 2, Sig. 0.001

Según nuestros análisis estadísticos podemos indicar que  $F = 7.672$  con  $P = 0.001 < a 0.05$ , nos señala que hay suficiente evidencia para afirmar diferencias entre las medias de desarrollo para el antagonismo de *Trichoderma* spp y *Lecanicillium* spp sobre el hongo fitopatogeno *Hemileia vastatrix* en el sector Uycusmayo.

Al observar claramente que los hongos *Trichoderma* spp y *Lecanicillium* spp., tuvieron un buen crecimiento de antagonismo frente a hongo fitopatogeno *Hemileia vastatrix* en las 2 repeticiones que se realizaron teniendo así un diámetro mayor de crecimiento de 5.4 cm y 4.9 cm al décimo día (Figura 20).



**Figura 20.** Actividad antagónica *in vitro* de los hongos *Trichoderma spp.*, y *Lecanicillium spp.* Frente al hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix*, Laboratorio de Microbiología de la FCCBB-UNA PUNO, julio 2018.

De nuestros resultados podemos indicar que asemejan a los resultados obtenidos por Jiménez *et al.*, (2015) en donde reportan que en su investigación sobre Evaluación *in vitro* de la capacidad parasítica de dos cepas de *Lecanicillium lecanii* Sobre *Hemileia vastatrix* observaron que las dos cepas de *Lecanicillium lecanii* que evaluaron inhibieron la germinación del hongo *Hemileia vastatrix* así mismo indican que los hongos *L. lecanii* presentaron diferentes capacidades inhibitorias según su origen geográfico.

Así mismo según Hoyos *et al.*, (2008) también confirma que los hongos del género *Trichoderma* presentan una capacidad antagónica, en donde los resultados que obtuvo según

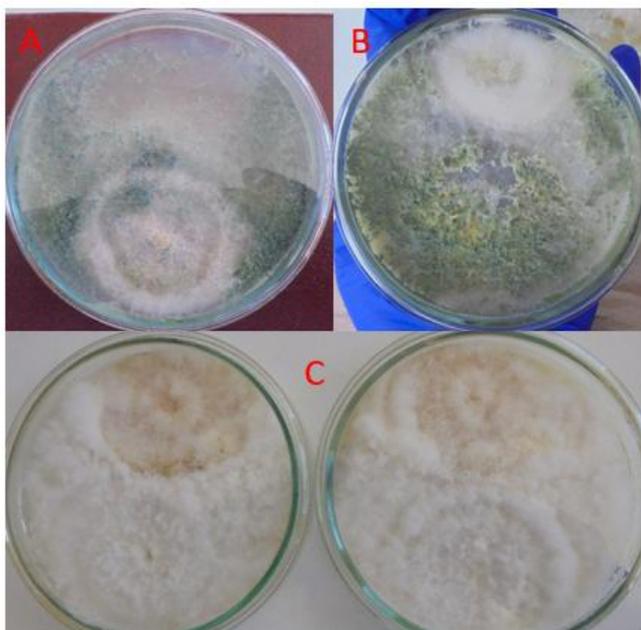
sus análisis de Box and Wister plots, de los aislamientos de *T. asperellum* T51 y *T. harzianum* T53 resultaron tener antagonismo *in vitro* sobre los cinco de los seis aislamientos de fitopatógenos evaluados que realizó y estos aislamientos antagónicos que obtuvo según menciona que pertenecían a especies diferentes y así mismo procedían de hábitats muy diferentes del que fueron tomados los hongos fitopatógenos. También afirma que la mayoría de hongos con actividad antagónica específica sobre los diferentes fitopatógenos correspondieron a los aislamientos de *T. asperellum*, especie que constituyó el 49% de aislamientos probados, así como también *T. harzianum*, que constituyó el 31,5%.

Este resultado obtenido en cuanto al desarrollo del hongo *Trichoderma spp* es semejante a lo que obtuvo Arbito, (2017) en donde él observó que el hongo *Trichoderma* presentó un crecimiento rápido y al quinto y sexto día ya observó la confrontación con *Fusarium* y al décimo día observó que el hongo *Trichoderma* ya se sobreponía sobre el hongo *Fusarium* mostrando una coloración tomate negruzca por acción de los metabolitos de *Trichoderma*.

Además, otros autores mencionan que en estudios *in vitro* realizados en *Lecanicillium* indican que este hongo produce en grandes cantidades de proteasas y quitinasas en medios de cultivo líquido y así mismo que la digestión del integumento sigue una secuencia de las enzimas lipasa-proteasa y quitinasa (Tanada & Kaya, 1993).

#### 4.2.1. Micoparasitismo de *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.* Pertenecientes a los dos sectores Miraflores Lanza y Uycusmayo.

Para dar a conocer el micoparasitismo (MICMO) con un posible mecanismo de acción de los géneros de *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.* se realizaron las observaciones macroscópicas en las placas Petri de los enfrentamientos duales el cual indica que hubo una invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno y se observó esporulación sobre ella, donde se puede observar claramente la invasión de los hongos antagonistas *Trichoderma* y *Lecanicillium* frente al hongo patógeno *Hemileia vastatrix* (Figura 21).



**Figura 21.** Micoparasitismo de los hongos antagonistas sobre el hongo patógeno A. *Trichoderma spp.* frente a *Hemileia vastatrix*, B. *Trichoderma spp.* frente a *Hemileia vastatrix* y C. hongos *Lecanicillium spp.* frente a *Hemileia vastatrix*. Laboratorio de Microbiología FCCBB- UNA PUNO, julio 2018.

Podemos indicar, tomándose como índice el micoparasitismo en donde se observó la invasión de los antagonistas sobre las superficies del micelio del patógeno, teniendo en cuenta la escala de la (Tabla 1) creada por Elías y Arcos (1984) citado por Ezziyyani, así también la escala de micoparasitismo según Royse y Ries (1978). Es así como fue que se evaluó la capacidad antagónica de *Trichoderma spp* y *Lecanicillium spp* sobre el hongo patógeno *Hemileia vastatrix* aislados de los dos sectores pertenecientes a la provincia de Sandia, donde el promedio de grado fue de 4 y el tiempo de cobertura promedio fue de 6 a 10 días. (Tabla 6)

**Tabla 7.** Tiempo de cobertura de los antagonistas sobre el patógeno *Hemileia vastatrix* y el grado de micoparasitismo según Elías y Arcos, (1984) citado por Ezziyyani, (2004).

ANTAGONISTA / PATOGENO	GRADO DE MICOPARASITISMO	TIEMPO DE COBERTURA / DIAS
<i>Trichoderma spp</i> / <i>Hemileia vastatrix</i> (Uycusmayo)	4	6 a 8 días
<i>Lecanicillium spp</i> / <i>Hemileia vastatrix</i> (Uycusmayo)	4	8 a 10 días

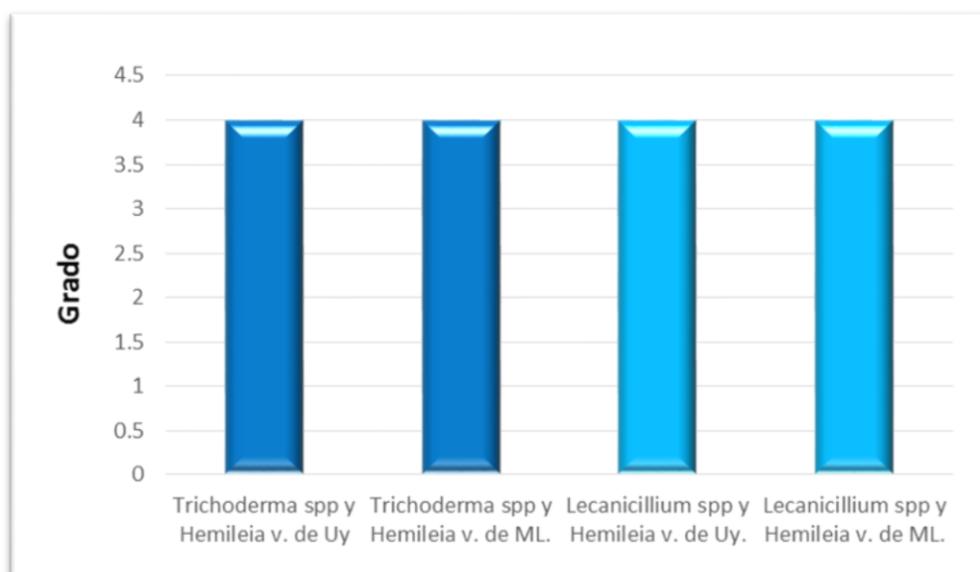
---

<i>Trichoderma spp</i> /		
<i>Hemileia vastatrix</i> (Miraflores L.)	4	5 a 8 días
<i>Lecanicillium spp</i> /		
<i>Hemileia vastatrix</i> (Miraflores L.)	4	7 a 9 días

---

Semejante resultado de micoparasitismo se tiene para el hongo *Trichoderma spp.*, en donde Vargas (2014), reporto que los hongos *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma koningiopsis* sobre hongos fitopatógenos que investigo, en donde observo que los hongos antagonistas presentaron un grado de 4 de micoparasitismo en un tiempo de cobertura promedio que fue de 4 a 6 días que evaluó.

Se muestra el grado de micoparasitismo de los hongos *Trichoderma spp.*, y *Lecanicillium spp.*, sobre el hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix* en donde los patógenos presentaron una actividad antagonico de micoparasitismo de grado 4 según el tiempo de cobertura (Figura 22).



**Figura 22.** Grado de micoparasitismo (MICMO) correspondiente de la interacción del patógeno frente a los antagonistas, al 10 día después de la siembra.

Las investigaciones de algunos cultivos apareados entre *Trichoderma spp.*, y otros fitopatógenos muestran diferencias en los grados de antagonismo (Vargas, 2014).

En el presente estudio, los resultados en los cultivos apareados indicarían que hifas de *Trichoderma spp* y *Lecanicillium spp.*, hicieron contacto a diferentes tiempos con las hifas de *Hemileia vastatrix*, entre mayor fueron los días al contacto, también se observó mayor agresividad por parte del hongo antagónico y menor resistencia del hongo fitopatógeno. Según Chet, (1994) citado por Vargas (2014), menciona que el micoparasitismo puede ser un proceso complejo que involucran eventos secuenciales como el crecimiento quimiotrópico, en el cual dirigen su crecimiento hacia un estímulo químico lo cual hay sucedido en el hongo *Trichoderma* el cual haya detectado a su hospedante desde una determinada distancia y al parecer podrían crecer de acuerdo a una gradiente química, el

reconocimiento de los antagonistas pudo haber sido físico, como el tigmotropismo o químico como el quimiotropismo.

Rolz *et al.*, (2013) también en su investigación obtuvieron resultados parecidos a lo nuestro en donde observaron que el hongo *T. hamatum* presento un crecimiento claramente masivo, con una invasión de tejido micelial en la zona infectada de la hoja y una esporulación directamente sobre el hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix*. Y por el contrario las cepas de *T. harzianum* mostro poco crecimiento micelial en la zona infectada pero sí presento una esporulación sobre *H. vastatrix*. En donde concluyen que de sus observaciones efectuadas el mecanismo de antagonismo podría ser diferente entre *Trichoderma hamatum* y *Trichoderma harzianum*.

Según la escala de grado de micoparasitismo de tabla 2 podemos indicar que los hongos *Trichoderma spp* y *Lecanicillium spp* presentaron un grado de 2 y 3 así mostrando un porcentaje de antagonismo de 75 y 50% de acuerdo a la escala presentada por Royse y Ries (1978) lo cual indica ser buenos antagonistas frente al hongo *H. vastatrix*.

En nuestra investigación se probaron los hongos *Trichoderma spp* y *Lecanicillium spp* mediante los ensayos *in vitro* en donde se observó que presentaron el grado de micoparasitismo no muy variables en ambos sectores (figura 22), el cual se calificó con las dos escalas diseñadas por los dos autores, para tal efecto en los cuales se observó que el diámetro de crecimiento del fitopatógeno no afecta la actividad micoparasitica de los hongos *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.*, es decir, una invasión temprana del medio de crecimiento por parte del fitopatógeno no impide o compite por crecimiento con los hongos antagonistas, por el contrario, este crecimiento temprano del hongo fitopatógeno puede ser rápidamente colonizado y parasitado por los hongos *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.*

ya que el hongo antagónico *Trichoderma* tiene un crecimiento rápido tal como lo menciona Hoyos & Duque, (2008), así mismo indican que si un aislamiento sea de crecimiento lento no lo excluye de que sea un buen antagonista ya que según Cundom *et al.* (2002), indica que dicha característica de los hongos o la tasa de crecimiento, no es obstáculo para que en tales hongos puedan encontrarse aislamientos de buen potencial antagónico.

Por tanto, las pruebas en laboratorio para determinar la capacidad antagónica de un microorganismo con respecto a otro no representan necesariamente el grado de antagonismo y de control biológico en condiciones naturales, pero reflejan la capacidad y la variabilidad genética del antagonista y la del fitopatógeno de invadir o crecer en una caja de Petri o en condiciones intralaboratoriales.

Es de anotar que dichas pruebas y la escala planteada permiten básicamente cuantificar competencia por nutrientes en el medio controlado, mas no cuantificar como tal el micoparasitismo o antagonismo; porque en tal caso se podría afirmar que si un aislamiento fitopatógeno tiene una tasa de crecimiento más rápida que el aislamiento del hongo antagónico, entonces éste sería antagonista evaluado como grado 3, 4 y 5 en la escala de (Royse & Ries, 1978).

## V. CONCLUSIONES

- De las hojas de café y de los suelos circundantes a la planta de café de los sectores de Miraflores Lanza perteneciente al distrito de San Pedro de Putina Punco y del sector Uycusmayo perteneciente al distrito de San Juan Del Oro de la Provincia de Sandia región Puno, se lograron aislar e identificar a los hongos *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.* con capacidades antagónicas y al hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix*.
- Los hongos *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.* aislados de los dos sectores de la Provincia de Sandia si presentaron una actividad antagónica en cultivos *in vitro* frente al hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix* en donde se llegó a observar una competencia por espacio y nutriente así presentando los hongos antagónicos un diámetro de crecimiento entre 5.8 cm y 4.9 cm así existiendo diferencia significativa entre los hongos antagonistas y el patógeno, también presentaron el grado 4 de micoparasitismo según el tiempo de cobertura y alcanzaron en un 75% en el cubrimiento del micelio al fitopatógeno así mostrando una buena actividad antagónica.

## VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar las observaciones microscópicas con el microscopio electrónico de barrido todos los enfrentamientos duales entre el hongo patógeno y el hongo antagonista para ver la interacción entre ambos hongos.
- Se recomienda determinar las condiciones del ambiente ya sea la temperatura, el pH del suelo, la humedad relativa entre otros, de cada lugar.
- Al tener los resultados favorables en las pruebas *in vitro* se recomienda realizar las pruebas de control biológico empleando los hongos *Trichoderma spp.* y *Lecanicillium spp.*, como controladores del hongo de la roya amarilla del café (*Hemileia vastatrix*) en “in situ” ya sean a nivel invernadero o en plantas jóvenes.

## VII. REFERENCIAS

- Acosta, J. (2006). Evaluación de hongos entomopatógenos como controladores biológicos de *scutigerella immaculata*. Tesis, Pag.34-79.
- Alavo, J. (2015). THE INSECT PATHOGENIC FUNGUS *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas AND ITS USE FOR PESTS CONTROL. *Rev. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* , 337-345.
- Alexopoulos, C., Mims, C., & Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology* (Cuarta Edicion ed.). California.
- Alfaro, F. (2013). “Aislamiento y cuantificación de bacterias epífitas del filoplano de banano (Musa AAA cv. Grande Naine) y seleccion de cepas quitinolíticas y glucanolíticas como potenciales antagonistas de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra. *Rev. Corporación Bananera Nacional, S.A.*, pp.16-89.
- Almaraz, A., Alvarado, D., Tlapal, B., & Espinoza, D. (2012). Identificación de hongos anatógenos a *Phytophthora cinnamomi* Rands en bosques de encino de el Arrayanal, Colima y Tecoanapa Guerrero. *Rev. Chapingo serie Ciencias Forestales y del Ambiente.*, 341-354.
- Arauz, L. (1998). *Fitopatología*. San Jose, Costa Rica: De la universidad de Costa Rica.
- Arbitto, M. (2017). Evaluacion in vitro de la capacidad antagonista de *Trichoderma spp.* frente a *Fusarium spp.* Tesis, pag. 1-76.
- Arias, E., & Piñeros, A. (2008). Aislamiento e identificación de los hongos filamentosos de muestras de suelos de paramos de Guasca y Cruz Verde. Tesis, pag. 1-204.

- Askary, H., Benhamou, N., & Brodeur, J. (1997). Ultraestructural an cytochemical investigations of the antagonistic effet of *Verticillium lecanii* on cumber powdery mildew. *Rev. Phytophatology*, 359-368 pp.
- Astorga, K., Meneses, K., Zuñiga, C., & Brenes, J. (2014). Evaluación del Antagonismo de *Trichoderma sp.* y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. *Rev. Tecnologia en Marcha*, Vol. 27(N° 02), pp. 82-91.
- Barnett, L., & Binder, L. (1973). The fungal host-parasite relationship. *Annual Review of Phytopathology*, 273-292pp.
- Barquero, M. (2013). Recomendaciones para el combate de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk et. Br.). *Icafe*, 63p.
- Cabrera, R., & Tejera , R. (2002). Evaluacion de diferentes dosis de fertilizacion en la produccion de plantines de *Eucalyptus grandis* w. Hill ex Maiden creciendo en sustrato colonizado por *Trichoderma harzianum*. . *Tesis Ing. Agr.*, 156 p.
- Cabrera, R., Hernández, D., Lopez, A., González , C., & Dominguez, D. (2012). Caracterización e importancia del complejo de hongos que regulan las poblaciones de *Toumeyella cubensis* (Hemiptera: Lecanidae) en cítricos. . *Rev. Fitosanidad*, 23-29p.
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. *Rev. Centro Internacional de la Papa (CIP)*, Pag. 38-62.
- Castro, A., & Rivillas, C. (2006). Antagonismo "in vitro" de *Trichoderma harzianum* sobre hongos patogenos de café. *Rev. Cenicafé, ORIUS BIOTECNOLOGIA*.

- Castro, R., Charles, H., & Barreto, R. (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.
- Chavez, M. (2006). Produccion de trichoderma sp. y evaluacion de su efecto en cultivo de crisantemo (*Dendrathera grandiflora*). Tesis, pp.1-113.
- Cortez, H., & Ortiz, C. (2003). Caracterización cultural de cepas de *Lecanicillium* (*Verticillium*) *Lecanii* (Zimm.) Zare y Gams y su patogenicidad sobre *Toxoptera aurantii* Boyer. *Rev. Mexicana de FITOPATOLOGIA*, pp. 161-167.
- Coundom, M., Mazza de Gaiad, S., Mazzati de Castañon, M., Gutierrez de Ariola, S., & Countinho, M. (2002). Actividad antagónica in vitro de Hongos saprófitos sobre *Sclerotinia sclerotiorum*.
- Donati, S. (2011). Efecto de *Trichoderma harzinum* cepa L1 sobre la calidad de plantines en *Pinus taeda*. Tesis Ing. Agr., 144 p.
- Eskes, A., Mendes, M., & Robbs, C. (1991). Laboratory and field studies on parasitism of *Hemileia vastatrix* with *Verticillium lecanii* and *V. leptobactrum* Café Cacao. *Thé* 35, 275-282.
- Ezziyyani, M., Pérez, C., Ahmed, A., & Requena, M. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum L.*) . *Rev. Anales de Biología*, 35-45.
- Feijóo, J. (2014). Los fungicidas sistemicas en la prevencion y control de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* BERK Y BR.) En el cantón Piñas, Provincia de el oro. Tesis, Pag.5-57.

- García, C., Mamani, M., Chávez, G., & Álvarez, M. (2016). Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible BIOCONTROLADOR. *Rev. Journal of the Selva Andina Research Society*, Vol. 7, pp.20-32.
- González, E., & Suris, M. (2007). Selección in vitro de aislamientos promisorios de *Lecanicillium lecanii* (ZARE Y GAMS) para la lucha biológica de *Hemileia vastatrix* (BERK. ET. BR). *Rev. Protección veg.*, Vol. 22, pp 128-130.
- Hernández, N. M. (2005). Control biológico de *Esclerotium rolfii* Sacc. en cultivo de Cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) con *Trichoderma* spp. *Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Guerrero*, 107 pp. .
- Hernández, N., Bautista, S., Velázquez, M., & Hernández, A. (2007). Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. *Rev. Mexicana de Fitopatología*, 66-74.
- Hoyos, L., & Duque, G. (2008). Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. sobre aislamiento de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. *Rev. Colombiana de Ciencias Hortícolas*, vol. 2(No 01), pp76-86.
- Inbar, J., & Chet, I. (1995). The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 141. 2823-2823p.
- 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*, pp. 389-401.

- Jara, J. (2015). Mejoramiento de la competitividad productiva, organizacional y comercial de los productores de café del distrito de San Juan Del Oro-Sandia-Puno. *Manual técnico de diversificación productiva*, 73-75.
- Jiménez, I., Sánchez, F., Catellanos, J., & Morales, L. (2015). Evaluación *in vitro* de la capacidad parasítica de dos cepas de *Lecanicillium lecanii* Sobre *Hemileia vastatrix*, agente causal de la roya del café.
- Larrea, O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Rev. Manejo Integrado de Plagas*. (N°62), pp96-100.
- Lopez, L., Hernandez, M., & Colin, C. (2013). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad*, Pag.10-18.
- 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 and ecosystem ecology*, 658-667.
- Marca, J. V. (2017). Manual Técnico del cultivo de cafés especiales. Puno, Perú.
- Martínez, P., Fernández, R., Sanz, A., Miravalles, A., & Diez, J. (2013). Antagonismo *in vitro* de hongos endófitos frente a *Fusarium circinatum*. *Rev. 6° Congreso Forestal Español*, 2-10.
- Michel, A. (2001). Cepas nativas de *Trichoderma spp.* (Euscomycetes hypocreales), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hyphomycetes:Hyphales). *Tesis*, pp.22-50.

- Molina, G., Zaldúa, S., Gonzáles, G., & Sanfuentes, E. (2006). Selección de los hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. *Rev. BOSQUE*, 27(2), 126-134.
- Montalva, C. (2008). Evaluación de virulencia de dos cepas de *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare y Gams para el control biológico de *Cinara cupressi* (Buckton). *Tesis*, pp.1-22.
- Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatgenos en Nicaragua. *Rev. Manejo Integrado de Plagas*, p 95-103.
- Mora, G. (2016). Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome). ficha técnica N° 40. *Servicio nacional de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria. Dirección General de Sanidad Vegetal*.(40), 23p.
- OIRSA. (2013). Guía de campo para la identificación de síntomas de la Roya del Café (*Hemileia vastatrix*). Recuperado el 18 de Octubre de 2018, de en: [http://www.oirsa.org/portal/documents/Documentos-Roya/Ficha-para-identificacionsintomas-Roya-Cafe-OIRSA-vr.1-\(julio%202013\).pdf](http://www.oirsa.org/portal/documents/Documentos-Roya/Ficha-para-identificacionsintomas-Roya-Cafe-OIRSA-vr.1-(julio%202013).pdf)
- Peréz, N. (2004). *Manejo ecologico de plagas*. La Habana, Cuba: Graficas del MINREX.
- Pico R., 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. *Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE)*., 1-79.
- Poalacin, J. M. (2015). Estudio del adecuado crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma Hamatum* en sustrato sólido. *Tesis Pregrado*.

- Rivillas, C., Serna, C., & Cristancho, M. (2011). Roya del cafeto en Colombia. *Rev. Cenicafé*, Pag-8-53.
- Robles, A. (2014). Uso de microorganismos antagonistas y sustancias naturales como una alternativa ecológica en el control de enfermedades en cultivos. *Rev. centro de biotecnología*, pag. 34-43.
- Rodríguez, M., & Veneros, R. (2011). Control biológico de *Trichoderma harzianum* RIFAI sobre hongos patógenos de frutos postcosecha de *Carica papaya* procedente de Zonas de distribución del distrito de Trujillo (Perú). *Rev. REBIOL*, 2(31).
- Rolz, C., De Leon, L., & Paniagua, O. (2013). Evidencia de un antagonismo *in vitro* de especies de *Trichoderma* contra *Hemileia vastatrix* (Roya del café). *Rev. 25 de la Univesidad del Valle de Guatemala*, 61-65.
- Romero, G., Olivera, V., & Rodriguez, D. (2015). *Trichoderma harzianum* Como agente de Control Biológico. 1-65.
- Royse, D. J., & Ries, S. M. (1978). The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Rev. Ecology and Epidemiology*, Vol.68, Pag. 603-607.
- Sandoval, I., & López, M. (2002). Antagoismo de *Trichoderma harzianum* hacia *Macrophomina phaseoli* y otros patogenos fúngicos del frijol. *Rev. Fitosanidad*, 69-79.
- Solano, P. (2004). Control biológico de la escoba de bruja del mango con *Trichoderma spp.* *Tesis de licenciatura*, , 82 p.

- Tanada, Y., & Kaya, H. (1993). *Insect Patology*. San Diego, California Estado: Academic press.
- Vargas, D. (2017). Efecto de la aplicación de *Lecanicillium lecanii* sobre la incidencia y severidad de la roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo de cafe (*Coffea arabica*). Tesis , Pag. 17-44.
- Vargas, R. (2014). Antagonismo de *Trichoderma koningiopsis* y *Trichoderma harzianum* Sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. cepae Y *Phoma terrestris in vitro*. Tesis, pp. 14-118.
- Vélez, P., & Rosillo, A. (1995). Evaluacion del antagonismo del hongo *Verticillium lecanii*, Sobre *Hemileia vastatrix*, en condiciones de invernadero y de campo. *Rev. Cenicafé*, 1(46), 45-55.

## ANEXOS

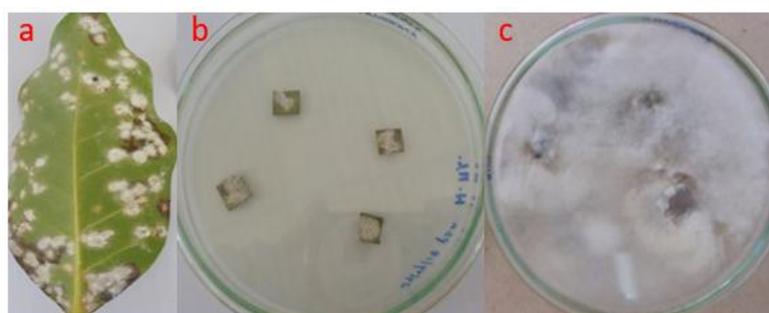
## ANEXO A



**Figura 23.** Terrenos de Cafetales A) cafetal del sector Miraflores Lanza del Distrito de San Pedro de Putina Punco B) cafetal del sector Uycusmayo del Distrito San Juan del Oro. Sandia, abril 2018.



**Figura 24.** Procedimiento para el aislamiento del hongo *Trichoderma spp.*, Puno, abril 2018.



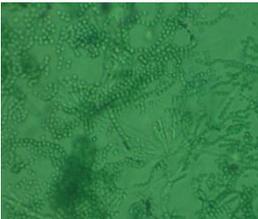
**Figura 25.** Procedimiento para el aislamiento del hongo *Lecanicillium spp.*, Puno, abril 2018.



**Figura 26.** Aislamiento del hongo patógeno *Hemileia vastratix*. Puno, mayo 2018.



**Figura 27.** Identificación de los hongos desarrollados, observación microscópica en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno, en junio 2018.

Nombre del hongo	Identificación Microscópica
<i>Penicillium spp</i>	

*Fusarium spp*



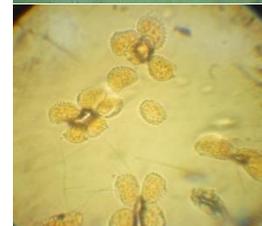
*Trichoderma spp.*



*Lecanicillium spp.*



*Hemileia vastatrix* (Berk y Br.)



**Figura 28.** Variedad de hongos identificados que fueron aislados de las muestras de los dos sectores de la provincia de Sandia. En la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano, Puno en abril a Julio del año 2018.



**Figura 29.** Hojas de café infectados con hongos A) hojas de café infestados con el hongo *Lecanicillium spp* los cuales fueron seleccionados para realizar las tomas de muestras, B) hojas de café infectados con los hongos de la roya amarilla *Hemileia vastatrix* los cuales también fueron seleccionados para aislar estos hongos para nuestro experimento. En la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno abril 2018.

CONSTANCIA N°; N°011.

LA QUE SUSCRIBE: COORDINADORA DEL PROGRAMA DE MICROBIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO:

Hace constar que el señorita Fanny SUCATICONA VILCA ha realizado su trabajo de investigación denominado “ ACTIVIDAD ANTAGONICA IN VITRO DE LOS HONGOS *Trichoderma spp* y *Lecanicillium spp*. Frente a la roya amarilla del café (*Hemileia vastatrix* ) en condiciones de Laboratorio “ realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas ,según solicitud y autorización de fecha : 29 Junio 2018 de acuerdo al informe del señor Técnico de laboratorio Leonidas Teves Alejo (bajo su responsabilidad) . Se emite la presente, para fines de trámite documentario solicitado por la Coordinación de investigación de la FCCBB.

C.U Diciembre del 2018.

