

EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., A FUNGICIDAS DEL GRUPO DE LOS TRIAZOLES

Yomara Ivonne Rozo-Peña*, Marco Aurelio Cristancho-Ardila*

RESUMEN

ROZO P., Y.I.; CRISTANCHO A., M.A. Evaluación de la susceptibilidad de *Hemileia vastatrix* berk. & Br., a fungicidas del grupo de los triazoles. *Cenicafé*, 61(4):297-314. 2010

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la sensibilidad de dos aislamientos colombianos de *Hemileia vastatrix* a los fungicidas cyproconazol y propiconazol y al control biológico con *Bacillus subtilis* en plántulas de *Coffea arabica* variedad Caturra, en condiciones de almacigo. En la aplicación de los productos de manera preventiva se obtuvo un 100% de inhibición de la esporulación del hongo sobre las lesiones con los tres productos, sin diferencias significativas entre los aislamientos de *H. vastatrix* evaluados. Con la aplicación curativa de los mismos productos, se obtuvo un índice de infección de 0,81 en plantas empleadas como testigo, mientras que para plantas tratadas con cyproconazol y propiconazol se obtuvo un índice de 0,38. *B. subtilis* no mostró capacidad de control curativo como se esperaba. El análisis de los datos del control curativo de *H. vastatrix* mostró que el inóculo proveniente de diferentes lotes comerciales de Ciudad Bolívar (Antioquia) fue significativamente más sensible al efecto de los triazoles, con un 77,7% de lesiones con necrosis respecto al aislamiento usado como control, proveniente de la Estación Central Naranjal, que tuvo un 33,7% de lesiones con necrosis. No existe evidencia de la aparición de variantes del hongo con algún grado de resistencia a cyproconazol ni a propiconazol en Colombia.

Palabras clave: Roya del cafeto, *Coffea arabica*, resistencia, cyproconazol, propiconazol

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the sensitivity of two Colombian isolates of *Hemileia vastatrix* to Cyproconazole and Propiconazole fungicides and to biological control with *Bacillus subtilis* on *Coffea arabica* var. Caturra seedlings under nursery conditions. In the preventive application of the products, 100% inhibition of the fungus sporulation on lesions with all three products was obtained and no significant differences were detected among the evaluated isolates of *H. vastatrix*. With the curative application of the same products, an infection rate of 0.81 in plants used as control was obtained while an index of 0.38 was obtained for plants treated with Cyproconazole and Propiconazole. *B. subtilis* showed no ability for curative control as expected. The data analysis of curative control of *H. vastatrix* showed that the inoculum from different commercial crops of Ciudad Bolívar (Antioquia) was significantly more sensitive to the effect of Triazols with 77.7% of lesions with necrosis compared to the isolate used as control collected from the Naranjal Experimental Station, which had 33.7% of lesions with necrosis. There is no evidence of the emergence of the fungus variants with some degree of resistance to Cyproconazole or Propiconazole in Colombia.

Keywords: Coffee rust, *Coffea arabica*, resistance, Cyproconazole, Propiconazole.

* Investigador Asociado (hasta junio de 2011) e Investigador Científico II, respectivamente. Fitopatología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia.

La roya del cafeto, causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, es la principal enfermedad que ataca al cultivo, y en Colombia puede causar pérdidas hasta del 30% en variedades susceptibles de la especie *Coffea arabica*, si no se efectúa control (10). La evolución de la aparición de razas del patógeno ha tenido un progreso muy similar en la mayoría de países productores de café en el mundo, debido a que en todos los casos se identificó la presencia inicial de la raza II, con el posterior desarrollo de otras razas diferentes genéticamente, a partir de este inóculo inicial (15).

La presencia de múltiples razas de la roya, en cada uno de los países productores de café en el mundo, es una realidad bien establecida (3, 13). Los cambios en la virulencia del patógeno se han reflejado en la aparición de nuevos aislamientos capaces de infectar materiales que en un principio eran resistentes (1). Los estudios de evolución e identificación de nuevas razas de patógenos de plantas tienen gran importancia, ya que no se debe descartar la aparición de razas hipervirulentas, que pueden ser devastadoras para un cultivo; el reciente caso de la aparición de la raza *ug99* de la roya negra del trigo, *Puccinia graminis*, que ha tenido efectos dramáticos en la reducción de la producción del cultivo en África (14), ilustra la precaución que debe tenerse en la vigilancia del desarrollo de razas de los microorganismos fitopatógenos y su evolución con respecto a cambios en virulencia o agresividad y la aparición de variantes resistentes a productos fungicidas usados para su control (7).

Las investigaciones desarrolladas en Cenicafé (Manizales, Caldas), han demostrado la eficiencia en el control de la roya del cafeto en Colombia, por medio del uso de las moléculas cyproconazol, propiconazol, compuestos cúpricos, hexaconazol, triadimefon

y más recientemente combinación de las moléculas cyproconazol + azoxystrobin y cyproconazol + thiamethoxan (9, 11). Para el caso específico de *Hemileia vastatrix*, el agente patógeno causante de la roya del cafeto, no conocemos reportes de resistencia a fungicidas. Sin embargo, en la historia reciente del manejo de cultivos, se han presentado casos en los que variantes de hongos fitopatógenos muestran resistencia a las moléculas de acción fungicida que anteriormente eran usadas con éxito en su control. Ejemplos emblemáticos de esta situación están dados por las cepas resistentes de *Botrytis cinerea* y *Blumeria graminis* que aparecieron 2 años después del uso intensivo de moléculas monositio del grupo de los benzimidazoles y estrobirulinas, en el cultivo de la uva (5, 8). Aunque el empleo de fungicidas multisitio ha mostrado un menor riesgo, se han reportado cepas resistentes como es el caso de *B. graminis* a las morpholininas después de 34 años de uso intensivo (12). Esta aparición de resistencia suele estar relacionada con el aumento de la presión selectiva sobre ciertas variantes del patógeno, ya sea por aplicación de mayores dosis a las recomendadas o por una frecuencia mayor de las aspersiones, ambas situaciones usuales en condiciones de epidemia (4).

Hasta hace algunas décadas, era de consenso general que un cambio en la respuesta a los fungicidas en condiciones de campo, se debía a cambios puntuales o mutaciones en los genes del patógeno objetivo de la molécula fungicida, y por lo tanto se trataba de un valor cualitativo de susceptibilidad del tipo Sí/No. Para evaluar la capacidad cualitativa del fitopatógeno de infectar el tejido vegetal tratado con la molécula fungicida, metodologías sobre lotes en el campo, material de almácigo en invernadero, hojas desprendidas e incluso discos de hoja, han sido empleadas con éxito para diferentes patógenos. Sin embargo, en la última década el concepto de resistencia

cuantitativa en agricultura se ha fortalecido con la investigación de las proteínas de secreción de los fitopatógenos, que se han asociado a mecanismos de tolerancia frente a la molécula fungicida. La utilización de variables de medición cuantitativa, es una de las herramientas más usadas en el estudio preventivo de la resistencia, dado que es útil en la distinción rápida entre variantes del patógeno, de acuerdo a un nivel medido cuantitativamente de susceptibilidad al fungicida y muestra de forma temprana los posibles cambios de ésta en el tiempo (6). Los antecedentes de este tipo de trabajos muestran que una variante resistente puede ser detectada y caracterizada coherentemente con la combinación de los datos cuantitativos y cualitativos.

En el año 2008 se detectó una epidemia de roya en varios departamentos de la zona central cafetera de Colombia, la cual se ha mantenido hasta la fecha y ha afectado todas las variedades susceptibles de café cultivadas en el país, con defoliaciones severas y pérdidas en producción estimadas en más del 30% (11). Frente a esta epidemia de roya, desde el año 2008 hasta la actualidad, se hace relevante monitorear el mantenimiento de la susceptibilidad de las poblaciones del patógeno presentes en el país a las moléculas fungicidas de uso general, para su control. Para cumplir este propósito se desarrollaron experimentos sobre hojas desprendidas y plantas de almácigo.

Esta investigación tuvo como objetivos: 1) Desarrollar una metodología que permita la evaluación de la sensibilidad de aislamientos de *H. vastatrix* a moléculas empleadas para su control; 2) Monitorear el mantenimiento de la sensibilidad de aislamientos del hongo a fungicidas del grupo de los triazoles; 3) Evaluar el efecto preventivo y curativo sobre la roya del cafeto de un producto biológico a base de la bacteria *Bacillus subtilis* de amplio

uso en la zona cafetera central colombiana, durante la epidemia de los años 2008-2011.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las actividades se desarrollaron en dos experimentos así:

1. Prueba de sensibilidad a tres productos sobre plantas de almácigo

Aislamientos de *H. vastatrix*. Se recolectaron hojas con presencia de roya en lotes comerciales de *C. arabica* var. Caturra del municipio de Ciudad Bolívar (Antioquia), a una altitud de 1.504 m, teniendo en cuenta aquellas fincas donde se reportó deficiencia del control químico de *H. vastatrix* con productos conteniendo el ingrediente activo cyproconazol. Las hojas fueron transportadas en cámara húmeda hasta las instalaciones de Cenicafé La Granja, donde se realizó la recolección de urediniosporas y la preparación del inóculo denominado HvCBolívar, en una concentración de 0,5 mg/mL. La solución de urediniosporas fue homogeneizada por medio de tratamiento con ultrasonido, durante 30 s, con agitación continua antes de ser asperjada en las plantas. Se empleó como fuente de inóculo contrastante, urediniosporas recolectadas de hojas en un lote experimental de variedad Caturra de la Estación Central Naranjal (Chinchiná, Caldas) y este aislamiento se denominó HvNaranjal.

Fungicidas. Se usaron tres productos, siguiendo las recomendaciones de cada casa comercial para la preparación de la mezcla (Tabla 1).

Material de almácigo. Se seleccionaron plantas de café de almácigo de 6 meses de edad de *C. arabica* var. Caturra susceptible a *H. vastatrix*. Las plantas fueron elegidas aleatoriamente en grupos de seis para ser asperjadas con la mezcla de cada producto.

Un grupo fue designado como testigo, al cual no se aplicó tratamiento.

Tratamiento con productos. Se realizó la preparación de la mezcla de cada producto diluyendo 1 cm³ del producto en 1 L de agua, de acuerdo a la recomendación de la casa comercial. Para la aspersión se usó un equipo Calimax® 10, equipado con una boquilla HC3 (con un flujo de 140 cm³ /min a 40 psi), sobre parcelas de 7 x 7 plantas colocando en el centro las seis plantas a tratar, de acuerdo a la metodología propuesta por Álvarez y Sierra (2). Se aplicó la mezcla conservando una altura de 30 cm en una cantidad de 0.5 cm³ por planta.

Inoculaciones. Por el envés del par de hojas superiores de cada planta, se inoculó por gota la suspensión de urediniosporas, depositando ocho gotas de 5 uL en cada hoja. Luego de realizar las inoculaciones las plantas fueron colocadas en un cuarto húmedo y en oscuridad, durante 48 h, antes de ser

trasladadas al invernadero en la Estación Central Naranjal.

Para la evaluación del control preventivo, la inoculación se realizó 24 h después de la aspersión del producto. En el caso del control curativo se realizó la inoculación una vez cumplido el período de latencia del hongo.

Diseño experimental. Se empleó un diseño de bloques al azar, cada bloque constituido por un producto. Los tratamientos fueron los dos inóculos del patógeno. Cada tratamiento fue aplicado sobre seis unidades experimentales (plantas) seleccionadas aleatoriamente. Cada unidad experimental estuvo constituida por dos unidades de lectura (hojas), en las que se registró el número de lesiones y el grado de desarrollo de la enfermedad, de acuerdo a la escala de Eskes (Tabla 2). Las lecturas del control preventivo se realizaron durante el período comprendido entre la aparición de los síntomas (período de incubación) y el máximo desarrollo de las pústulas del

Tabla 1. Productos empleados en la evaluación de sensibilidad de *H. vastatrix* en plantas de café de almácigo.

Ingrediente activo	Producto Comercial	Concentración de la mezcla (cm ³ .L ⁻¹)
cyproconazol	Alto®100 SL	1,0
propiconazol	Cropizol® EC	1,0
<i>Bacillus subtilis</i>	Prophytex® EC*	1,5

* Con registro del ICA No. 6925 para un cultivo diferente a café.

Tabla 2. Descripción de la escala de Eskes para el desarrollo de la roya del café.

Grado en la Escala	Descripción
0	Ausencia de lesión
1	Aparición de clorosis
2	Aumento en superficie de la clorosis
3	Tendencia de las lesiones a coalescer e intensificación de la decoloración
4	Aparición de las primeras esporas
5	Esporulación inferior al 25% de la lesión
6	Esporulación entre el 25%-50% de la lesión
7	Esporulación mayor al 50% de la lesión

tratamiento testigo (período de latencia), mientras que las lecturas del control curativo se llevaron a cabo desde la aspersión con el fungicida hasta el máximo desarrollo de la enfermedad (período de latencia) en el testigo.

Análisis de datos. A partir de los datos tomados del número de lesiones y grado de la lesión, se estimó para cada tiempo de lectura (días) el Índice de Infección (II) descrito de acuerdo a la Ecuación <<1>>.

$$II = \frac{\sum(n \times g)}{N \times G}$$

Ecuación <<1>>

Donde:

n = número de lesiones

g = grado de la lesión de acuerdo a la escala

N = número total de lesiones

G = número total de grados de la escala empleada.

Por lo tanto, la variable II toma valores de 0 a 1, siendo 0 la ausencia de síntomas de la enfermedad y 1 el desarrollo al nivel máximo de la escala del total de las lesiones sobre la hoja.

Se realizó el análisis descriptivo de la variable a partir de los estadísticos media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación. Para el conjunto de datos de cada tiempo de lectura de cada montaje experimental (control preventivo y control curativo) se realizó análisis de varianza de dos factores, asignándose como primer factor el aislamiento y como segundo, el fungicida (los tres productos y el testigo). Para los casos en que se detectaron diferencias significativas se siguió una comparación entre medias, por medio de la prueba de comparación múltiple de Duncan, fijando un nivel de significancia del 95%.

Se tomó la lectura en el tiempo final del porcentaje de lesiones producidas, con esporulación y con reacciones de control sobre el tejido, como variables descriptivas adicionales.

2. Prueba de susceptibilidad de *H. vastatrix* a cyproconazol, en diferentes tiempos de aplicación sobre hojas desprendidas

Inoculación. Se inocularon hojas desprendidas del primer par superior de plántulas de 6 meses de edad de *C. arabica* var. Caturra, colocando en el envés de cada hoja ocho gotas de 5uL de la solución de urediniosporas. La solución se preparó en concentración de 0,5 mg de urediniosporas por 1,0 mL de agua, y luego se agitó usando ultrasonido durante 30 s. Una vez se inocularon las hojas, éstas se depositaron en cámaras húmedas sobre papel absorbente humedecido con agua destilada estéril. Las cámaras se mantuvieron en oscuridad durante 48 h, tiempo después del cual se sometieron a un fotoperíodo de 12/12, a 22°C ± 1 y humedad relativa de 65%.

Aspersiones. Se utilizó una mezcla de producto con la concentración recomendada por la casa comercial. Para evaluar el control preventivo, las aspersiones se realizaron a los 20, 15, 10, 5 y 1 día antes de la inoculación de las hojas, mientras que para evaluar el control curativo, las aspersiones se hicieron a los 1, 5, 10, 15 y 20 días después de la inoculación.

Diseño experimental. El diseño fue completamente al azar, con aplicación aleatoria del tratamiento sobre las unidades experimentales, fijando como unidad experimental la hoja desprendida y como tratamiento el día de aplicación del producto. Se inocularon seis hojas por cada tratamiento, incluyendo un tratamiento testigo, al que se trató con agua destilada estéril. Como

variable de medición se empleó el Índice de Infección, tomado a los 30 días después de la inoculación, cuando las hojas testigo tuvieron un desarrollo máximo de lesiones de roya.

Análisis de datos. Se calcularon los estadísticos descriptivos media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación. Se realizó un análisis de varianza de un factor para detectar diferencias en cada experimento (control preventivo y control curativo), y en los casos en que esto sucedió se continuó con una prueba de comparación (Duncan, $\alpha=0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Prueba de sensibilidad de *Hemileia vastatrix* en material de almácigo

Evaluación empleando control preventivo.

En la Tabla 3 se presentan los valores de la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación, que describen los datos tomados durante el experimento.

De acuerdo con los datos obtenidos para cada tiempo de lectura mediante análisis de varianza, se observa que en todos los días evaluados se detectó diferencia significativa

Tabla 3. Descripción de los Índices de Infección obtenidos para la evaluación de sensibilidad al control preventivo.

Aislamiento	Producto	Estadístico descriptivo	Día después de la inoculación					
			30	34	38	42	46	50
HvCBolívar	cyproconazol	Media	0,14	0,15	0,16	0,16	0,16	0,20
		D.E.	0,04	0,05	0,05	0,05	0,06	0,08
		C.V.	32,21	32,79	32,62	32,70	35,52	40,31
	propiconazol	Media	0,22	0,23	0,25	0,27	0,27	0,34
		D.E.	0,07	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07
		C.V.	32,62	25,39	24,15	21,68	24,77	21,47
	<i>Bacillus subtilis</i>	Media	0,16	0,19	0,19	0,21	0,22	0,28
		D.E.	0,03	0,05	0,04	0,06	0,07	0,09
		C.V.	20,20	24,32	22,83	29,91	30,30	30,54
		Media	0,52	0,56	0,70	0,77	0,85	0,90
		D.E.	0,06	0,07	0,09	0,09	0,08	0,04
		C.V.	12,05	12,80	12,76	12,13	9,81	4,86
HvNaranjal	cyproconazol	Media	0,16	0,19	0,20	0,21	0,24	0,26
		D.E.	0,03	0,04	0,05	0,05	0,06	0,04
		C.V.	18,36	20,93	24,56	22,07	26,34	15,12
	propiconazol	Media	0,18	0,21	0,24	0,24	0,27	0,37
		D.E.	0,03	0,04	0,06	0,06	0,08	0,07
		C.V.	14,77	20,02	27,48	26,96	28,62	18,08
	<i>Bacillus subtilis</i>	Media	0,16	0,20	0,24	0,24	0,28	0,34
		D.E.	0,05	0,07	0,08	0,08	0,10	0,12
		C.V.	34,15	34,68	35,49	34,74	35,26	35,39
		Media	0,48	0,57	0,66	0,77	0,82	0,89
		D.E.	0,17	0,15	0,15	0,16	0,02	0,01
		C.V.	32,68	25,73	23,17	20,61	17,82	13,85

D.E.: Desviación estándar; C.V.: Coeficiente de variación.

debida al factor producto, pero no al factor aislamiento. Incluso, en el día final de lectura, cuando el desarrollo de la enfermedad en el testigo llegó a su punto máximo de esporulación de lesiones, la diferencia entre los dos aislamientos de *H. vastatrix* no resultó significativa. Para detalles del resultado de ANAVA, se presenta la Tabla 4.

Al realizar el análisis de comparación de medias para el factor producto, se evidencia un efecto positivo del control preventivo sobre el desarrollo de la enfermedad, en comparación con las plantas testigo. Adicionalmente, hubo diferencias entre productos, siendo cyproconazol el producto que mostró mayor control preventivo de la roya. En la Figura 1 las letras sobre la gráfica de histogramas describen la agrupación obtenida mediante la prueba de comparación de medias de Duncan ($gl=3$, $\alpha=0,05$, $p<0,001$) para el conjunto de datos tomados en cada día de lectura.

En el tiempo, el control del desarrollo de la enfermedad se evidencia también a través de la variable porcentaje de lesiones con esporulación, que para el total de las plantas asperjadas con productos fue igual a 0, obteniéndose por lo tanto, el efecto esperado como respuesta a la inhibición de la esporulación a la aplicación preventiva en los dos aislamientos de *H. vastatrix* evaluados.

Las lesiones que se desarrollaron sobre las hojas asperjadas preventivamente mostraron como reacción de control predominante la tumefacción del tejido foliar, sin notarse diferencias entre los dos aislamientos evaluados (Tabla 5).

A través de la medición de la variable Índice de Infección como variable principal en el análisis y las variables complementarias porcentaje de lesiones con esporulación y porcentaje de lesiones con tumefacción, se evidenció que el aislamiento de *H. vastatrix* proveniente del municipio de Ciudad Bolívar

(Antioquia) fue igual de susceptible a la aplicación preventiva de los tres productos probados, que el aislamiento de la Estación Central Naranjal, tomado como control del experimento por su respuesta exitosa al control químico. Este hecho se observa en la Figura 2, cuando se grafican los datos obtenidos para cada uno de los aislamientos en su comportamiento en el tiempo.

Evaluación empleando control curativo. En la Tabla 6 se presenta la descripción de los datos de la variable Índice de Infección a través de los estadísticos media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación.

Debido a que se detectaron diferencias para todas las fuentes de variación es útil observar gráficamente el comportamiento de estas fuentes en el tiempo para el total del experimento.

El promedio del Índice de Infección de los dos aislamientos evaluados mostró que, para todos los días de lectura, el aislamiento proveniente de Ciudad Bolívar (Antioquia) tuvo un desarrollo significativamente menor al proveniente de la Estación Naranjal (Figura 3).

Si se observa el comportamiento debido al factor producto en el tiempo, para el total de las plantas evaluadas, se aprecia que después de 13 días de la aplicación de los productos se empieza a diferenciar su efecto sobre el desarrollo de *H. vastatrix* (Figura 4). Antes de este tiempo, las lesiones continuaron un desarrollo normal, con esporulación en aquellas lesiones que permanecían en el grado 3, y aumento del área con esporas en aquellas lesiones en grado 4 al momento de la aplicación. Posteriormente, a partir de la segunda semana después de la aspersión se observó claramente el efecto del control de los triazoles, mientras que con el producto biológico *Bacillus subtilis* y el testigo siguió un desarrollo mayor de la enfermedad.

Tabla 4. Resultados del análisis de varianza para los Índices de Infección obtenidos en cada tiempo de lectura. Se resalta la detección de diferencias ($p < 0,05$).

ANOVA datos día de lectura=30					
Fuente de Variación	SC	Gl	CM	F	Valor p
Modelo	2,29	7	0,33	57,43	<0,0001
Aislamiento	7,40E-04	1	7,40E-04	0,13	0,7192
Producto	2,28	3	0,76	133,15	<0,0001
Aislamiento* Producto	0,01	3	4,60E-03	0,80	0,4947
Error	0,50	88	0,01		
Total	2,80	95			
ANOVA datos día de lectura=34					
Modelo	2,52	7	0,36	67,73	<0,0001
Aislamiento	1,60E-03	1	1,60E-03	0,30	0,5862
Producto	2,50	3	0,83	157,18	<0,0001
Aislamiento* Producto	0,01	3	4,00E-03	0,76	0,5179
Error	0,47	88	0,01		
Total	2,98	95			
ANOVA datos día de lectura=38					
Modelo	4,07	7	0,58	87,07	<0,0001
Aislamiento	2,50E-03	1	2,50E-03	0,37	0,5419
Producto	4,03	3	1,34	201,36	<0,0001
Aislamiento* Producto	0,03	3	0,01	1,68	0,1777
Error	0,59	88	0,01		
Total	4,65	95			
ANOVA datos día de lectura=42					
Modelo	5,49	7	0,78	109,74	<0,0001
Aislamiento	3,40E-03	1	3,40E-03	0,48	0,4903
Producto	5,47	3	1,82	254,76	<0,0001
Aislamiento* Producto	0,02	3	0,01	1,14	0,3392
Error	0,63	88	0,01		
Total	6,12	95			
ANOVA datos día de lectura=46					
Modelo	6,49	7	0,93	124,3	<0,0001
Aislamiento	0,01	1	0,01	1,77	0,1867
Producto	6,44	3	2,15	287,61	<0,0001
Aislamiento* Producto	0,04	3	0,01	1,83	0,1468
Error	0,66	88	0,01		
Total	7,15	95			
ANOVA datos día de lectura=50					
Modelo	6,72	7	0,96	136,91	<0,0001
Aislamiento	0,02	1	0,02	3,47	0,0658
Producto	6,67	3	2,22	317,31	<0,0001
Aislamiento* Producto	0,02	3	0,01	0,98	0,4046
Error	0,62	88	0,01		
Total	7,33	95			

Figura 1. Sensibilidad de *H. vastatrix* al control preventivo con tres productos sobre plantas de café de almácigo, medida a través de la variable Índice de Infección. Las letras sobre las barras muestran los grupos detectados mediante prueba de comparación de medias (Duncan, $gl=3$, $\alpha=0,05$).

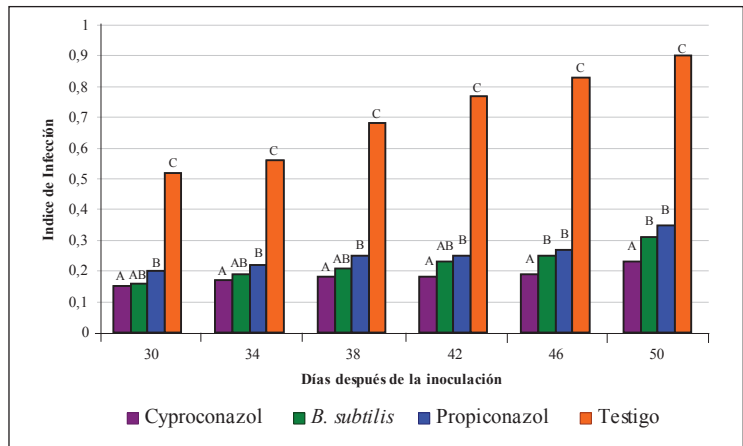
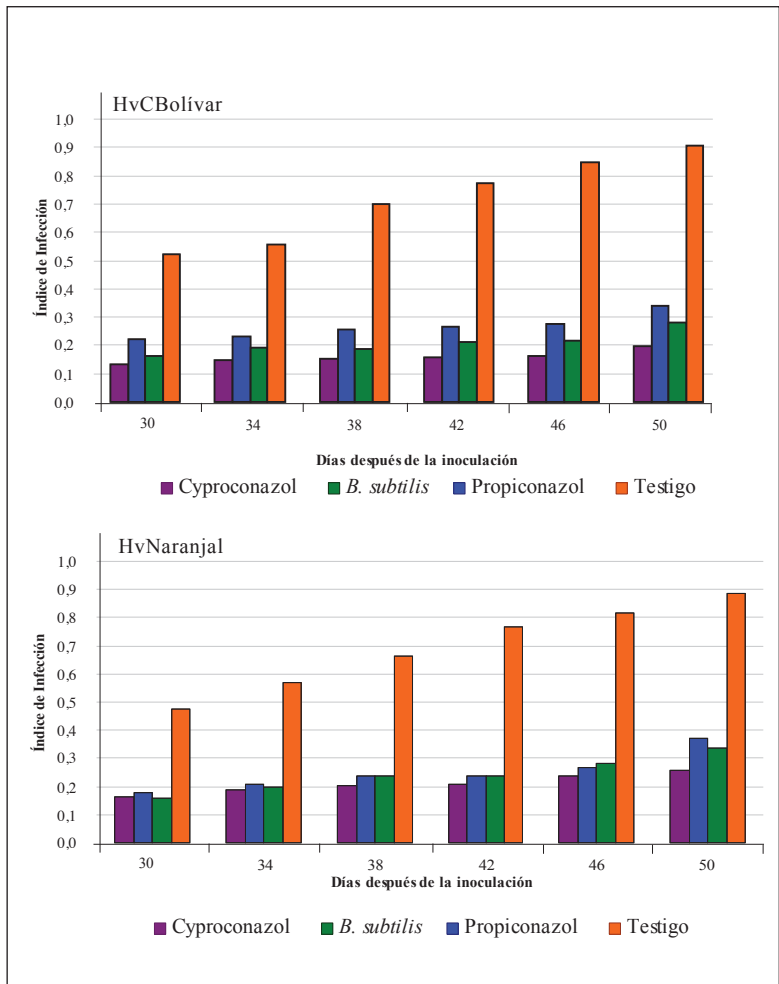


Figura 2. Histograma de los valores medios de Índice de Infección para cada aislamiento durante el tiempo de lectura del experimento de sensibilidad al control preventivo. Las letras sobre las barras muestran los grupos detectados mediante prueba de comparación de medias (Duncan, $gl=3$, $\alpha=0,05$).



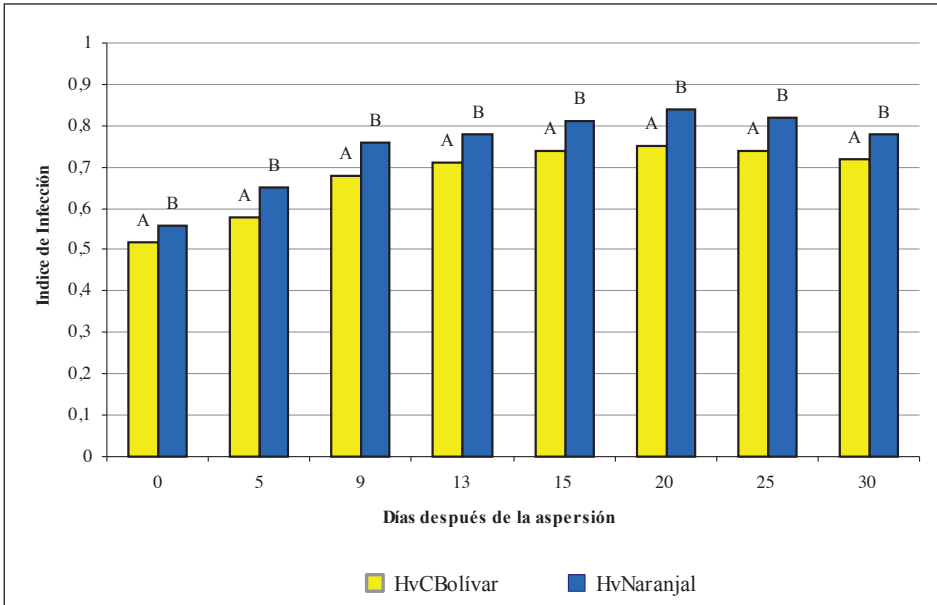


Figura 3. Histograma de datos medios del Índice de Infección obtenido para cada aislamiento en el tiempo de lectura del experimento, empleando una aplicación curativa de los productos. Las letras sobre las barras muestran los grupos detectados mediante prueba de comparación de medias (Duncan, $gl=3$, $\alpha=0,05$).

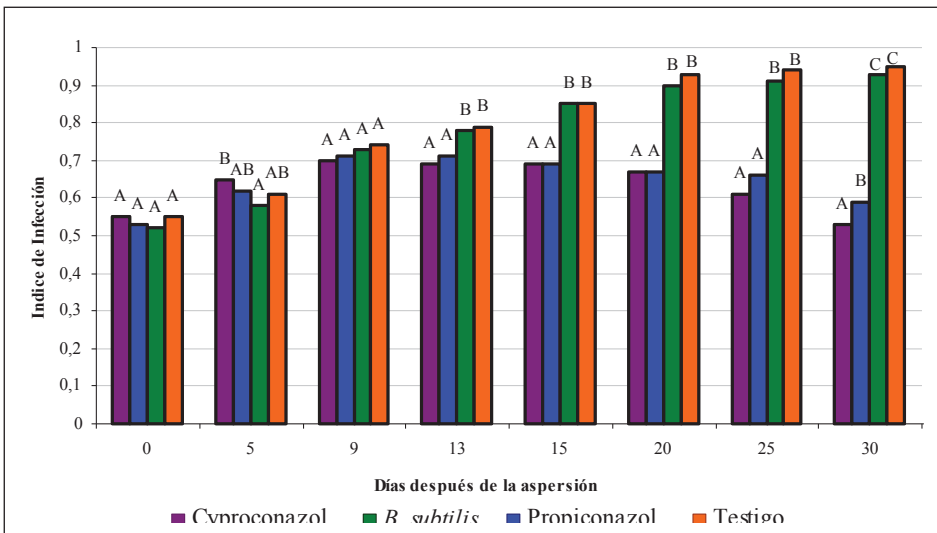


Figura 4. Sensibilidad de *H. vastatrix* al control curativo con tres productos sobre plantas de café de almácigo medida a través de la variable Índice de Infección. Las letras sobre las barras muestran los grupos significativamente diferentes detectados a partir de prueba de comparación de medias para cada tiempo de lectura (Duncan, $\alpha=0,05$).

Este efecto, morfológicamente, consiste en el lavado de las lesiones esporuladas, con la disminución en el valor del Índice de Infección respecto al tiempo de lectura preliminar y una diferencia que estadísticamente permite distinguir el control efectuado por el cyproconazol y el propiconazol, de la ausencia de control obtenido con el producto biológico a base de *Bacillus subtilis*.

Para el último día de lectura, cuando las lesiones llegaron a su máximo desarrollo en las plantas testigo, finalmente se obtuvo un mayor control curativo por parte de cyproconazol, seguido por propiconazol, y un comportamiento igual de las plantas tratadas con el biológico respecto a las del testigo.

También se detectó diferencia a nivel estadístico teniendo en cuenta la interacción aislamiento-fungicida después del día 20 de lectura. La agrupación resultante de la prueba de comparación de medias en este caso (Duncan, $\alpha=0,05$), mostró que esta diferencia estaba dada por el comportamiento de los dos aislamientos de *H. vastatrix* frente a los fungicidas triazoles, siendo el aislamiento recolectado en Ciudad Bolívar más sensible a ambos productos (con Índice de Infección menor) que el aislamiento proveniente de la Estación Central Naranjal. En contraste, el

comportamiento de ambos aislamientos frente al producto biológico y en las plantas testigo no mostró diferencia estadística.

Este resultado estadístico, resultó acorde con los datos tomados para las variables complementarias, donde se obtuvo un mayor porcentaje de lesiones con reacciones de control en el día final de lectura para el aislamiento procedente de Antioquia con respecto al aislamiento recolectado en Naranjal (Tabla 8). Para los dos aislamientos se observaron reacciones de control tipo tumefacción, necrosis y lavado de esporas sobre las hojas de las plantas tratadas.

El desarrollo de la enfermedad observado para cada uno de los aislamientos evaluados se representa gráficamente en la Figura 5.

2. Prueba de sensibilidad de *Hemelia vastatrix* al cyproconazol con diferentes tiempos de aplicación del producto

Evaluación del control preventivo. La Tabla 9 muestra los datos obtenidos, con bajos valores para el Índice de Infección para todos los tiempos de aplicación del fungicida.

El análisis de varianza para este conjunto de datos del control preventivo mostró que a través del experimento se detectaron diferencias significativas (Tabla 10), que

Tabla 5. Lesiones producidas con esporulación o tumefacción en hojas de café inoculadas por gota, con una solución de urediniosporas de *H. vastatrix*.

Aislamiento	Variable (%)	cyproconazol	propiconazol	<i>B. subtilis</i>	Testigo
HvCBolívar	Lesiones producidas	91,6	98,9	91,6	100
	Lesiones con esporulación	0	0	0	100
	Lesiones con tumefacción	91,7	90,6	90,7	0
HvNaranjal	Lesiones producidas	91,6	97,9	98,9	100
	Lesiones con esporulación	0	0	0	100
	Lesiones con tumefacción	100	94,7	92,6	0

Tabla 6. Descripción de los datos y los estadísticos de los Índices de Infección obtenidos para la evaluación de sensibilidad de *Hemileia vastatrix* al control preventivo.

Aislamiento	Producto	Estadístico Descriptivo	Día después de la inoculación								
			0	5	9	13	15	20	25	30	
HvCBolivar	cyproconazol	Media	0,53	0,59	0,65	0,65	0,64	0,6	0,54	0,46	
		D.E.	0,06	0,08	0,1	0,13	0,19	0,16	0,09	0,04	
		C.V.	11,36	14,18	15,48	19,5	28,94	26,58	17,19	8,59	
	propiconazol	Media	0,49	0,59	0,67	0,68	0,64	0,58	0,58	0,54	
		D.E.	0,06	0,08	0,08	0,09	0,1	0,09	0,13	0,13	
		C.V.	12,33	13,37	12,41	13,11	15,15	16,09	23,1	23,73	
	<i>Bacillus subtilis</i>	Media	0,53	0,59	0,72	0,77	0,84	0,89	0,91	0,93	
		D.E.	0,09	0,1	0,09	0,09	0,09	0,08	0,07	0,06	
		C.V.	17,7	17,72	12,95	12,24	10,67	9,15	8,06	6,13	
	Testigo	Media	0,51	0,57	0,69	0,74	0,82	0,92	0,93	0,94	
		D.E.	0,08	0,09	0,12	0,11	0,14	0,07	0,06	0,04	
		C.V.	15,34	15,34	16,9	15,36	16,58	7,25	6,31	4,74	
	HvNaranjal	cyproconazol	Media	0,57	0,71	0,75	0,74	0,74	0,73	0,68	0,61
			D.E.	0,06	0,11	0,13	0,12	0,13	0,13	0,13	0,14
			C.V.	10,14	14,98	17,47	16,73	17,95	17,8	19,41	22,42
propiconazol		Media	0,57	0,66	0,75	0,75	0,74	0,76	0,74	0,64	
		DE	0,06	0,08	0,1	0,1	0,09	0,09	0,11	0,13	
		CV	11,37	12,86	13,93	13,61	12,46	12,25	14,53	20,62	
<i>Bacillus subtilis</i>		Media	0,51	0,57	0,74	0,8	0,86	0,91	0,91	0,92	
		D.E.	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	
		C.V.	12,92	12,93	9,73	8,7	9,46	8,32	9,01	8,58	
Testigo		Media	0,59	0,66	0,78	0,84	0,89	0,94	0,95	0,96	
		D.E.	0,09	0,1	0,09	0,09	0,1	0,07	0,07	0,05	
		C.V.	14,67	14,65	10,91	10,75	10,95	7,53	7,41	4,93	

Al analizar los datos obtenidos para cada tiempo de lectura mediante ANAVA, se observa que en todos los días evaluados se detectó diferencia significativa debida al factor aislamiento y al factor producto, a partir del día 13. Posteriormente, a partir del día 20, las diferencias se observaron en la interacción aislamiento-producto (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados del análisis de varianza corrido para el conjunto de datos obtenidos en cada tiempo de lectura. Se resalta la detección de diferencias ($p < 0,05$).

ANAVA datos día de lectura=0					
Fuente de Variación	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0,10	7	0,01	2,85	0,0099
Aislamiento	0,05	1	0,05	9,17	0,0032
Fungicida	0,02	3	0,01	1,10	0,3516
Aislamiento*Fungicida	0,04	3	0,01	2,50	0,0650
Error	0,46	88	0,01		
Total	0,57	95			
ANAVA datos día de lectura=5					
Modelo	0,23	7	0,03	4,12	0,0006
Aislamiento	0,10	1	0,10	12,29	0,0007
Fungicida	0,06	3	0,02	2,62	0,0561
Aislamiento*Fungicida	0,07	3	0,02	2,89	0,0600
Error	0,72	88	0,01		
Total	0,95	95			
ANAVA datos día de lectura=9					
Modelo	0,18	7	0,03	2,54	0,0200
Aislamiento	0,13	1	0,13	13,34	0,0004
Fungicida	0,02	3	0,01	0,70	0,0525
Aislamiento*Fungicida	0,02	3	0,01	0,77	0,5129
Error	0,88	88	0,01		
Total	1,06	95			
ANAVA datos día de lectura=13					
Modelo	0,32	7	0,05	4,38	0,0003
Aislamiento	0,13	1	0,13	12,1	0,0008
Fungicida	0,18	3	0,06	5,60	0,0015
Aislamiento*Fungicida	0,02	3	0,01	0,59	0,6242
Error	0,93	88	0,01		
Total	1,25	95			
ANAVA datos día de lectura=15					
Modelo	0,77	7	0,11	7,82	<0,0001
Aislamiento	0,12	1	0,12	8,72	0,0040
Producto	0,63	3	0,21	14,88	<0,0001
Aislamiento* Producto	0,02	3	0,01	0,46	0,7096
Error	1,24	88	0,01		
Total	2,01	95			
ANAVA datos día de lectura=20					
Modelo	1,76	7	0,25	24,72	<0,0001
Aislamiento	0,19	1	0,19	18,33	<0,0001
Producto	1,47	3	0,49	47,96	<0,0001
Aislamiento* Producto	0,11	3	0,04	3,61	0,0163
Error	0,90	88	0,01		
Total	2,66	95			
ANAVA datos día de lectura=25					
Modelo	2,29	7	0,33	34,26	<0,0001
Aislamiento	0,16	1	0,16	16,56	0,0001
Producto	2,00	3	0,67	69,95	<0,0001
Aislamiento* Producto	0,13	3	0,04	4,48	0,0056
Error	0,84	88	0,01		
Total	3,13	95			
ANAVA datos día de lectura=25					
Modelo	3,68	7	0,53	61,8	<0,0001
Aislamiento	0,10	1	0,10	12,35	0,0007
Producto	3,47	3	1,16	135,94	<0,0001
Aislamiento* Producto	0,11	3	0,04	4,14	0,0085
Error	0,75	88	0,01		
Total	4,43	95			

Tabla 8. Evaluación del desarrollo de lesiones de *H. vastatrix* sobre el tejido foliar de café, para medir la sensibilidad del hongo al control curativo con tres productos, en el día 30 de lectura.

Aislamiento	VARIABLES COMPLEMENTARIAS (%)	CYPROCONAZOL	PROPICONAZOL	<i>B. subtilis</i>	TESTIGO
HvCBolívar	Lesiones producidas	97,9	95,8	98,9	100
	Lesiones con esporulación	85,1	82,6	94,7	100
	Lesiones con lavado de esporas	76,2	50,0	0	0
	Lesiones con tumefacción	98,9	100	0	0
	Lesiones con necrosis	77,7	51,1	0	0
HvNaranjal	Lesiones producidas	98,9	95,8	96,8	100
	Lesiones con esporulación	83,2	91,3	92,3	100
	Lesiones con lavado de esporas	41,7	26,2	0	0
	Lesiones con tumefacción	94,7	100	0	0
	Lesiones con necrosis	33,7	6,50	0	0

Tabla 9. Desarrollo de *H. vastatrix* sobre hojas desprendidas tratadas con cyproconazol en diferentes tiempos de aplicación preventiva.

DÍA ASPERSIÓN	Media	DE	CV
-1	0,14	0	0
-5	0,17	0,03	16,76
-10	0,18	0,03	14,84
-15	0,21	0,05	21,28
-20	0,22	0,04	20,42
Testigo	0,81	0,10	12,08

por medio de una prueba de comparación de medias permitió agrupar los tratamientos como se muestra en la Figura 6. Se observa una diferencia en la variable Índice de Infección entre el tratamiento testigo y los restantes, permitiendo concluir que *H. vastatrix* fue sensible a todos los tiempos de aplicación preventiva (de 20 a 1 día antes

de la inoculación).

Evaluación del control curativo. La aplicación de cyproconazol, luego de la inoculación de roya, mostró un efecto de control con el 100% de la inhibición de esporulación de *H. vastatrix* hasta el día 15. Una vez completado este tiempo, que corresponde

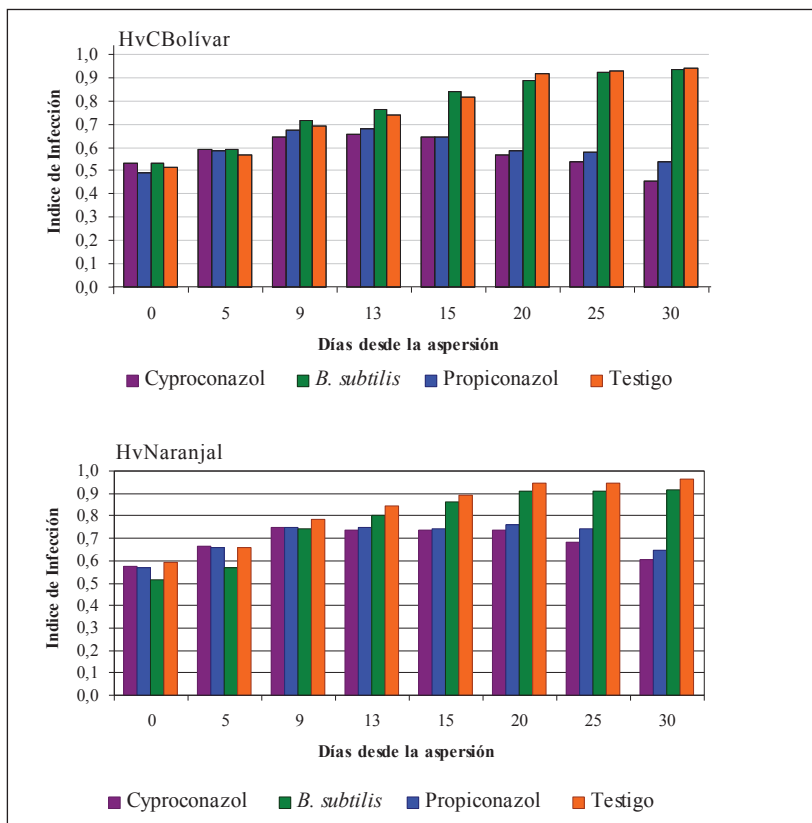


Figura 5. Desarrollo de la roya del café en plántulas de almácigo inoculadas con dos aislamientos de *H. vastatrix* y tratadas con tres productos.

Tabla 10. Análisis de varianza para los datos de control preventivo de *H. vastatrix* en diferentes tiempos de aplicación sobre hoja desprendida.

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	1,99	5	0,4	156,82	<0,0001
Tratamiento	1,99	5	0,4	156,82	<0,0001
Error	0,08	30	2,50E-03		
Total	2,06	35			

al día de período de latencia del hongo en condiciones de hoja desprendida, la aspersión con el fungicida no detuvo la esporulación aunque sí inició reacciones de control como la tumefacción y la necrosis en el tejido foliar donde se encontraba la lesión.

Los valores promedio se presentan en la Tabla 11. Se observó que la aplicación curativa del fungicida resultó en la inhibición de la esporulación cuando se realizó de manera temprana, sin embargo, cuando las lesiones ya se encontraban en el grado 3 de la escala Eskes, es decir, cercanas a iniciar el proceso

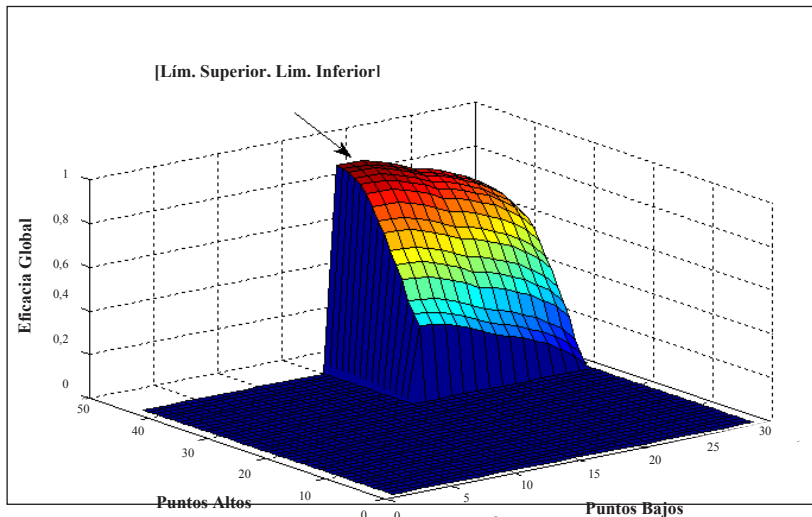


Figura 6. Histograma de medias aritméticas del Índice de Infección obtenido a los 30 días de la inoculación de hojas de café desprendidas previamente tratadas con cyproconazol.

Tabla 11. Promedios para el Índice de Infección obtenidos en la aspersión curativa de cyproconazol en diferentes tiempos, posterior a la inoculación con *H. vastatrix* en hoja desprendida.

Día aspersión	Media	DE	CV
1	0,22	0,04	19,73
5	0,23	0,04	18,07
10	0,26	0,03	11,87
15	0,27	0,04	13,43
20	0,38	0,08	19,66
Testigo	0,81	0,10	12,08

C.V.: Coeficiente de variación

D.E.: Desviación estándar

de esporulación, la aplicación del fungicida ya no detuvo el proceso.

Además de la diferencia de la aplicación de cyproconazol con respecto al tratamiento testigo, la prueba de comparación de medias mostró una diferencia entre el desarrollo de la enfermedad cuando se aplicó el fungicida, 1 a 15 días después de la inoculación, y cuando se aplicó el día 20 (Figura 7). Estas diferencias estadísticas soportan las observaciones directas realizadas en el experimento, que muestran la sensibilidad de

H. vastatrix reflejada como inhibición de la esporulación cuando se realiza la aplicación temprana del fungicida y manifestada como reacciones de control, especialmente la necrosis, en el caso de cyproconazol, cuando la aplicación se hace sobre una lesión que ya ha alcanzado el grado 3 de desarrollo de la enfermedad.

Conclusiones

El aislamiento de *H. vastatrix* recolectado en

Figura 7.
Histograma de las medias aritméticas obtenidas para los tratamientos a diferentes tiempos, con aplicación curativa de cyproconazol, sobre hoja desprendida.

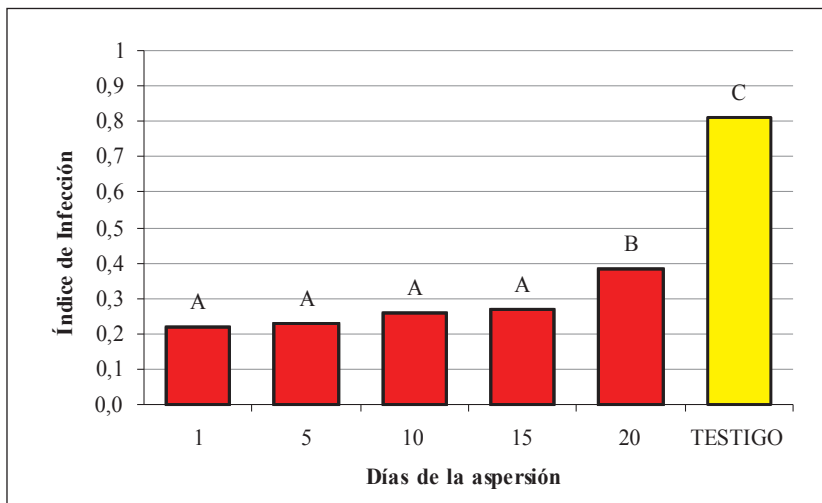


Tabla 12. Análisis de varianza realizado al conjunto de datos de la evaluación del control curativo de cyproconazol a diferentes tiempos sobre hoja desprendida.

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	1,56	5	0,31	88,34	<0,0001
Tratamiento	1,56	5	0,31	88,34	<0,0001
Error	0,11	30	3,50E-03		
Total	1,66	35			

Ciudad Bolívar (Antioquia) fue controlado preventivamente de manera exitosa con cyproconazol, propiconazol y la cepa de *Bacillus subtilis* con igual sensibilidad que el aislamiento recolectado en Naranjal (Chinchiná). En el caso del control curativo, el aislamiento antioqueño de *H. vastatrix* mostró mayor sensibilidad a los triazoles, con lo que se evidencia de que no corresponde a una variante con algún grado de resistencia al control químico.

El experimento en plantas de almácigo mostró la interrupción del desarrollo de la

enfermedad en un momento anterior a la esporulación, cuando se aplicaron los tres productos probados de manera preventiva, en los dos aislamientos evaluados.

Mientras los efectos del control preventivo de los triazoles se muestran estadísticamente significativos desde la aparición de los síntomas de la enfermedad, los efectos del control curativo comenzaron a mostrar significancia a partir del día 13 después de su aplicación.

El experimento sobre hojas desprendidas

indica que *H. vastatrix* mostró sensibilidad a cyproconazol, expresada como inhibición de esporulación en aplicación del fungicida desde 20 días antes de la inoculación hasta 10 días después de ésta. En las aplicaciones realizadas 15 y 20 días después de la inoculación la sensibilidad al fungicida se observó en la aparición de reacciones de lavado de esporas, tumefacción y necrosis.

Tanto para la evaluación de sensibilidad de *H. vastatrix* al control preventivo como curativo, sobre hojas desprendidas procedentes de material de almácigo, el empleo de la variable Índice de Infección resultó adecuada para describir matemáticamente las observaciones directas.

LITERATURA CITADA

1. ALVARADO A., G.; MORENO R., L.G. Cambio de la virulencia de *Hemileia vastatrix* en progenies de Caturra x Híbrido de Timor. *Cenicafé* 56(2):110-126. 2005.
2. ÁLVAREZ G., I.C.; SIERRA S., C.A. Metodología para la evaluación del efecto de fungicidas sobre la reproducción de *Hemileia vastatrix*. *Cenicafé* 1989 40:16-26.
3. CARVALHO A.; ESKEA A.B.; CASTILLO, J.; SREENIVASANM.; ECHEVERRIJ.; FERNÁNDEZ C.; FAZUOLIL. Breeding programs In: Coffee rust: Epidemiology, resistance, and Management. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. pp. 293-336. 1987.
4. DEISING H., REIMANN S. Y PASCHOLATI S. 2008. Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Brazilian Journal of Microbiology* 39:286-295.
5. ERICHSEN E. 1999. Problems in mildew control in northern Germany. *Getreide* 1:44-46.
6. HAMADA N., KATSURAYAMA Y.; DANTAS A. Sensibilidade "in vitro" ao benomyl por isolados de *Colletotrichum* spp. asociados à mancha da gala em macieira. *Tropical Plant Pathology* 34(5):347-351.2009.
7. LEROCH M; KRETSCHMER M; HAHN M. Fungicide Resistance Phenotypes of *Botrytis cinerea* Isolates from Commercial Vineyards in South West Germany. *Journal of Phytopathology* 2011 159:63-65.
8. LEROUX P.; DESCOTES A. Resistance of *Botrytis cinerea* to fungicides and strategies for its control in the Champagne vineyards. *Proc. Br. Crop Prot. Pests Dis.* 1: 131-136. 1996.
9. LONDOÑO G.; LEGUIZAMÓN, J.; MONTOYA, E. Evaluación del fungicida Cyproconazol para el control de la roya del caféto *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. *Cenicafé* 46(1):56-62. 1995.
10. RIVILLAS C.A.; LEGUIZAMÓN J.E.; GIL L.F.; DUQUE, H.. Recomendaciones para el manejo de la roya del caféto en Colombia. 2. ed. *Boletín Técnico Cenicafé* 19:1-36.2005.
11. RIVILLAS C.A.; SERNA C.A.; CRISTANCHO, M.A.; GAITÁN, A.L. La Roya del Caféto en Colombia: Impacto, manejo y costos del control. *Boletín Técnico Cenicafé* No 36:1-51. 2011.
12. ROBERTSON S.; GILMOUR J.; NEWMAN D.; LENNARD J. Sensitivity of barley powdery mildew isolates to morpholine fungicides. *Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases* 3:1159-1162.1990.
13. RODRIGUES JR., C.J.; BETTENCOURT A.J.; RIJO L. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. *Ann. Rev. Phytopath.* 14: 49–70. 1975.
14. WANYERA, R.; KINYUA, M. G.; JIN, Y.; SINGH, R. P. The spread of stem rust caused by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, with virulence on Sr31 in wheat in eastern Africa. *Plant Disease* 90:113. 2006.
15. ZAMBOLIM L.; ZAMBOLIM E.; VARZEA V. Durable Resistance to Coffee Leaf Rust. *Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.* 2005. 450p.