

D. L.
01
T(496)
C. 3

BIBLIOTECA CENTRAL-USAC
DEPOSITO LEGAL
PROHIBIDO EL PRESTAMO EXTERNO

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMIA

EVALUACION DEL EFECTO ENZIMATICO DEL HONGO

Verticillium hemileiae SOBRE LA Hemileia vastatrix (Berk & Br.)

INCITANTE DE LA ROYA DEL CAFETO

TESIS

Presentada a la Honorable Junta Directiva

de la

Facultad de Agronomía

de la

Universidad de San Carlos de Guatemala

Por

Guillermo Alberto García Estrada

En el acto de su investidura como

Ingeniero Agrónomo

En el Grado Académico de

Licenciado en Ciencias Agrícolas

Guatemala, Junio de 1984

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

Dr. Eduardo Meyer Maldonado

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

DECANO:	Ing. Agr. César Castañeda
VOCAL 1o.:	Ing. Agr. Oscar René Leiva Ruano
VOCAL 2o.:	Ing. Agr. Gustavo A. Méndez Gómez
VOCAL 3o.:	Ing. Agr. Rolando Lara Alecio
VOCAL 4o.:	Prof. Heber Arana Quiñónez
VOCAL 5o.:	Prof. Leonel Arturo Gómez Leonardo
SECRETARIO:	Ing. Agr. Rodolfo Alvizúrez

TRIBUNAL QUE REALIZO EL EXAMEN GENERAL PRIVADO
EQUIVALENTE AL EJERCICIO PROFESIONAL SUPERVISADO

DECANO:	Dr. Antonio Sandoval
EXAMINADOR:	Ing. Agr. Amílcar Gutiérrez
EXAMINADOR:	Ing. Agr. Luis M. Reyes
EXAMINADOR:	Ing. Agr. José Miguel Leiva
EXAMINADOR:	Ing. Agr. Juan González
SECRETARIO:	Ing. Agr. Carlos R. Fernández

SECTOR PUBLICO AGROPECUARIO Y DE ALIMENTACION
INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA AGRICOLAS

AVENIDA REFORMA 8-60, ZONA 9, EDIFICIO "GALERIAS REFORMA"

3er. NIVEL - TELS 317464 - 318371 - 318809 - 318819

GUATEMALA, C. A.

GG/84- 523
9 de abril de 1984

Ing. César Castañeda
Decano Facultad de Agronomía
Universidad San Carlos de Guatemala
Ciudad

Señor Decano:

Por medio de la presente, informo a usted que en cumplimiento a la designación que me hiciera esa Decanatura, he asesorado al estudiante Guillermo Alberto García Estrada en su trabajo de Tesis titulado: "EVALUACION DEL EFECTO ENZIMATICO DEL HONGO Verticillium hemileiae SOBRE LA Hemileia vastatrix (Berk & Br.) INCITANTE DE LA ROYA DEL CAFETO."

Considero que este trabajo reúne las condiciones y características de un trabajo de investigación original, por lo que me permito recomendar su aprobación para que pueda publicarse.

Atentamente,




Ing. Agr. Astolfo Fumagalli C.
Encargado Despacho
Gerencia General ICTA



INSTITUTO CENTROAMERICANO DE
INVESTIGACION Y TECNOLOGIA INDUSTRIAL
(ICAITI)

CENTRAL AMERICAN RESEARCH INSTITUTE FOR INDUSTRY
Avenida La Reforma 4-47, Zona 10
GUATEMALA, C. A.

COSTA RICA
EL SALVADOR
GUATEMALA
HONDURAS
NICARAGUA

APARTADO POSTAL 1552
Cables: ICAITI
Telex: 5312-ICAITI-GU
TELEFONOS: 310631 y
317466

Ing. César Castañeda
Decano, Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de
Guatemala
Ciudad

Su referencia

Fecha de su carta

Nuestra referencia
IA60/B

Fecha
10 abril 1984

Asunto: Trabajo de tesis

Señor Decano:

En cumplimiento de la honrosa designación que me hiciera su Decanatura, he asesorado al estudiante Guillermo Alberto García Estrada en su trabajo de tesis "Evaluación del efecto enzimático del hongo Verticillium hemileiae sobre la Hemileia vastatrix (Berk & Br) incitante de la roya del cafeto".

A mi parecer el trabajo tiene las características de una investigación original, con lo cual recomiendo su aprobación.

Muy atentamente,

Roberto de León
División de Investigación Aplicada

OFICINAS REGIONALES DEL ICAITI EN:

Cámara de Industrias de
Costa Rica
A.P. 10003, SAN JOSE Costa Rica

Asociación Salvadoreña de
Industriales (ASI)
A.P. 48, SAN SALVADOR El Salvador

Cámara de Industria de
Guatemala
A.P. 214, GUATEMALA Guatemala

Asociación Nacional de
Industriales (ANDI)
A.P. 20-C, TEGUCIGALPA Honduras

Cámara de Industrias de
Nicaragua (CADIN)
A.P. 1436, MANAGUA Nicaragua

Miembro de la Comisión Panamericana de Normas Técnicas, COPANT

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS
DE GUATEMALA



Centro Universitario del Nor-Occidente
"CUNOROC"
Huehuetenango, Apartado Postal N° 68
Guatemala, Centroamérica

Huehuetenango, 15 de febrero de 1984

Ingeniero
Cesar Castañeda
Decano de la Facultad de
Agronomía
Universidad de San Carlos
Ciudad de Guatemala.

Señor Decano:

En atención al nombramiento recibido de esa Decanatura, me --
permito manifestar a usted que he asesorado y revisado el trabajo de
Tesis titulado "EVALUACION DEL EFECTO ENZIMATICO DEL HONGO Vertici--
llum Hemileae sobre la Hemileia vastatrix (Berk & Br.) INCITANTE DE
LA ROYA DEL CAFETO", desarrollado por el estudiante GUILLERMO ALBER--
TO GARCIA ESTRADA.

Concluida la asesoría quiero comunicarle que considero que --
dicha investigación reúne los requisitos para ser aceptada como Té--
sis de grado.

Sin otro particular, me suscribo atentamente.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

Ing. Agr. Santos Benjamín Molina
Asesor.

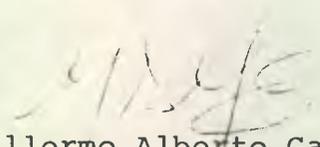
Guatemala, Junio de 1,984

Honorable Junta Directiva

Honorable Tribunal Examinador

En cumplimiento de las normas establecidas por la Universidad de San Carlos de Guatemala, someto a su consideración el trabajo de tesis titulado "EVALUACION DEL EFECTO ENZIMATICO DEL HONGO Verticillium hemileiae SOBRE LA Hemileia vastatrix (Berk & Br.) INCITANTE DE LA ROYA DEL CAFETO", como requisito a optar el título de Ingeniero Agrónomo, en el grado académico de Licenciado en Ciencias Agrícolas.

Atentamente,


Guillermo Alberto García Estrada

Carnet: 56771

DEDICO ESTE ACTO

A DIOS TODO PODEROSO

A MI MADRE: MIRIAM E. VDA. DE GARCIA

A LA MEMORIA DE MI PADRE: GUILLERMO GARCIA GONZALES

A MI ESPOSA: SANDRA ELIZABETH CAMPOLLO DE GARCIA

A LA FAMILIA: SARAVIA GARCIA

A MI BISABUELA: HERMINIA ALMEDA VDA. DE JIMENEZ

A MIS ABUELAS: JUANA J. DE ESTRADA

Y ANTOLINA GONZALEZ

TESIS QUE DEDICO

A MI MADRE

A MI ESPOSA

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A LA FACULTAD DE AGRONOMIA

A LA COMISION MIXTA MEXICO - GUATEMALA PARA LA PRE-
VENCION Y CONTROL DE LA ROYA DEL CAFETO

A MI PATRIA GUATEMALA

A TODOS MIS COMPAÑEROS DE TRABAJO Y EN ESPECIAL A:

MANFREDO MEOÑO

LUIS MENENDEZ

MIGUEL RIVERA

AGRADECIMIENTO

Deseo hacer patente mi agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que en una u otra forma colaboraron en el desarrollo práctico del presente trabajo de tesis y en especial a:

Ing. Agr. Astolfo Fumagalli por encauzarme en el camino de la vida profesional.

Ing. Agr. Werner Schomooock por darme la oportunidad de realizar con toda amplitud el presente trabajo.

Ing. Agr. Orlando Arjona por sus aportaciones para el buen desarrollo del trabajo.

Químico Biólogo Roberto de León por su valiosa participación en la preparación del material biológico.

Ing. Agr. Juan Manuel Herrera por su orientación y tiempo brindados en la parte estadística del trabajo.

Ing. Agr. Francisco Gonzáles por su constante apoyo.

La comisión Mixta México - Guatemala para la prevención y Control de la Roya del Cafeto.

Instituto de Ciencia y Tecnología Industrial de Guatemala, ICAITI.

Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, ICTA.

Asociación Nacional del Café, ANACAFE.

Facultad de Agronomía y al Programa de **Ejercicio
Profesional Supervisado, E.P.S.A.**

RECONOCIMIENTO

A los Ingenieros Agrónomos Astolfo Fumagalli, Werner Schomooock, Benjamín Molina Majano; así como al Licenciado en Biología Roberto de León por su valiosa orientación a todo lo largo del presente estudio.

A mis compañeros de trabajo Jorge Luis Ricci y Edgar Chávez por su ayuda en el desarrollo práctico del mismo.

A Raúl Barrios como personal de campo por su responsabilidad mostrada en el cuidado y mantenimiento del experimento.

R E S U M E N

EVALUACION DEL EFECTO ENZIMATICO DEL HONGO

Verticillium hemileiae SOBRE LA Hemileia vastatrix (Berk & Br.) INCITANTE DE LA ROYA DEL CAFETO

El presente trabajo se diseñó para evaluar bajo condiciones de invernadero el efecto enzimático del hongo V. hemileiae sobre la H. vastatrix .

El trabajo tuvo una duración de 6 meses y constó de 2 etapas. La primera incluyó la fase de inoculación de roya a 20 plantas de café variedad caturra de 9 meses de edad por el método de contacto, uniendo con un clip hojas enfermas de campo con hojas sanas de las plantas. Estas permanecieron bajo condiciones de humedad (cámara húmeda) hasta los 35 días en que se hicieron visibles los síntomas de infección.

Una vez infectado el material se aplicó una solución Buffer o Tampón (Acido Bórico - Bórax) que se empleó como extractante conteniendo la enzima del hongo V. hemileiae. Se evaluaron tres concentraciones de la solución Buffer + enzima, una concentración sin diluir, aplicando 250 cc. de la solución pura, otra diluída con agua destilada en relación 1:1, aplicando 125 cc. de agua y 125 cc. de la solución, y una última diluida en

relación 1:2, aplicando 83 cc. de la solución y 167 cc. de agua destilada. La solución en sus tres diferentes concentraciones se asperjaron con atomizadores manuales sobre el envés de las hojas de 5 plantas de café infectadas, una sola vez y al inicio de la investigación. Se utilizó un diseño completamente al a - zar con 4 tratamientos y 5 repeticiones, dejando un testigo absoluto. De cada repetición se tomaron 5 hojas con roya para el estudio de los factores y variables de respuesta, cada 7 días para hacer un total de 10 lecturas. Los factores considerados para estudio fueron roya activa presente, roya necrosada presen te, roya activa caída y roya necrosada caída. Todos ellos ex - presados en porcentaje de área foliar.

Para los efectos de cuantificación de los resultados y encontrar las diferencias en el control de la roya por cada tra tamiento y proceder a su análisis estadístico matemático, se to mó como referencia la metodología del efecto acumulativo de la enfermedad por el período que duró el ensayo (10 lecturas). Se observó que el tratamiento con la solución sin diluir mostró - los menores porcentajes de severidad del área foliar afectada, seguido por el tratamiento diluído en relación 1:1, 1:2 y testi go respectivamente.

En una segunda etapa y siguiendo el mismo procedimiento

anterior, se evaluó la solución Buffer sola para determinar el efecto independiente de esta. Aunque esta etapa no se inició bajo las mismas condiciones de roya ni en el mismo tiempo que la etapa anterior, los resultados fueron similares y muestran que se pudo inferir que el extracto (enzima + solución buffer) y la solución Buffer sola causaron un efecto degradante sobre la H. vastatrix. Se encontraron en ambas etapas, diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo absoluto.

Lo que nos conduce a rechazar de que existe un efecto enzimático proteolítico del hongo V. hemileiae sobre la H. vastatrix y aceptar un efecto fungicida de la solución Buffer extractante sobre la roya del cafeto.

De esta forma se recomienda continuar con este trabajo, probando otras soluciones extractantes y efectuar pruebas con caldos a base de boratos para conocer su verdadero valor en su posible control de la roya del cafeto.

I N D I C E

CONTENIDO	PAGINA
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	2
III. HIPOTESIS	3
IV. REVISION DE LITERATURA	4
V. ANTECEDENTES	9
VI. MATERIALES Y METODOS	11
1. Materiales	11
2. Métodos	11
VII. METODOLOGIA	13
1. Descripción del Trabajo de Investigación	13
2. Metodología de Análisis	15
VIII. RESULTADOS Y DISCUSION	27
IX. CONCLUSIONES	52
X. RECOMENDACIONES	54
XI. BIBLIOGRAFIA	55
ANEXO	57

I. INTRODUCCION

La roya del cafeto, producida por el hongo Hemileia vastatrix es una enfermedad fungosa que ha llegado a afectar la caficultura del país poniendo en peligro la producción nacional de ese valioso grano. Por ello es necesario emplear medidas de control que ayuden a prevenir o contrarrestar el daño causado por la epifitía. Actualmente se utiliza el control químico auxiliado de prácticas culturales para el control de la roya; sin embargo, se sabe que existen microorganismos en el medio ambiente que tienen influencia biótica negativa sobre el desarrollo de patógenos en general sin afectar a las plantas.

Algunos estudios han demostrado que varias especies del género Verticillium sp, tienen la capacidad de segregar sustancias líticas que penetran las paredes celulares con propiedades características de una enzima, la que es responsable de la desintegración de varios tipos de roya (8).

De las especies estudiadas el hongo Verticillium hemileiae parece ser una de las especies con buena actividad proteolítica y lisogénica específica contra la Hemileia vastatrix.

El presente trabajo se diseñó para evaluar bajo condiciones de invernadero el efecto enzimático del hongo V. hemileiae sobre

la H. vastatrix.

El trabajo tuvo una duración de 6 meses y constó de dos etapas:

La primera incluyó la fase de inoculación de roya y evaluación de la enzima del hongo contenida en una solución buffer o tampón a base de ácido bórico y bórax. Esta etapa se inició el 23 de mayo y se concluyó el 14 de septiembre.

La segunda consistió en evaluar la solución buffer sola para determinar el efecto independiente de esta. Habiéndose iniciado el 19 de agosto y se concluyó el 20 de octubre.

De los resultados obtenidos se presenta una posible nueva alternativa de control y una base para futuras investigaciones sobre la material.

II. OBJETIVOS

General:

- Obtener nuevas opciones de control mediante el uso del hongo Verticillium hemileiae sobre la Hemileia vastatrix.

Específico:

- Determinar el efecto degradante causado por la enzima del hongo V. hemileiae sobre el desarrollo de la roya del ca-

feto en condiciones de invernadero.

- Determinar el efecto fungicida de la Solución Buffer (Acido Bórico + Bórax) sobre la roya del cafeto.

III. HIPOTESIS

Hipótesis Alternativa I:

Existe efecto enzimático proteolítico del hongo V. hemileiae sobre la roya del cafeto H. vastatrix a nivel de invernadero.

Hipótesis Nula I:

No existe efecto enzimático proteolítico del hongo V. hemileiae sobre la roya del cafeto H. vastatrix a nivel de invernadero.

Hipótesis Alternativa II:

Existe un efecto fungicida de la solución Buffer extractante sobre la roya del cafeto.

Hipótesis Nula II:

No existe efecto fungicida sobre la roya del cafeto producida por la solución Buffer.

IV. REVISION DE LITERATURA

De acuerdo a la tendencia corriente en la fitopatología, la resistencia a las enfermedades es un fenómeno dinámico, resultado de la interacción de dos sistemas metabólicos, hospedero y parásito, Muller y Borger citados por Medeiros (10) propusieron que los compuestos fungitóxicos producidos como resultado de la referida interacción y lo cual inhibe el desarrollo de microorganismos patógenos en las plantas fueron llamados fitoalexinas.

El mismo autor plantea que la inhibición inducida en el largo de los tubos germinativos de uredosporas de roya de café por difusión de hojas inoculadas con las diferentes especies de roya variaban entre 50 y 90% de inhibición, de éste modo se indica que las sustancias anti-hongo fueron producidas en las varias asociaciones de café y especies de roya.

Comparativamente, difusiones de hojas inoculadas con razas compatibles de H. vastatrix nunca causaron ninguna inhibición (10).

Recientes estudios mostraron que sobre las uredosporas del hongo Hemileia vastatrix, se desarrollaba un hongo que llegaba a cubrir con un micelio blanco todo el soro y del que no

se conoce su influencia en las posteriores lesiones que se manifiestan en las hojas atacadas por la Roya. Una vez aislado este hongo, se identificó como perteneciente al género Verticillium, presentando unas características semejantes al V. hemileiae (7).

Otro aspecto de importancia en los canales de "control" de este hongo, es que a la vista de los resultados logrados, se han obtenido respuestas semejantes de digestión de las uredosporas de varios tipos de royas. De ello se deduce que este hongo segrega una sustancia lítica que penetra a las paredes celulares, con propiedades características de una enzima, responsable de la desintegración de las uredosporas de Puccinia sp., Melampsora sp. y Hemileia sp. (7), en el caso expresado.

Observaciones realizadas sobre microcultivos de uredosporas en diferentes tiempos de incubación, demostraron que V. hemileiae se desarrollaba bien, utilizando como única fuente de alimento las uredosporas. Según los autores Leal y Villanueva (7) a los tres días y a lo largo de los siguientes, el ataque se hizo más manifiesto, con liberación de parte del contenido interno y desaparición de la membrana, hasta llegar a los catorce días, en que no pudo apreciarse resto alguno de las uredosporas. Asimismo, se pudieron observar que cuando se efectúan inoculaciones pulverizando esporas de V. hemileiae sobre plantas de café sanas,

éstas no sufren ataque alguno por parte de este hongo, lo cual asegura la falta de patogenicidad que el Verticillium ocasiona en la planta y no sobre el hongo. (7)

Estos últimos resultados han sido confirmados por medio de un extenso estudio de actividades enzimáticas de este grupo de hongos, demostrándose que las especies de Verticillium patógenas para las plantas, presentan actividad pectolítica, mientras que las que, como V. hemileiae, son de carácter saprófito no presentan tales actividades. (7)

La presencia de enzimas pertenecientes al grupo de enzimas pectinolíticas han sido mostradas en una gran variedad de organismos fitopatógenos; así mismo, la existencia de enzimas hidrolíticas semejantes han sido mostradas en medios de cultivo de muchos mohos patogénicos, aisladas de esos cultivos y su efecto tóxico en plantas demostrado. La degradación de la pectina de la pared celular, principal sitio de ataque de estas enzimas puede causar marchitamiento y es así como parece ser que su presencia juega parte importante en la producción de síntomas de marchitamiento de muchas enfermedades de plantas. (9)

La producción de enzimas proteolíticas por microorganismos es ampliamente reconocida y algunas se han obtenido de hon-

gos. En un intento por identificar las actividades enzimáticas de los filtrados de los medios de crecimiento de miembros del género Verticillium, se ha notado que filtrados de algunas especies no patogénicas de este grupo de hongos son capaces de destruir proteínas purificadas y bloques de ovalbumina (8).

Estratos en especies no patogénicas de V. hemileiae, y en mucha menos proporción de V. lateritium fueron encontrados para mostrar buena actividad contra fibrinógeno de bovino, albúmina de huevo y caseína. El V. hemileiae fue además capaz de licuar gelatina. Todas las otras especies de Verticillium probadas no mostraron ninguna actividad en las mismas proteínas y no fueron capaces de digerir la gelatina. Esto además denotó que la actividad óptima de especies proteolíticas fueron alcanzadas a un punto definitivo durante el crecimiento que correspondió a la formación inicial de esporas. Los resultados además sugieren que la temperatura óptima para el crecimiento y producción de enzimas fueron entre 25 y 28°C (8).

Se revisó el efecto fungicida de los boratos por considerar que estos podrían interferir en la acción del V. hemileiae, a continuación lo encontrado en la literatura al respecto.

Un efecto fungicida de los boratos como inhibidores del

crecimiento fungoso ha sido evidenciado en la preparación de caldos completos, tales como el caldo Bordales y el caldo Visosa, donde estos compuestos forman parte integrante para que actúe como un fungicida (2).

El ácido bórico y bórax son también usados para el tratamiento post-cosecha de algunos frutales de cítricos, principalmente en el control de pudriciones causadas por Penicillium digitatum (moho verde) y P. italicum (moho azul).(2). Los frutos son inmersos en una solución de 4% de bórax, más 2% de ácido bórico, dejándose de 2 a 4 minutos en solución acuosa y a 38°C (2).

Un efecto fungicida conocido tanto del ácido bórico como bórax son el tratamiento de micosis de la piel generalmente producidas en infantes (11) y el tratamiento fungicida de maderas aserradas respectivamente. (12).

Otro uso que se ha dado además del efecto fungicida que producen, los boratos forman parte de una gran lista de preservativos usados en la industria de productos farmacéuticos y de cosméticos. (11). También se ha utilizado al bórax como un antitéptico suave de amplio uso. (12).

V. ANTECEDENTES

En pruebas preliminares realizadas por la Comisión Roya del Cafeto en la Finca Buena Vista de ANACAFE, se probaron algunos materiales biológicos del hongo V. hemileiae a nivel de invernadero para determinar el efecto inhibitorio sobre la roya del cafeto. Los materiales probados fueron proporcionados por el Instituto de Ciencia y Tecnología Industrial (ICAITI) y extraídos de cepas de Verticillium hemileiae procedentes de la Universidad de Madrid, España. Del cepario se probó micelio recién salido del fermentador, caldo del micelio y una biomasa seca y molida constituida de hojas de café con roya y micelio de Verticillium hemileiae. De estos materiales ninguno resultó tener un efecto inhibitorio sobre la H. vastatrix, no habiéndose observado parasitismo del V. hemileiae sobre la H. vastatrix.

En una segunda prueba, también en forma preliminar se creyó conveniente probar el extracto enzimático proveniente del V. hemileiae, por tener características prácticas sobre el empleo del organismo vivo con fines de parasitismo, ya que el V. hemileiae en forma de conidios está expuesto a los fungicidas que se emplean en la caficultura para control de otras enfermedades y de la propia roya, no así la enzima que es un producto bioquímico insensible a los fungicidas. Sin embargo, para poder emplear la enzima en el control de la roya del cafeto fue necesario

extraerla utilizando una solución Buffer o Tampón con pH 8.5 como se muestra en el anexo; página 58.

La enzima del V. hemileiae contenida en la solución Buffer fue inoculada sobre plantas de almácigo infectadas dentro de un invernadero. A los 8 días de haberse hecho la asperjación del extracto se observó que algunas pústulas de roya presentaban un área necrosada; sin embargo, planta que no fueron asperjadas también empezaron a presentar pústulas necróticas.

Desafortunadamente, las plantas que sirvieron para observación, desde un inicio estuvieron fuertemente infectadas por roya y como consecuencia las pústulas tendieron a necrosarse por muerte natural. Además las condiciones de temperatura prevalentes durante las fechas de observación fueron demasiado altas, condición favorable para la inhibición de la roya.

Por tales razones no se pudo confirmar que la necrosis observada en las plantas tratadas se debió al efecto de la enzima del V. hemileiae. Con el objeto de conocer si realmente existió un efecto enzimático sobre la H. vastatrix se procedió a realizar su evaluación a través del presente trabajo.

VI. MATERIALES Y METODOS

1. Materiales:

- 40 plantas de café variedad Caturra de 9 meses de edad.
- 1 invernadero rústico.
- 1 termómetro de máxima y mínima.
- 1 atomizador manual.
- 1 pipeta de 5 ml.
- 1 pipeta de 1 ml.
- 1 Erlenmeyer de 250 cc.
- 1 galón de agua destilada.
- 1 manguera perforada.
- 1 pliego de polietileno oscuro.
- 1 litro de la solución Buffer conteniendo la enzima.
- 1 litro de la solución Buffer sola.

2. Métodos:

La investigación se realizó en la Finca Buena Vista, propiedad de la Asociación Nacional del Café, localizada en el Municipio de San Sebastián, Departamento de Retalhuleu, y cuya localización por sus coordenadas respecto al meridiano de Greenwich es de 14° 36' 42" Latitud Norte y 91° 38' 30" Longitud Oeste (4).

Las condiciones en las cuales se efectuó el trabajo fueron: Bajo condiciones de invernadero a una altitud de 390 metros sobre el nivel del mar, entre rangos de temperatura que fluctuaron entre 19 y 31 grados centígrados 1/ y condiciones de riego de 3 veces por día.

El experimento constó de 2 etapas, evaluándose los siguientes tratamientos.

CUADRO 1
EVALUACION DEL EFECTO ENZIMATICO DEL
HONGO V. hemileiae SOBRE LA H. vastatrix

TRAT.	PRIMERA ETAPA	SEGUNDA ETAPA	CONCENTRACION	VOLUMEN APLICADO
1	Enzima + Sol. Buffer	Sol. Buffer sola	Original <u>2/</u>	250 cc.
2	Enzima + Sol. Buffer	Sol. Buffer sola	Diluida Rel. 1:1 <u>3/</u>	250 cc.
3	Enzima + Sol. Buffer	Sol. Buffer sola	Diluida Rel. 1:2	250 cc.
4	Testigo	Testigo	Sin aplicación	0.0

1/ Datos de temperatura mínima y máxima tomados a diario.

2/ Concentración original: 3 gr. de biomasa del hongo/900 ml de Buffer.

3/ Todas las diluciones se realizaron con agua destilada.

VII. METODOLOGIA

1. Descripción del Trabajo de Investigación

En su primera etapa se inocularon con roya 20 plantas de café variedad Caturra de 9 meses de edad por el método de contacto, uniendo con un clip hojas enfermas de campo con hojas sanas de las plantas. Seguidamente se colocaron en una cámara húmeda evitando el paso de luz directa con un pliego de polietileno negro para dar ambiente de humedad necesaria por 48 horas. (1)

Para facilitar el ambiente húmedo debió rociarse con agua las paredes de la cámara durante el día. Además se colocó piedrín en el piso para ayudar la evaporación.

Las plantas permanecieron bajo estas condiciones hasta los 35 días en que se hicieron visibles los síntomas de infección.

Una vez infectado el material se aplicó una solución Buffer o Tampón (Acido Bórico + Bórax) conteniendo la enzima del hongo V. hemileiae, 4/. La solución en sus tres diferentes concentraciones, como muestra el cuadro 1, se asperjó con atomizado-

4/ Material proporcionado por el Lic. Roberto de León de la Sección de Microbiología, Div. de Investigación Aplicada, ICAITI.

res manuales, una sola vez y sobre el envez de todas las hojas que poseía cada planta.

Seguidamente las plantas fueron colocadas sobre camas de bambú dentro de un invernadero rústico de plano inclinado.

Para medir el efecto de los tratamientos se utilizó un diseño completamente al azar con 4 tratamientos y cinco repeticiones.

De cada repetición se tomaron cinco hojas con roya para el estudio de los factores y variables de respuesta, cada 7 días para hacer un total de 10 lecturas.

Los factores considerados para estudio fueron: roya activa presente (RAP), roya necrosada presente (RNP), roya activa caída (RAC), y roya necrosada caída (RNC). Todos ellos expresados en porcentajes de área foliar (5). Siendo que la roya activa (RAP) y necrosada (RNP) presente se refieren al área foliar que ocupaba la enfermedad en forma de pústulas activas o necrosadas al momento de la lectura, mientras que la roya activa (RAC) y necrosada caída (RNC) se refiere al área foliar que ocupó la enfermedad en las hojas caídas, entre una fecha de lectura y la siguiente.

Para los efectos de cuantificación de los resultados y encontrar las diferencias en el control de la roya por cada tratamiento y proceder a su análisis estadístico-matemático se tomó como referencia la metodología del efecto acumulativo de la enfermedad (3) por el período que duró el ensayo (10 lecturas). Los análisis de varianza se realizaron cuantificando el área que se obtuvo bajo cada curva como resultado de la acumulación de la enfermedad (6) en donde a mayor área existe mayor infección de la enfermedad.

En una segunda etapa y siguiendo el mismo procedimiento anterior, se evaluó la solución Buffer sola para determinar el efecto independiente de ésta.

2. Metodología de Análisis

Para registrar la información tomada se utilizó una escala de severidad con la cual se expresaba el porcentaje de área foliar afectada por roya activa y porcentaje de área necrosada (5). Dicho de otra forma, cada lesión o pústula de roya ocupó un tamaño del total del área de la hoja y se expresó en porcentaje como se muestra en la figura 1, página 59. Sin embargo, fue necesario considerar de la misma forma el porcentaje de área foliar afectada de roya activa caída (RAC) y el porcentaje

de área necrosada caída (RNC). Ya que el café por efectos de la misma roya, hojas caducas u otras causas defolia en el transcurso del tiempo lo que falsamente reduce la proporción del área foliar afectada. (2).

El área de roya activa (RAP) y necrosada presente (RNP) se contabilizó en el momento de la lectura, mientras que el área de lo caído (RAC y RNC) se calculó por diferencia entre lecturas, obteniéndose el valor para cada repetición de la sumatoria del área foliar, tanto activa como necrosada de todas las hojas presentes, así como de las caídas (ver anexo página 60).

Una vez definidos los factores en estudio se procedió a tabular y ordenar por tratamiento y repetición los datos obtenidos. Para cada tratamiento se obtuvo la sumatoria total de repeticiones por lectura en cada uno de los factores considerados. Como se muestra en el ejemplo del cuadro 10, anexo página 61. De esta forma se obtuvieron los datos presentes y caídos que luego fueron analizados a través de la metodología del efecto acumulativo.

Para fines de análisis, se conoció el efecto de los tratamientos en función de la disminución del área foliar afectada por roya activa. Para ello se consideró el dato de roya total

presente (RTP), roya activa presente (RAP), así como roya total caída (RTC) y roya activa caída (RAC).

A continuación se da un ejemplo sobre la forma de análisis de la metodología del efecto acumulativo del área bajo la curva (Método Kushalappa).

CUADRO 2
HOJA DE ANALISIS
DE LA METODOLOGIA DEL EFECTO ACUMULATIVO
DEL AREA BAJO LA CURVA

TRATAMIENTO: 1 EXPERIMENTO: Enzima + Sol. Buffer

Columnas

Lec- tu- ra	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Datos Presentes		Conteo Caído		Datos Caídos Acumulados		Datos Acumulados		Indice Acum.
	RTP	RAP	RTC	RAC	RTC	RAC	RT ACUM	RA ACUM.	X.
1	84	84	0	0	0	0	84	84	0.47
2	100.5	40.5	0	0	0	0	100.5	40.5	0.23
3	86.5	36.5	50	14	50	14	136.5	50.5	0.28
4	58	28	32	7	82	21	140	49	0.27
5	50	23	13	3	95	24	145	47	0.26
6	55	24.5	5	2	100	26	195	50	0.28
7	59	28	6	3.5	106	29.5	165	57.5	0.32
8	55	27	11	6	117	35.5	172	62.5	0.35
9	52.5	27.5	6	3	123	38.5	175.5	66	0.37
10	52	26	3	3	126	41.5	178	67.5	0.38

RTP = ROYA TOTAL PRESENTE RTC = ROYA TOTAL CAIDA
 RAP = ROYA ACTIVA PRESENTE RAC = ROYA ACTIVA CAIDA
 RNP = ROYA NECROSADA PRESENTE RNC = ROYA NECROSADA CAIDA
 RT ACUM = ROYA TOTAL ACUMULADA RA ACUM = ROYA ACTIVA ACUMULADA
 RTP = RAP + RNP RTC = RAC + RNC

Las columnas 1, 2, 3 y 4 representan los datos presentes y caídos (hojas caídas por defoliación) en el transcurso del experimento que fueron tomados en el momento de la lectura. Las columnas 5 y 6 se obtuvieron de acumular entre lecturas los datos caídos. El valor cero, correspondiente a la primera lectura se debe a que por ser esta la primera no existe aún material caído.

Para la segunda lectura, se sumó la columna 3 de la segunda lectura más la columna 5 de la primera lectura, de igual forma se sumó la columna 4 de la segunda lectura con la columna 6 de la primera lectura y así sucesivamente para cada una de las lecturas restantes.

$$\text{LEC 2 (RTC)} + \text{LEC 1 (RTC)} = \text{LEC 2 (RTC ACUM)}$$

$$\text{LEC 2 (RAC)} + \text{LEC 1 (RAC)} = \text{LEC 2 (RAC ACUM)}$$

Las columnas 7 y 8 corresponden a la suma de las columnas: (1 + 5) y (2 + 6) respectivamente para cada lectura.

$$\text{RTP} + \text{RTC} = \text{RT ACUM}$$

$$\text{RAP} + \text{RAC} = \text{RA ACUM}$$

La columna 9 se obtuvo de dividir el valor de cada lectu-

ra de la columna 8 entre el valor máximo acumulado correspondiente a la columna 7.

$$X. = \frac{RA \text{ ACUM}}{RT \text{ ACUM M\u00e1ximo}}$$

$$\text{Columna 9} = \frac{\text{Columna 8}}{\text{Columna 7}} \text{ --- } X = \frac{84}{178} = 0.47$$

$$X = \frac{40.5}{178} = 0.23; \text{ etc.}$$

Una vez encontrado el \u00cdndice de acumulaci\u00f3n (columna 9) independiente para cada tratamiento se elabor\u00f3 una gr\u00e1fica representando las curvas de severidad de la enfermedad. Seguidamente a cada curva se le determin\u00f3 el Area Bajo la Curva a trav\u00e9s de la siguiente ecuaci\u00f3n:

$$ABC = \sum_{i=1}^n \left[Y_i + n_1 + \frac{Y_i}{2} \right] \times (t_2 - t_1)$$

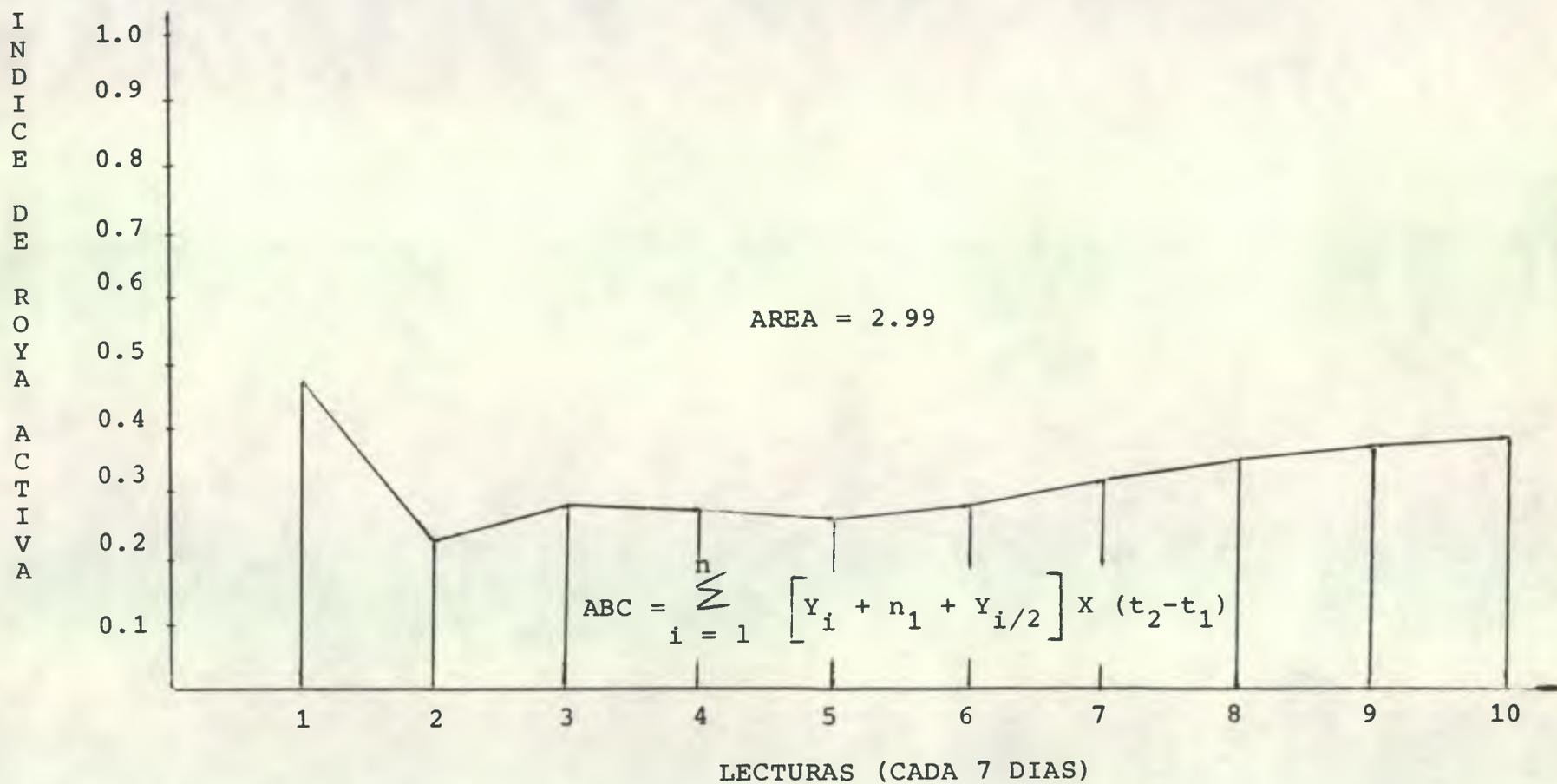
Donde Y_i = Proporci\u00f3n por lectura.

n_1 = N\u00famero total de lecturas.

$Y_{i/2}$ = $\frac{\text{Proporci\u00f3n de lectura}}{2}$

$t_2 - t_1$ = Intervalo de tiempo entre lecturas = 1

GRAFICA 1
 CURVA DE SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD
 DEL AREA BAJO LA CURVA (ABC)
 TRATAMIENTO 1



La curva de severidad de la enfermedad representa el área bajo la curva para cada tratamiento, en donde a mayor área, existe mayor índice de infección de la enfermedad.

Los valores de Area Bajo la Curva se obtuvieron de la siguiente forma:

- Primera Lectura

$$\frac{0 + \text{Lectura 1 de la columna 9}}{2} \times 1 = \frac{0 + 0.47}{2} \times 1$$

$$\frac{0 + X_1}{2} \times 1$$

- Segunda Lectura

$$\frac{\text{Lectura 2 de la columna 9} + \text{Lectura 1 de la columna 9}}{2} \times 1$$

$$\frac{0.23 + 0.47}{2} \times 1; \quad \frac{X_2 + X_1}{2} \times 1$$

Y así sucesivamente hasta llegar a la última lectura.

La sumatoria de los valores obtenidos en cada lectura representó el Area Bajo la Curva (ABC).

De cada repetición se obtuvo el valor de Area Bajo la Curva para realizar el análisis de varianza.

Como parte de la metodología de análisis se elaboraron los histogramas de barras para cada tratamiento. De esta forma se pudo observar la disminución o aumento del área activa de la enfermedad, así como lo que ocurrió con la caída del área activa de roya y la necrosis producida en el transcurso del experimento.

Continuando con el ejemplo, estos se obtuvieron de la siguiente forma:

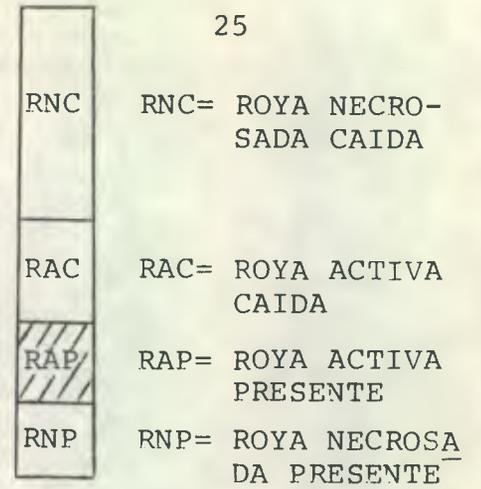
La roya activa presente (RAP), correspondió al valor de la columna 2 de la hoja de análisis (cuadro 2) y la roya necrosada presente (RNP) a la diferencia existente entre los valores de roya total presente menos roya activa presente (columna 1 - columna 2), para cada lectura. $RTP - RAP = RNP$.

Los valores de roya activa caída (RAC) y necrosada (RNC) caída fueron dibujados en el histograma luego de acumular los datos caídos.

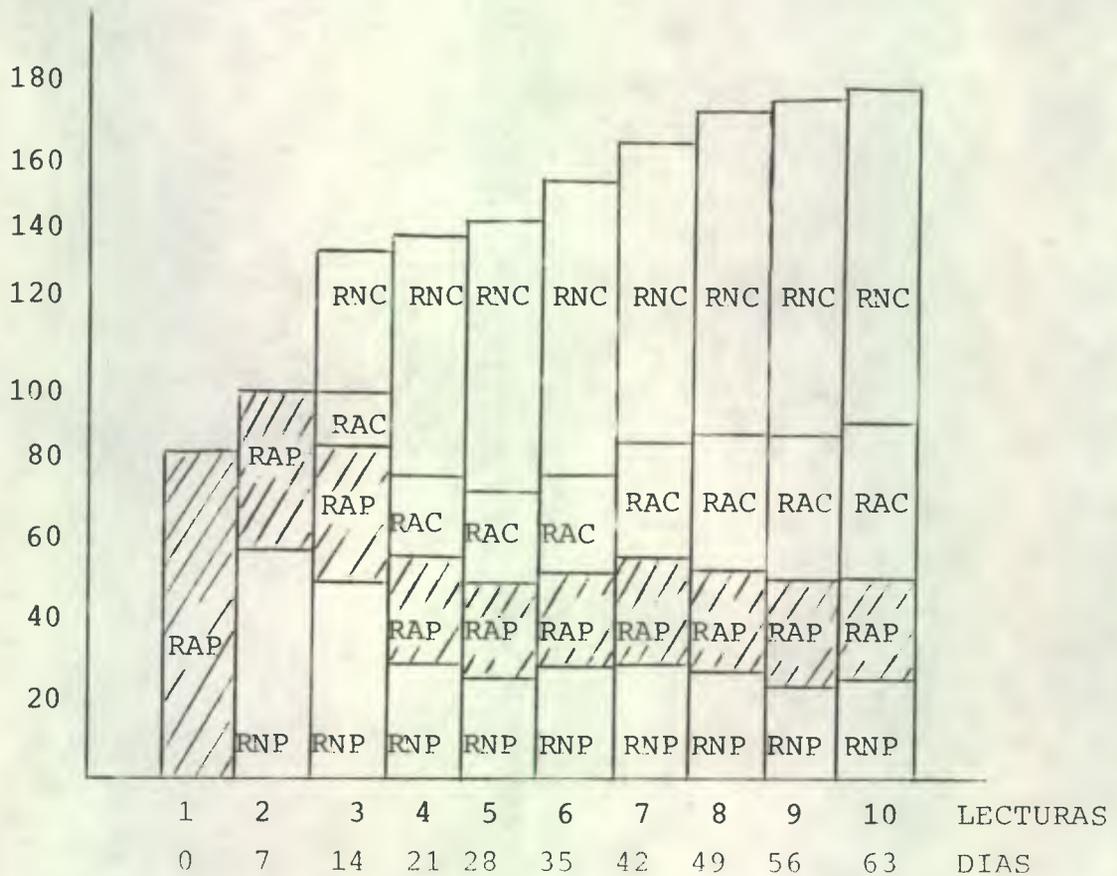
Siendo que en la roya activa caída (RAC) correspondió al valor de la columna 6 y la roya necrosada caída (RNC) a la diferencia de la roya total caída acumulada menos la roya activa caída acumulada. (Columna 5 - Columna 6). $RTC ACUM - RAC ACUM = RNC$.

Para cada tratamiento se elaboró un histograma de barras, teniendo de esta forma una idea más clara de lo ocurrido con el área foliar.

GRAFICA 2
 TRATAMIENTO 1
 ENZIMA + SOL. BUFFER



%
 S
E
V
E
R
I
D
A
D
A
R
E
A
F
O
L
I
A
R



Como se puede observar en la gráfica 2, página 25, el valor máximo del porcentaje de severidad del área foliar es mayor del 100%, (178) esto se debe a que se tomaron los valores de severidad totales de las cinco repeticiones por tratamiento, tanto de los datos presentes como de los caídos y a su vez fueron acumulados en el transcurso del tiempo (entre lecturas) por medio de la metodología del efecto acumulativo. Además, el porcentaje a que se refiere tal escala, es un porcentaje de severidad y no un porcentaje referido al 100% como valor máximo.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSION

A continuación se presentan los resultados obtenidos a lo largo del experimento y para cada una de las dos etapas de que constó independientemente. Evaluándose en la primera etapa el efecto enzimático del hongo V. hemileiae y en la segunda el efecto de la solución Buffer sola. Para evaluar el efecto enzimático del V. hemileiae fue necesario utilizar una solución Buffer con pH de 8.5 (extracto). Durante la evaluación del extracto y después de observar los primeros resultados negativos sobre la roya surgió la interrogante de si realmente era la enzima del hongo la que estaba actuando o la solución Buffer. Sin embargo, no se pudo comprobar a nivel de laboratorio si tal enzima fue realmente extraída de la solución. Como consecuencia de ello se decidió probar la solución Buffer sola siguiendo el procedimiento empleado para la evaluación de la enzima.

Para los efectos de cuantificación de los resultados y encontrar las diferencias en el control de la roya para cada tratamiento y proceder a su análisis estadístico-matemático se tomó como referencia la metodología del efecto acumulativo del área bajo la curva por el período que duró el ensayo.

El cuadro 3 de la página 30 muestra en la primera lectura que el tratamiento 1 (sin dilución) y el tratamiento 4 (testigo) se iniciaron con la mayor severidad de roya activa (columna 2), mientras que el tratamiento 2 y 3 con severidades menores muy similares. Sin embargo, en el tratamiento 1 para la segunda lectura, a los 7 días, la roya activa descendió a más del 50% y simultáneamente el tratamiento 2 también sufrió disminución, aunque más o menos del 25%, lo que sugiere el apareamiento de áreas necróticas sobre la roya activa. A partir de la tercera lectura ambos tratamientos mostraron ligeros incrementos y decrementos de área activa, hasta la lectura No.7 (42 días). A partir de ésta y hasta el final sus valores se mantuvieron casi constantes y sin variación. Contrariamente los tratamientos 3 y 4, con mayor dilución y testigo respectivamente presentaron desde su inicio hasta las lecturas 6 y 7 (35 y 42 días) respectivamente aumentos de roya activa. Las lecturas restantes (7, 8, 9 y 10) para cada tratamiento presentaron considerables disminuciones de ésta como producto de una alta defoliación, debido al incremento de la severidad de roya activa a que fueron expuestos.

Según los datos caídos (severidad caída), columna 3 el testigo es el primero en presentar defoliación seguido del tratamiento 1, 2 y 3. Sin embargo, a partir de la lectura 3

(14 días), el tratamiento 1 resulta ser el de mayor datos caídos, y debido a que se trata de un efecto acumulativo (columna 5) éste alcanza la mayor caída de datos en la lectura 6 (35 días). Luego a partir de la séptima lectura (42 días), es el tratamiento 4 que aparece con la mayor cantidad de datos caídos, hasta el final. Por su lado los tratamientos 2 y 3 presentan, el primero, una mayor cantidad de datos caídos desde la tercera lectura hasta la número 8 mientras que el tratamiento 3 es hasta la lectura 8 que presenta mayor cantidad de datos caídos.

Con respecto a los índices de severidad (columna 9) a través de estos se estableció en el transcurso del tiempo la diferencia entre tratamientos, así como el área bajo la curva correspondiente para cada uno, dejando al número 1 con menor severidad de roya activa seguido por el 2, 3 y 4 respectivamente.

CUADRO 3
EFECTO ACUMULATIVO DEL AREA FOLIAR
AFECTADA POR ROYA ACTIVA
Enzima + Sol. Buffer

		Columnas								
Lec- tu- ra No.	Tra- ta- mien- to	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		DATOS PRESENTES		CONTEO CAIDO		DATOS CAIDOS ACUMULADOS		DATOS ACUMULADOS		INDICE
		RTP	RAP	RTC	RAC	RTC	RAC	RT ACUM	RA ACUM	X.
1	1	84	84	0	0	0	0	84	84	0.47
	2	44.5	44.5	0	0	0	0	44.5	44.5	0.28
	3	45	45	0	0	0	0	45	45	0.22
	4	95	95	0	0	0	0	95	95	0.29
2	1	100.5	40.5	0	0	0	0	100.5	40.5	0.23
	2	54	34.5	0	0	0	0	54	34.5	0.22
	3	52.5	48	0	0	0	0	52.5	48	0.23
	4	108	108	12	12	12	12	120	120	0.36
3	1	86.5	36.5	50	14	50	14	136.5	50.5	0.28
	2	75	38.5	5	2	5	2	80	40.5	0.25
	3	70	52	0	0	0	0	70	52	0.25
	4	146.5	146.5	0	0	12	12	158.5	158.5	0.47
4	1	58	28	32	7	82	21	140	49	0.27
	2	73.5	37.5	13	4	18	6	91.5	43.5	0.27
	3	82.5	57	0	0	0	0	82.5	57	0.28
	4	123.5	123.5	24	24	36	36	159.5	159.5	0.48
5	1	50	23	13	3	95	24	145	47	0.26
	2	70	39.5	20	10	38	16	108	55.5	0.35
	3	90	71	11	3	11	3	101	74	0.36
	4	127.5	127.5	41	41	77	77	204.5	204.5	0.61
6	1	55	24.5	5	2	100	26	155	50	0.28
	2	79	39.5	17	12	55	28	134	67.5	0.42
	3	109.5	84.5	10	10	21	13	130	97.5	0.48
	4	169	169	15	15	92	92	261	261	0.78
7	1	59	28	6	3.5	106	29.5	165	57.5	0.32
	2	54	30.5	33	15	88	43	142	73.5	0.46
	3	120	101.5	19	12	40	25	160	126.5	0.62
	4	155.5	155.5	55	55	147	147	302.5	302.5	0.91
8	1	55	27	11	6	117	35.5	172	62.5	0.35
	2	43.5	27.5	16	5	104	48	147.5	75.5	0.47
	3	109.5	81	36	36	76	61	185.5	142	0.69
	4	137	137	44	44	191	191	328	328	0.98
9	1	52.5	27.5	6	3	123	38.5	175.5	66	0.37
	2	50.5	33.5	0	0	104	48	154.5	81.5	0.51
	3	89.5	71	35	20	111	81	200.5	152	0.74
	4	48	48	92	92	283	283	331	331	0.99
10	1	52	26	3	3	126	41.5	178	67.5	0.38
	2	44.5	28.5	11	7	115	55	159.5	83.5	0.52
	3	55	48.5	39	27	150	108	205	156.5	0.76
	4	33	33	17	17	300	300	333	333	1.00

RTP = ROYA TOTAL PRESENTE	RTC = ROYA TOTAL CAIDA
RAP = ROYA ACTIVA PRESENTE	RAC = ROYA ACTIVA CAIDA
RNP = ROYA NECROSADA PRESENTE	RNC = ROYA NECROSADA CAIDA
RT ACUM = ROYA TOTAL ACUMULADA	RA ACUM = ROYA ACTIVA ACUMULADA
RTP = RAP + RNP	RTC = RAC + RNC

En el cuadro 4 correspondiente a la evaluación de la solución Buffer nos muestra en su inicio que los 3 primeros tratamientos comenzaron con una cantidad de roya activa bastante similar, exceptuando al testigo que se inició con un 50% menos aproximadamente. La razón de ello obedeció a que las plantas utilizadas en este tratamiento contaron con un número menor de hojas para estudio. Sin embargo, el índice de severidad (columna 9) para este tratamiento se incrementó en el transcurso del tiempo más que los otros 3. Esto se debe a que el análisis es referido al dato de mayor roya total acumulada (columna 7) independiente para cada tratamiento, lo que hace que sea una relación proporcional con los datos acumulados de roya activa (columna 8).

Al igual que en la etapa anterior, el tratamiento 1, a los 7 días de efectuada la aplicación de la solución Buffer, muestra un ligero descenso de la roya activa y como consecuencia el apareamiento de las primeras áreas necróticas que por diferencia de la roya total presente (columna 1) con la roya activa presente (columna 2) se obtienen. El tratamiento 2 no muestra descenso de roya activa en la segunda lectura; sin embargo, por la diferencia existente entre los datos presentes totales y activos se presentan las primeras áreas necróticas sobre la roya activa. Los tratamientos 3 y 4 muestran incre-

mentos desde el principio (lectura 1) hasta la lectura 4 y 7 respectivamente, empezando a sufrir a partir de éstas, disminución por caída de datos.

De la misma forma que se presentó caída de datos en la etapa anterior, el tratamiento 1 es quien muestra la mayor severidad caída a partir de la lectura 3 seguido por el 2 y 3 hasta la lectura 7. Siendo posteriormente el tratamiento 3 debido al efecto acumulativo (columna 5) el que aparece con la mayor caída de datos. El tratamiento 4 no obstante a partir de la quinta lectura empieza a sufrir una fuerte caída de severidad, aproximadamente del 40% con que se encuentra en este momento. Tanto para el tratamiento 3 y 4 la caída de los datos se debe a los fuertes aumentos de roya activa que se han producido en el transcurso del tiempo.

Los datos presentes y caídos, independientemente en cada tratamiento tienden a mantenerse estables a partir de la séptima lectura (42 días), con lo que se deduce que los efectos de los tratamientos son evidentes hasta esta fecha.

CUADRO 4
EFECTO ACUMULATIVO DEL AREA FOLIAR
AFECTADA POR ROYA ACTIVA
Sol. Buffer Sola

		Columnas								
Lec- tu- ra No.	Tra- ta- mien- to	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		DATOS PRESENTE		CONTEO CAIDO		DATOS CAIDOS ACUMULADOS		DATOS ACUMULADOS		INDICE
		RTP	RAP	RTC	RAC	RTC	RAC	RT ACUM	RA ACUM	X_1
1	1	86.5	86.5	0	0	0	0	86.5	86.5	0.45
	2	90	90	0	0	0	0	90	90	0.47
	3	96.5	96.5	0	0	0	0	96.5	96.5	0.46
	4	45	45	0	0	0	0	45	45	0.41
2	1	125.5	81.5	0	0	0	0	125.5	81.5	0.42
	2	117	93	0	0	0	0	117	93	0.49
	3	117	109.5	0	0	0	0	117	109.5	0.52
	4	54	54	0	0	0	0	54	54	0.49
3	1	115	59	40	26	40	26	155	85	0.44
	2	109	86	26	20	26	20	135	106	0.56
	3	116.5	101.5	25	25	25	25	141.5	126.5	0.60
	4	65	65	0	0	0	0	65	65	0.59
4	1	79.5	31.5	47	25	87	51	166.5	82.5	0.43
	2	127	83	9	4	35	24	162	107	0.56
	3	117	87	7	4	32	29	149	116	0.56
	4	80	80	0	0	0	0	80	80	0.73
5	1	36.5	15.5	47	18	134	69	170.5	84.5	0.44
	2	84	47	52	37	87	61	171	108	0.57
	3	136.5	102.5	10	0	42	29	178.5	131.5	0.63
	4	61	61	25	25	25	25	86	86	0.79
6	1	37.5	17.5	6	3	140	72	177.5	89.5	0.47
	2	68	39	22	9	109	70	177	109	0.58
	3	64.5	54.5	84	56	126	85	190.5	139.5	0.67
	4	68	68	0	0	25	25	93	93	0.85
7	1	38.5	18.5	4.5	0.5	144.5	72.5	183	91	0.47
	2	39	20	31	16	140	86	179	106	0.56
	3	40	29	30	30	156	115	196	144	0.69
	4	46.5	46.5	31	31	56	56	102.5	102.5	0.94
8	1	42.5	22.5	0	0	144.5	72.5	187	95	0.49
	2	43	20	0	0	140	86	183	106	0.56
	3	45	33	0	0	156	115	201	148	0.71
	4	39	39	9	9	65	65	104	104	0.95
9	1	39.5	16.5	7	7	151.5	79.5	191	96	0.50
	2	47.5	20.5	0	0	140	86	187.5	106.5	0.56
	3	50	37	0	0	156	115	206	152	0.73
	4	34	34	8	8	73	73	107	107	0.98
10	1	40.5	16.5	0	0	151.5	79.5	192	96	0.50
	2	49.5	20.5	0	0	140	86	189.5	106.5	0.56
	3	32	27	21	13	177	128	209	155	0.74
	4	36	36	0	0	73	73	109	109	1.00

RTP	=	ROYA TOTAL PRESENTE	RTC	=	ROYA TOTAL CAIDA
RAP	=	ROYA ACTIVA PRESENTE	RAC	=	ROYA ACTIVA CAIDA
RNP	=	ROYA NECROSADA PRESENTE	RNC	=	ROYA NECROSADA CAIDA
RT ACUM	=	ROYA TOTAL ACUMULADA	RA ACUM	=	ROYA ACTIVA ACUMULADA
RTP	=	RAP + RNP	RTC	=	RAC + RNC

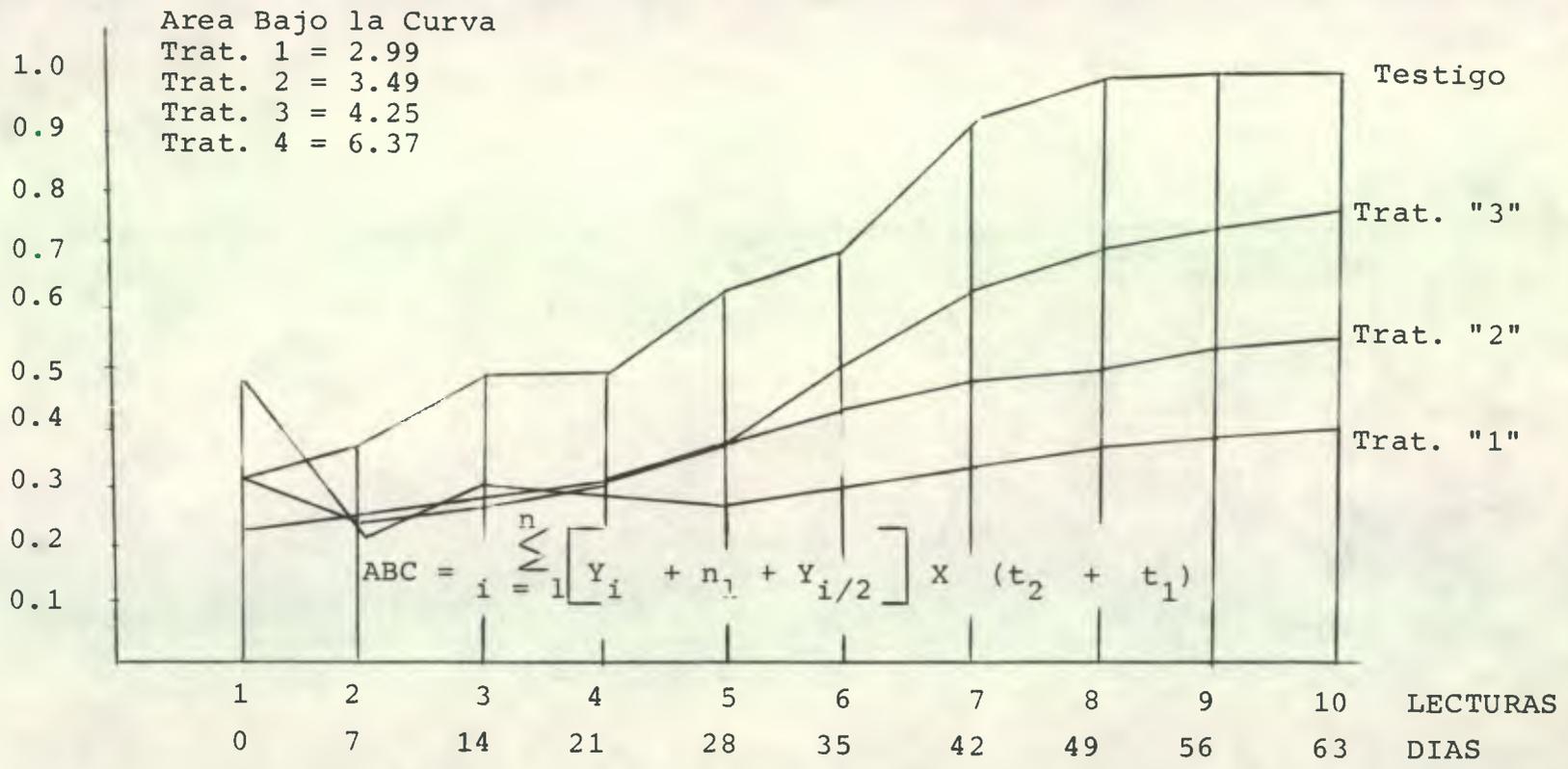
Una vez obtenido los índices de acumulación de la enfermedad se procedió a elaborar las curvas de severidad y determinar su área, por medio de la cual se estableció la diferencia entre los tratamientos.

Las curvas de severidad de roya activa, gráfica 3 página 35 y 4 página 36 muestran el comportamiento y la diferencia existente entre tratamientos en el transcurso del tiempo, diferencia que se debe a la disminución o aumento del área activa. Siendo para ambas etapas, el tratamiento 1 el que presenta la menor área bajo la curva y como consecuencia los menores índices de roya activa referidos al de mayor severidad, seguido por el 2 y 3. El 4 correspondiente al tratamiento testigo fue siempre el que presentó los mayores índices de severidad teniendo un área mayor bajo la curva; lo que significa que a mayor área mayor enfermedad.

Aunque la segunda etapa no se inició bajo las mismas condiciones de roya en el mismo tiempo que la etapa anterior los resultados muestran que se pudo inferir que el extracto y la solución Buffer Sola causaron un efecto degradante sobre la H. vastatrix.

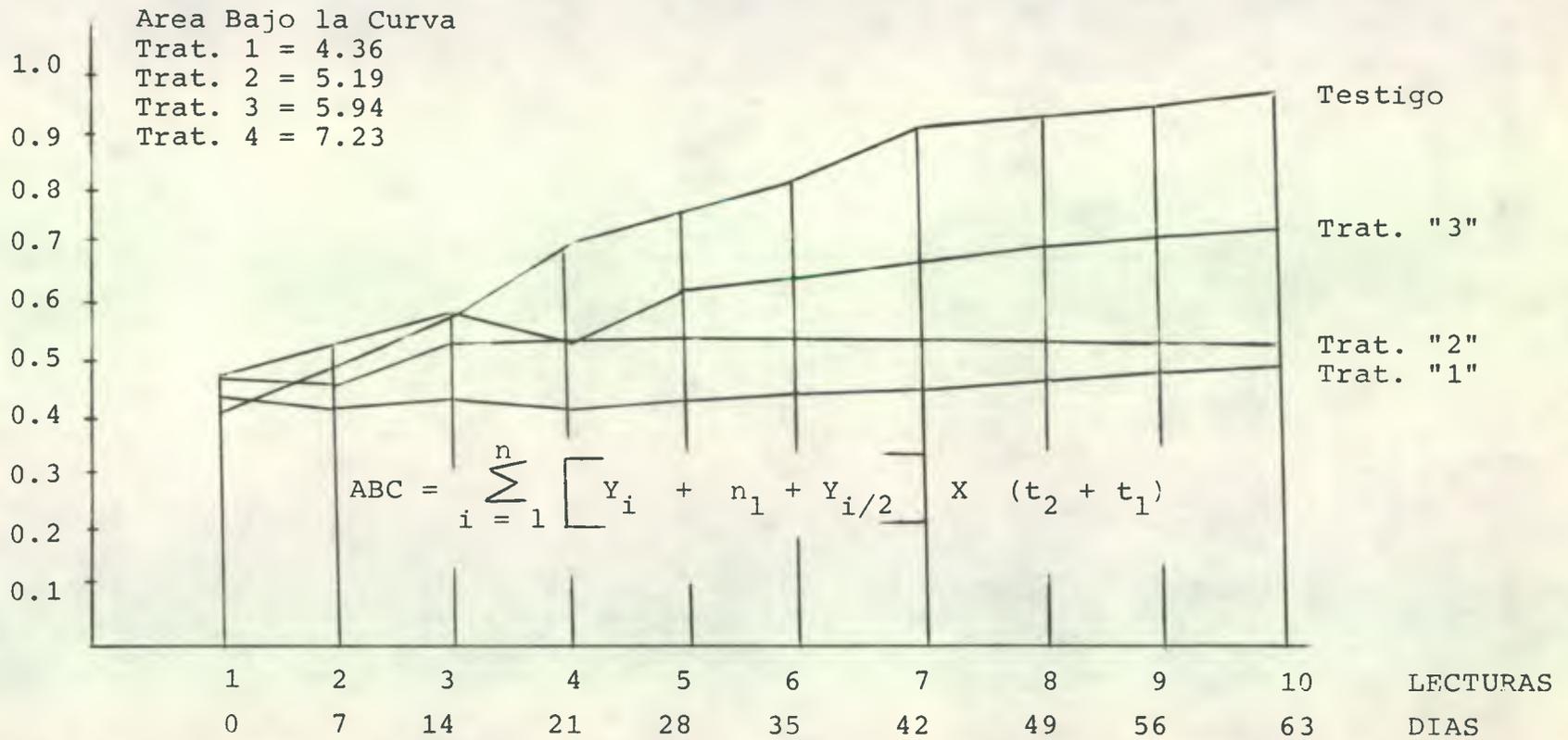
GRAFICA 3
 CURVAS DE SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD DEL
 AREA BAJO LA CURVA
 ENZIMA + SOL. BUFFER

INDICE DE ROYA ACTIVA



GRAFICA 4
 CURVAS DE SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD
 DEL AREA BAJO LA CURVA
 SOLUCION BUFFER SOLA

INDICE DE ROY A ACTIV A



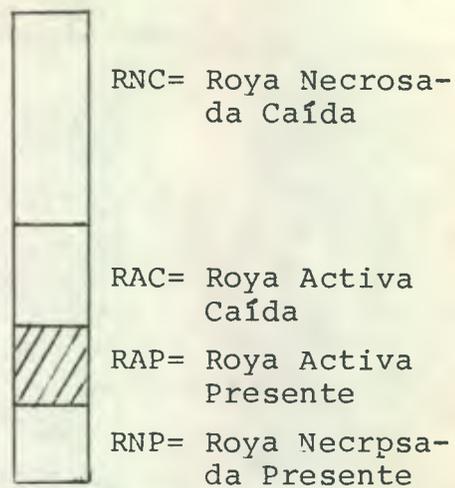
Como parte de la metodología de análisis se elaboraron los histogramas de barras para cada tratamiento. De esta forma se pudo observar la disminución o aumento del área activa de la enfermedad, así como lo que ocurrió con la caída del área activa de roya y la necrosis producida en el transcurso del experimento.

Se observa a través de los histogramas, Pág. 39-46 para ambas etapas, que el área correspondiente a la roya necrosada fue mayor a medida que las diluciones efectuadas fueron menores. Así mismo se puede ver que la disminución de roya activa se manifestó a los 7 días de lectura como producto de las áreas necrosadas presentes, las que se terminaron de reducir por efecto de la caída de hojas. De la misma forma observamos que los tratamientos más concentrados, como el 1 y 2 presentaron fuertes defoliaciones como producto del área foliar necrosada. Contrariamente el tratamiento mayormente diluído, 3 y el testigo, mostraron que la defoliación ocurrida se debió al área de roya activa que se incrementó fuertemente desde su inicio hasta los 42-49 días, empezando a sufrir como consecuencia la fuerte defoliación. Además se puede observar a través de estos que después de los 60 días la información no afecta los resultados ya obtenidos. Debido esto a que en la mayoría de los casos el efecto de la aplicación tiende a tener un comportamiento bastante estable, no solo por la poca presencia de roya en las hojas presentes, sino

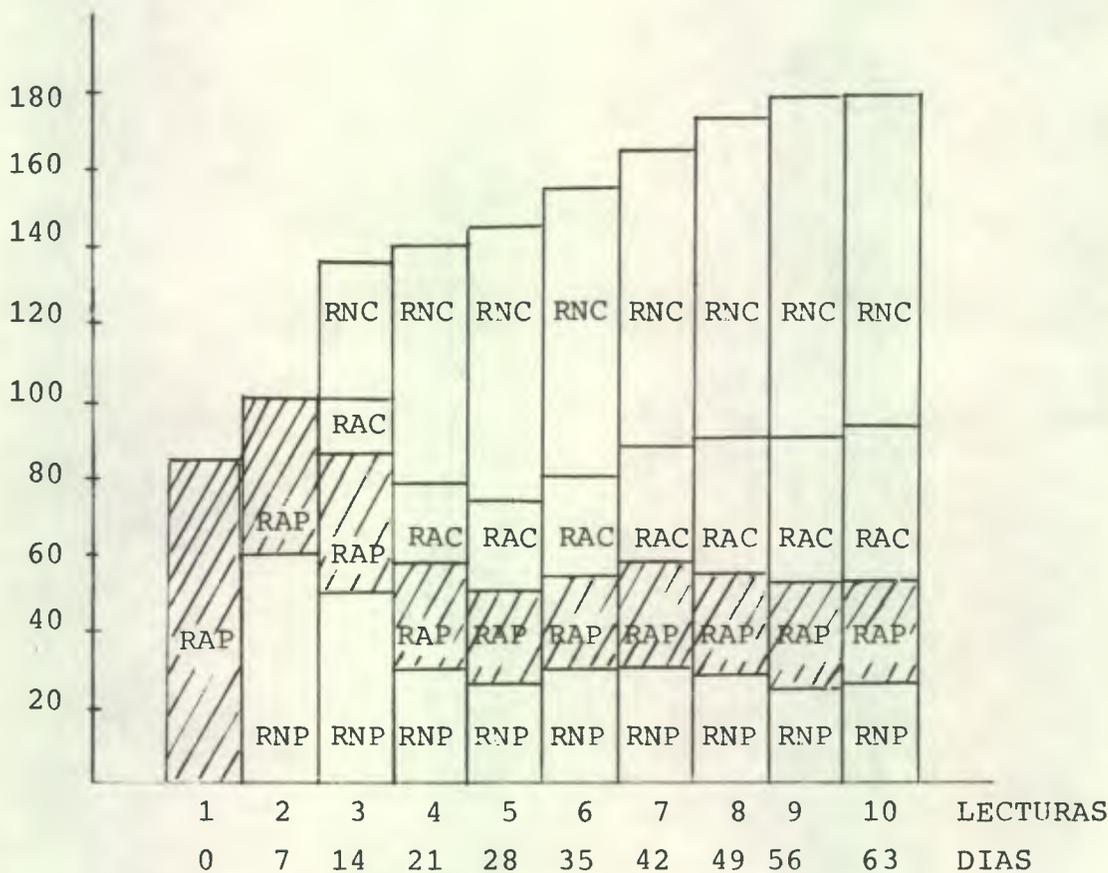
por el efecto de la misma defoliación ocurrida.

Para el caso de los tratamientos testigo, por quedar sin aplicación no se consideró el área foliar necrosada para fines de análisis. Sin embargo, se presentaron áreas necrosadas a lo largo del experimento como consecuencia del proceso de muerte natural de la roya, tomándose el área activa y necrosada como total y activa a la vez.

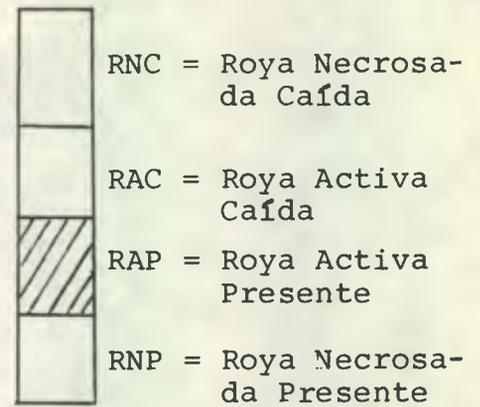
GRAFICA 5
 TRATAMIENTO "1"
 ENZIMA + SOL. BUFFER



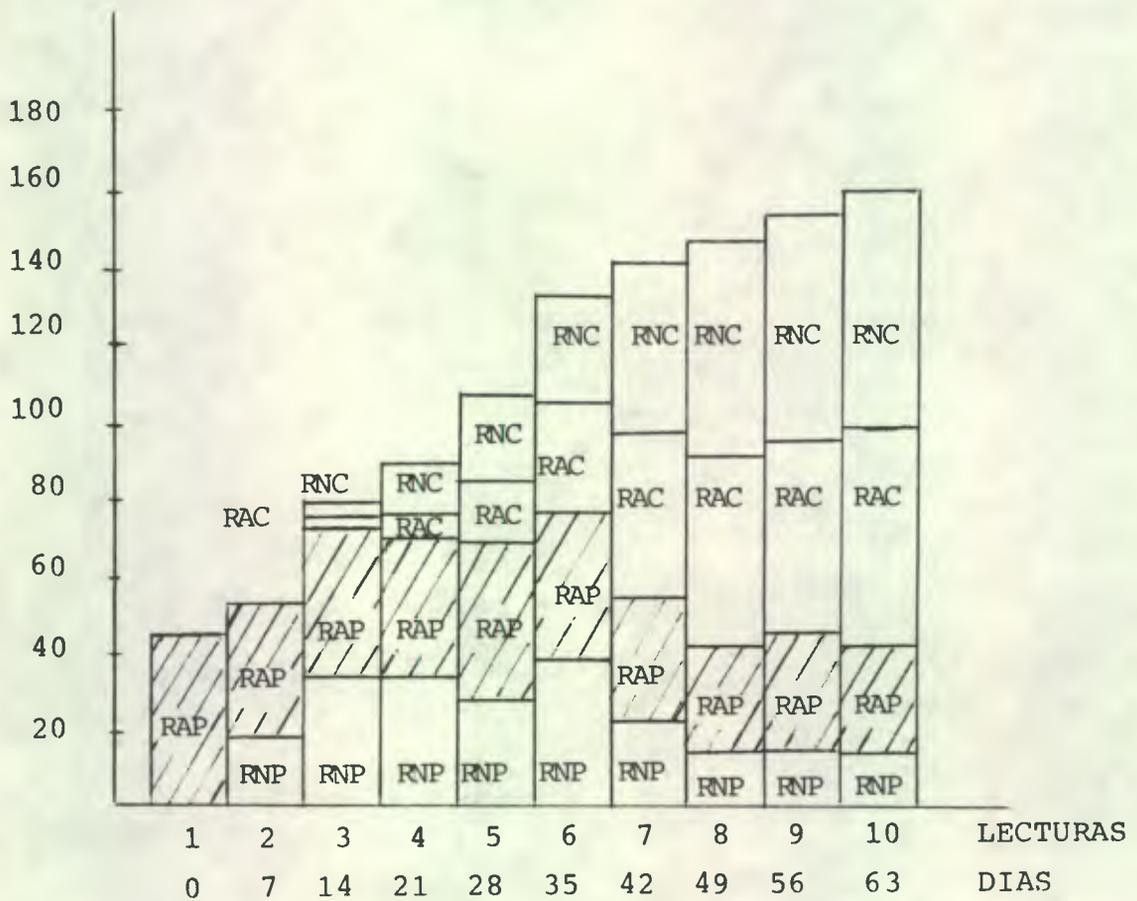
SEVERIDAD
 AREA
 FOLIAR



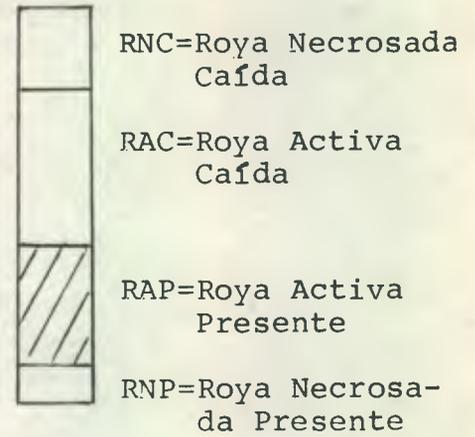
GRAFICA 6
 TRATAMIENTO "2"
 ENZIMA + SOL. BUFFER



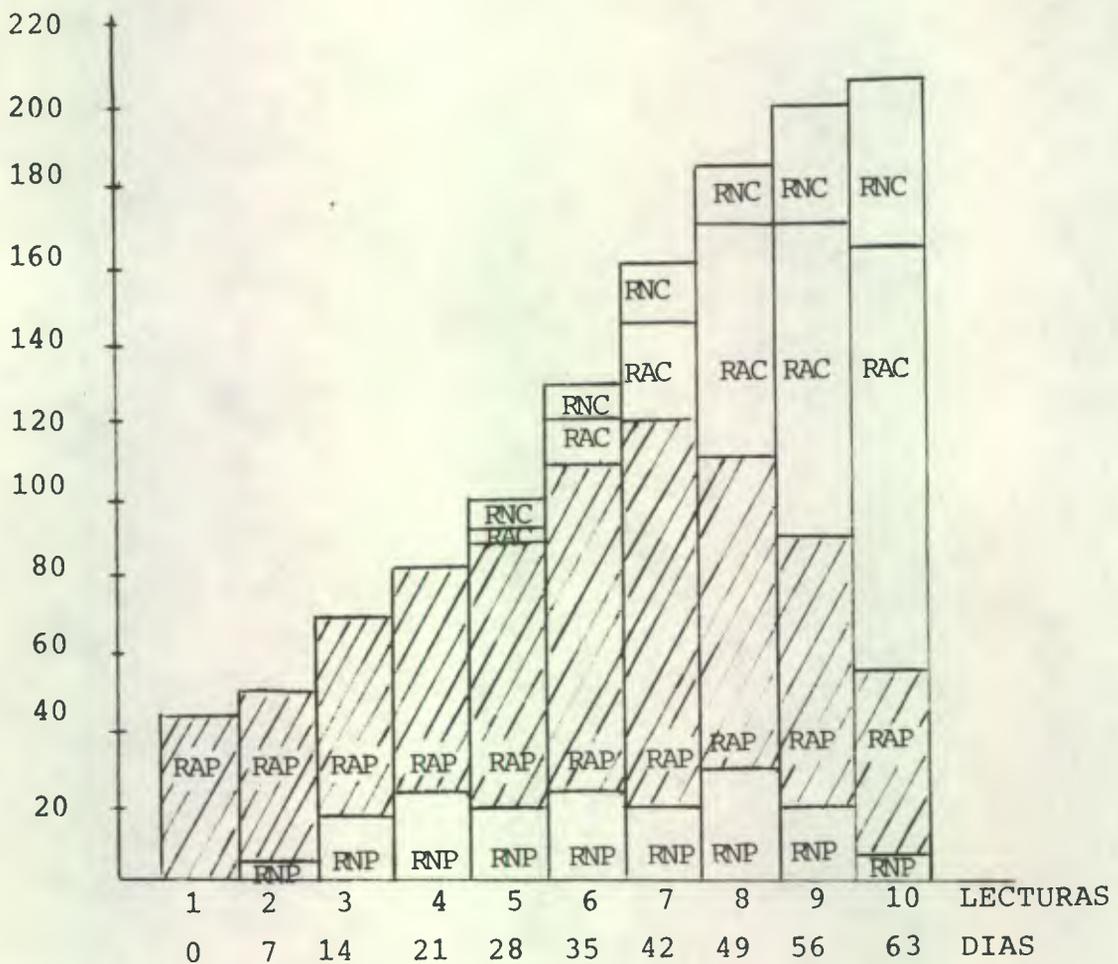
SEVERIDAD
 AREA
 FOLIAR



GRAFICA 7
 TRATAMIENTO "3"
 ENZIMA + SOL. BUFFER

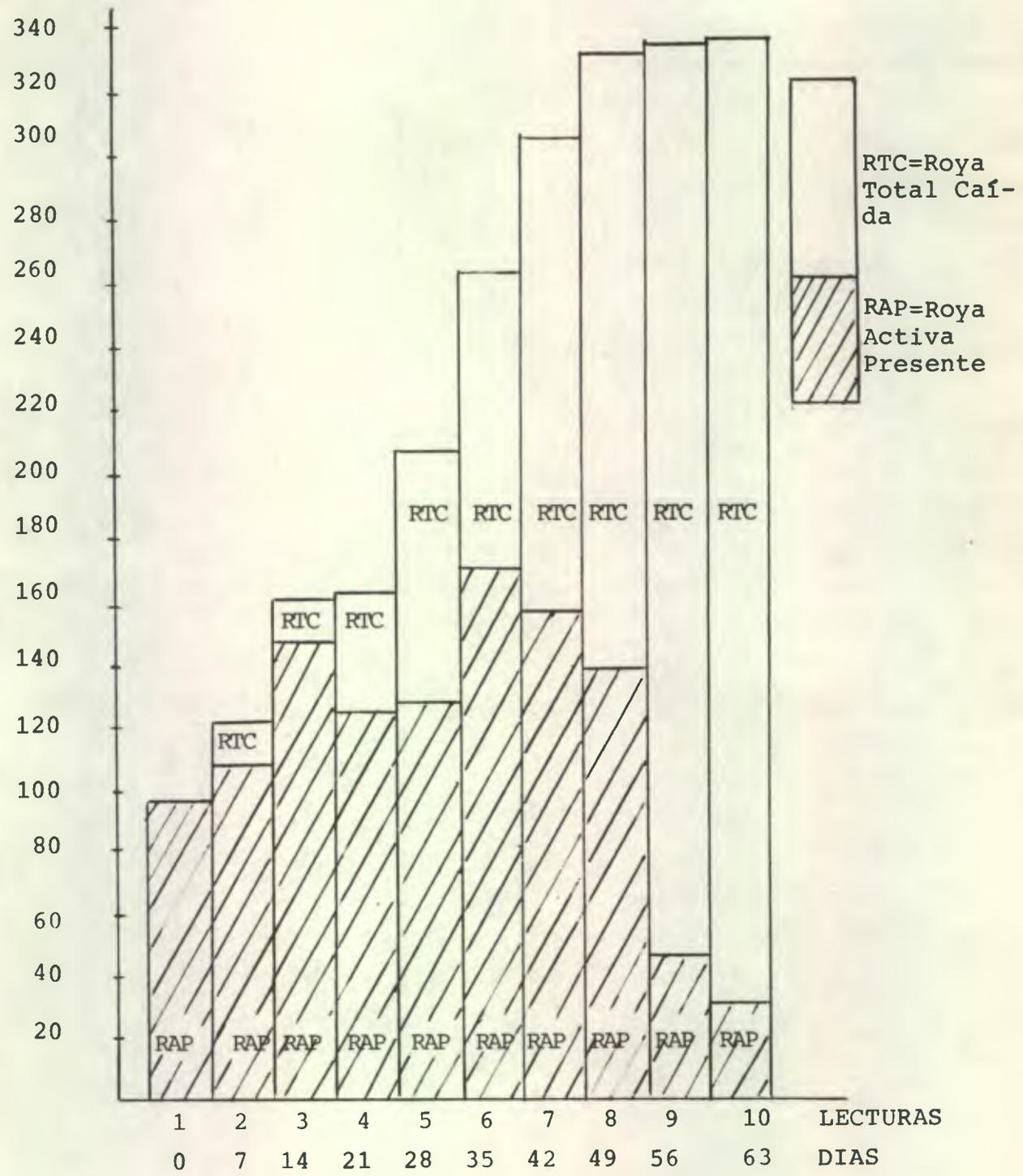


SEVERIDAD
 AREA
 FOLIAR



GRAFICA 8
TESTIGO
ENZIMA + SOL. BUFFER

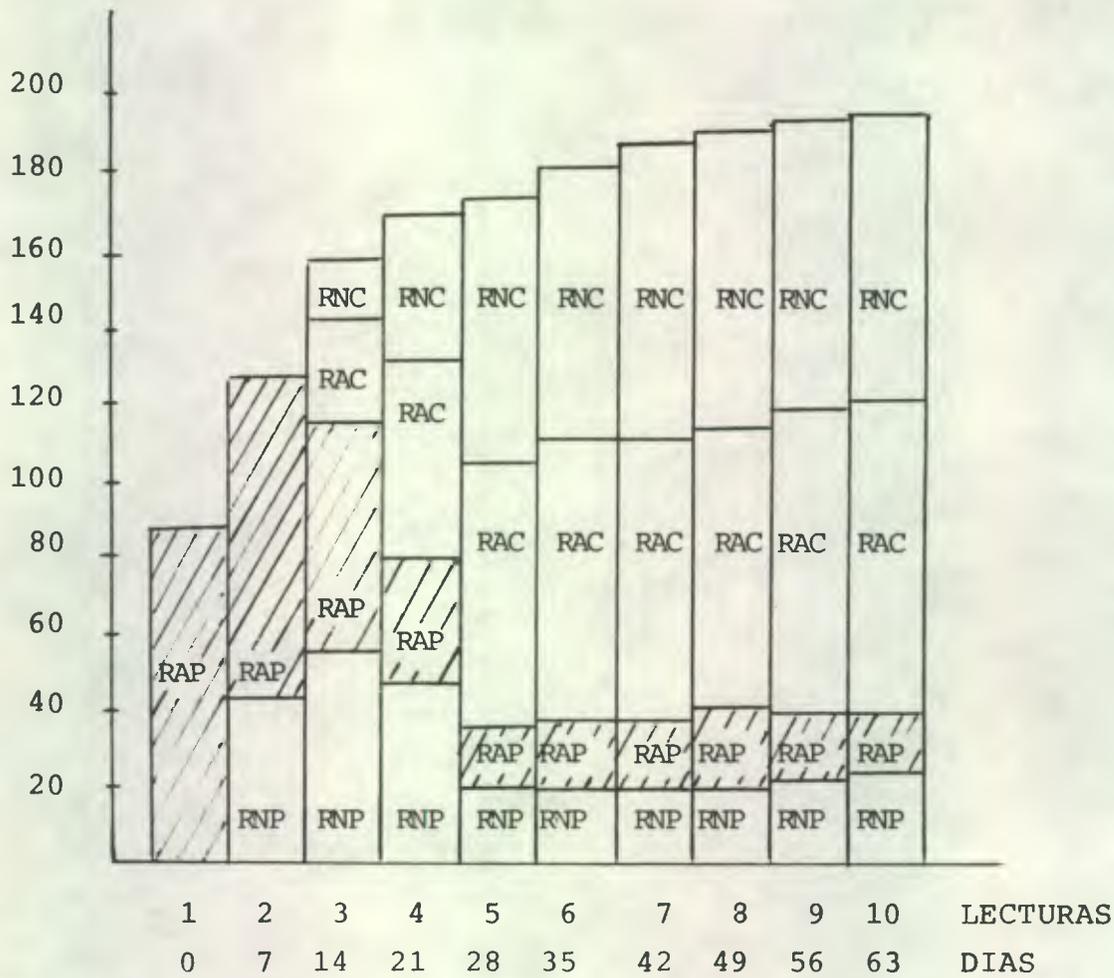
SEVERIDAD
AREA
FOLIAR



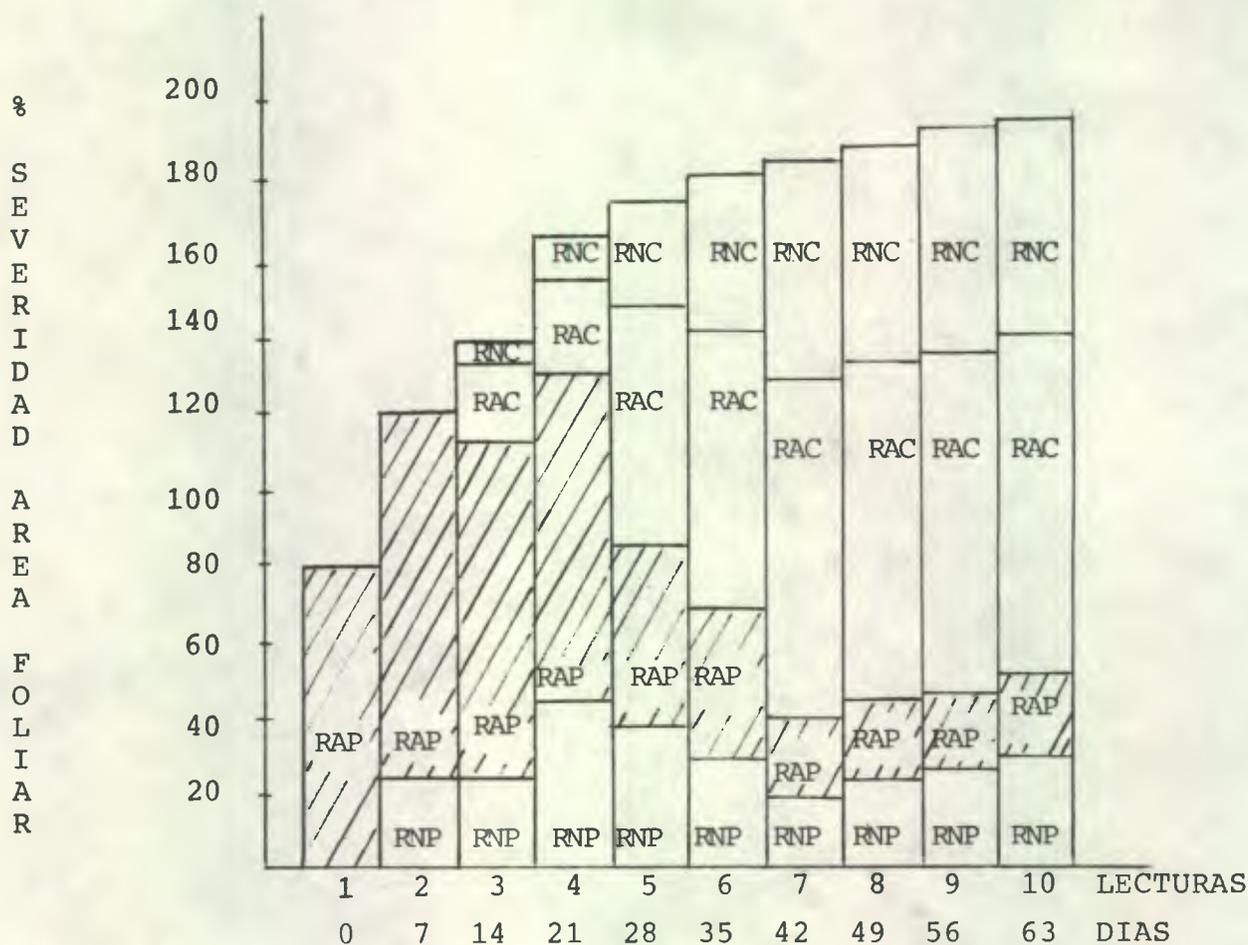
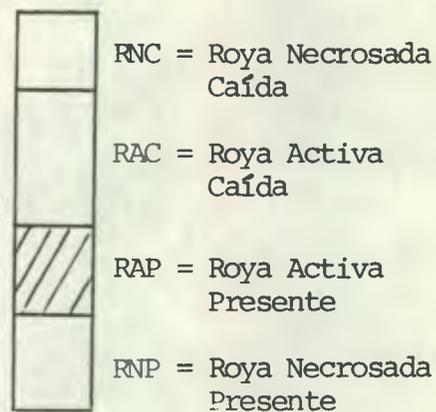
GRAFICA 9
 TRATAMIENTO "1"
 SOLUCION BUFFER SOLA



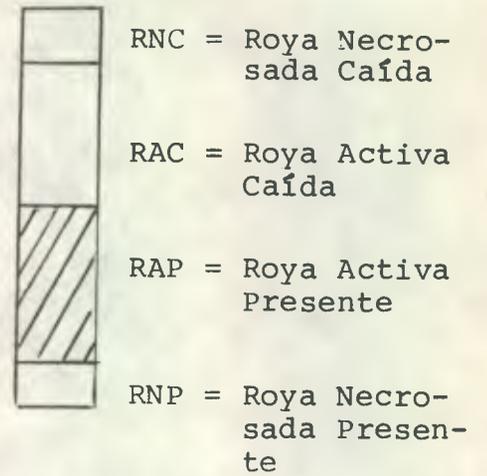
SEVERIDAD
 AREA
 FOLIAR



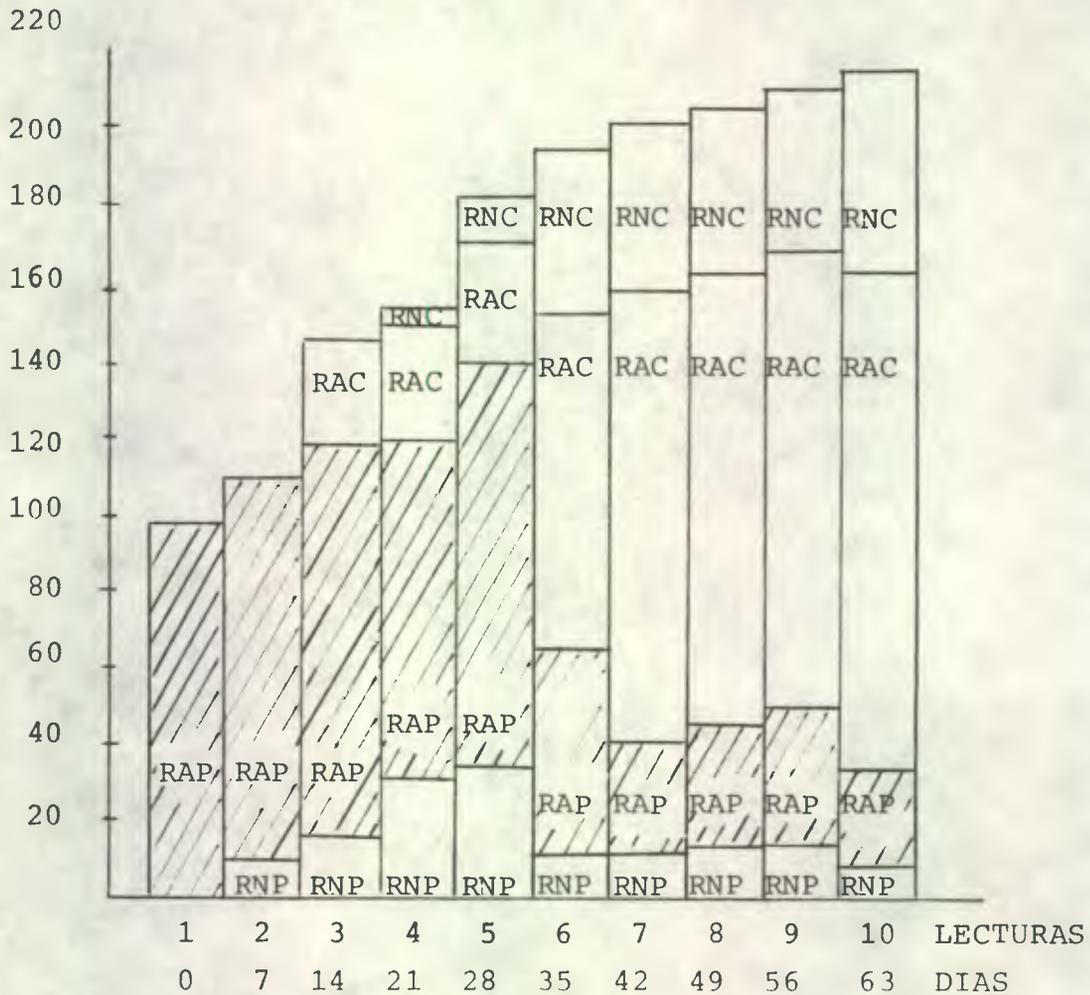
GRAFICA 10
 TRATAMIENTO "2"
 SOLUCION BUFFER SOLA



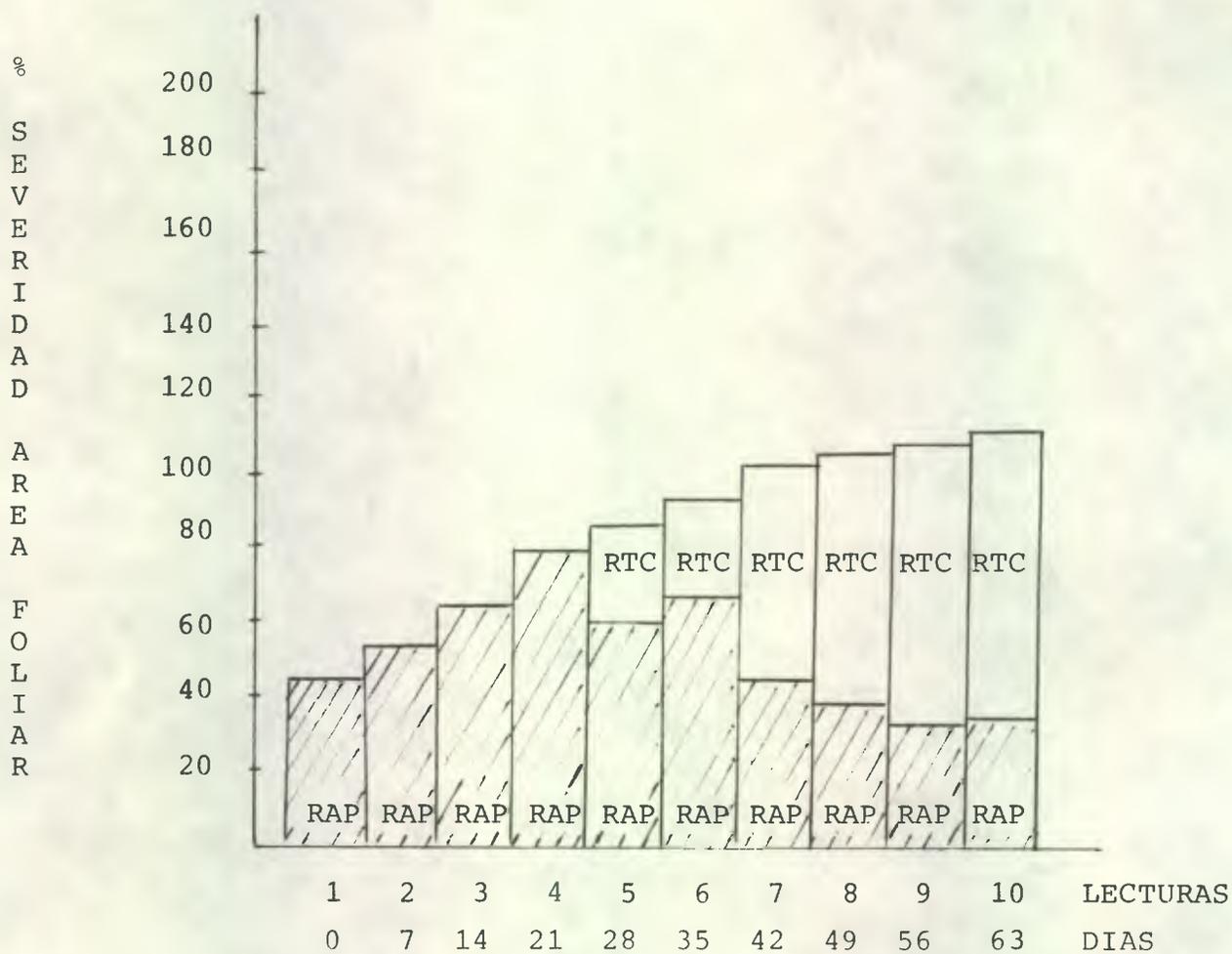
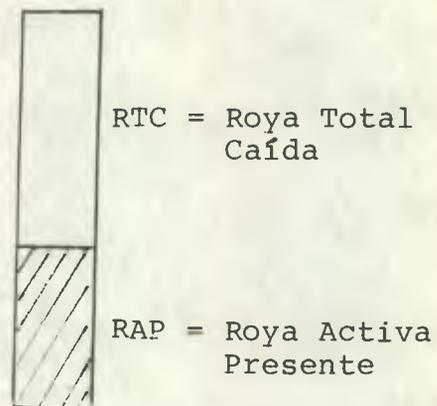
GRAFICA 11
 TRATAMIENTO "3"
 SOLUCION BUFFER SOLA



SEVERIDAD AREA FOLIAR



GRAFICA 12
 TESTIGO
 SOLUCION BUFFER SOLA



CUADRO 5

ANALISIS DE VARIANZA AL IRRESTRICTO AZAR
SOLUCION BUFFER + ENZIMA

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F.	Ft
					0.05
Trat.	3	0.3434	0.1145	12.282	3.24
Error	16	0.1491	0.0093		
Total	19	0.4925			

D.M.S. = 0.129 C.V. = 22.09% MEDIA 0.44 ROYA ACTIVA

PRUEBA MDS

No. Trat.	1	2	3	4
Medias	a 0.3054	ab 0.3728	ab 0.4168	c 0.6534

CUADRO 6

ANALISIS DE VARIANZA AL IRRESTRICTO AZAR
SOLUCION BUFFER SOLA

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F.	Ft
					0.05
Trat.	3	0.1620	0.0540	6.408	3.24
Error	16	0.1348	0.0084		
Total	19	0.2968			

D.M.S. = 0.123 C.V. = 16.44% MEDIA 0.56 ROYA ACTIVA

PRUEBA MDS

No. Trat.	1	2	3	4
Medias	a 0.4732	ab 0.4878	ab 0.5732	c 0.6996

Los análisis de varianza se realizaron cuantificando el área que se obtuvo bajo las curvas de cada repetición como resultado de la acumulación de la enfermedad.

El presente análisis estadístico-matemático muestra la diferencia significativa al 5% que se presentó entre tratamientos, así como la prueba de mínima diferencia significativa para un valor de "t" al 5% que muestra la significancia o no significancia entre las medias de los tratamientos evaluados. Presentando para ambas etapas que los tratamientos con letras iguales no difieren estadísticamente. Sin embargo, dentro de los tratamientos que se sugiere que son iguales, el tratamiento 1, con la menor media fue el más efectivo para reducir el área de roya activa.

Luego de observar los resultados obtenidos a través de la metodología del efecto acumulativo del área bajo la curva y el análisis estadístico-matemático vemos que el extracto (enzima + Buffer) y la solución Buffer sola, muestran un mismo comportamiento y causan un efecto degradante sobre la H. vastatrix.

De esta forma, los resultados nos conducen a negar la hipótesis alternativa I que dice: "Existe un efecto enzimático proteolítico del hongo V. hemileiae sobre la roya del café"

H. vastatrix a nivel de invernadero" y aceptar la hipótesis alternativa II que dice "Existe un efecto fungicida de la Solución Buffer extractante sobre la roya del cafeto".

Los resultados obtenidos del análisis foliar del elemento Boro (cuadro 7) para las dos etapas de que constó el experimento se realizaron hasta finalizar ambas pruebas, teniendo que el resultado para el extracto (enzima + Solución Buffer) se obtuvo a los 125 días después de la aplicación, mientras que para la solución Buffer el resultado se obtuvo a los 90 días después de aplicada ésta. Debido a esta situación se puede observar la diferencia en ppm que existe en los niveles de las muestras enviadas, teniendo las muestras correspondientes al extracto mayor tiempo desde su aplicación. Sin embargo, para ninguna de las 2 etapas del experimento se pretendió que estos resultados reflejaran una interpretación de tipo nutricional, sino más bien sirviera para corroborar la influencia negativa del elemento boro sobre el desarrollo de las pústulas de la Hemileiae vastatrix.

Los datos del análisis foliar realizados permiten observar que los niveles del Boro en las hojas están por encima del nivel crítico alto. Dado que este análisis muestra altas concentraciones del elemento Boro y que ambas evaluaciones presentan una misma tendencia, estos resultados sugieren que el efecto de

necrosado de la roya es producido por la acción de la solución extractora, constituida del Acido Bórico y Bórax y no por la enzima del hongo.

RESULTADO DE ANALISIS FOLIAR DEL
ELEMENTO BORO (ppm) 5/

TRATAMIENTO	IDENTIFICACION MUESTRA	B O R O ppm
1	Enzima + Sol. Buffer	192.00
2	Enzima + Sol. Buffer	192.00
3	Enzima + Sol. Buffer	163.00
4	Testigo	0.00
1	Sol. Buffer sola	285.00
2	Sol. Buffer sola	200.00
3	Sol. Buffer sola	175.00
4	Testigo	0.00

CUADRO 8

NIVELES CRITICOS DE BORO EN HOJAS
DE CAFE

ALTO	Mayor que 100 ppm
MEDIANO	60 - 100 ppm
BAJO	40 - 60 ppm
DEFICIENTE	Menor de 40 ppm

5/ Análisis realizado en el Laboratorio de Suelos de ANACAFE.

IX CONCLUSIONES

1. Tanto el extraco enzimático como la solución extractante (Buffer) a base de boro ejercieron un efecto degradante sobre la H. vastatrix.
2. Las evaluaciones del extracto enzimático del hongo y la solución Buffer a base de boro presentan una misma tendencia, como se puede observar en las curvas respectivas (gráficas 3 y 4) existiendo diferencia significativa similar entre tratamientos para las 2 pruebas.
3. En ambas evaluaciones, a medida que aumentaron las diluciones por tratamiento el efecto degradante sobre la H. vastatrix fue menor.
4. La acción degradante sobre la H. vastatrix se manifestó a los 7 días después de la aplicación del extracto enzimático y la solución Buffer.
5. La defoliación ocurrida a lo largo del experimento y la poca presencia de roya en las hojas presentes hacen que el efecto de la aplicación del extracto enzimático y la solución extractante (Buffer) sea no mayor de 60 días.

6. Los resultados obtenidos y las conclusiones presentadas anteriormente nos conducen a rechazar la Hipótesis Alternativa I que dice "Existe un efecto enzimático proteolítico del hongo V. hemileiae sobre la roya del cafeto H. vastatrix" y aceptar la Hipótesis Alternativa II que dice "Existe un efecto fungicida de la solución Buffer extractante sobre la roya del cafeto".

7. Finalmente, no se comprobó a nivel de laboratorio si la enzima del hongo V. hemileiae fue realmente extraída por la solución Buffer a base de boro.

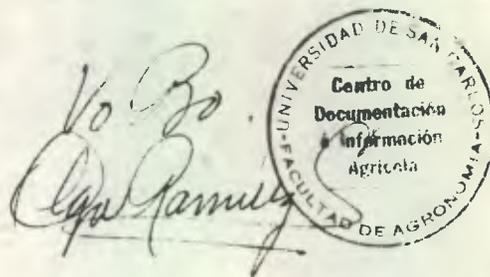
X. RECOMENDACIONES

1. Probar la extracción a nivel de laboratorio de la enzima del hongo V. hemileiae, utilizando otras soluciones extractantes diferentes a las derivadas de boratos.
2. Comprobar en un futuro ensayo, previo evaluación, si la enzima del hongo realmente es obtenida por la solución extractante.
3. Hacer pruebas con caldos a base de boratos para determinar su verdadero efecto en el control de la roya del cafeto, conocer sus efectos fungicidas y su economía dentro de un sistema de control.

XI. BIBLIOGRAFIA

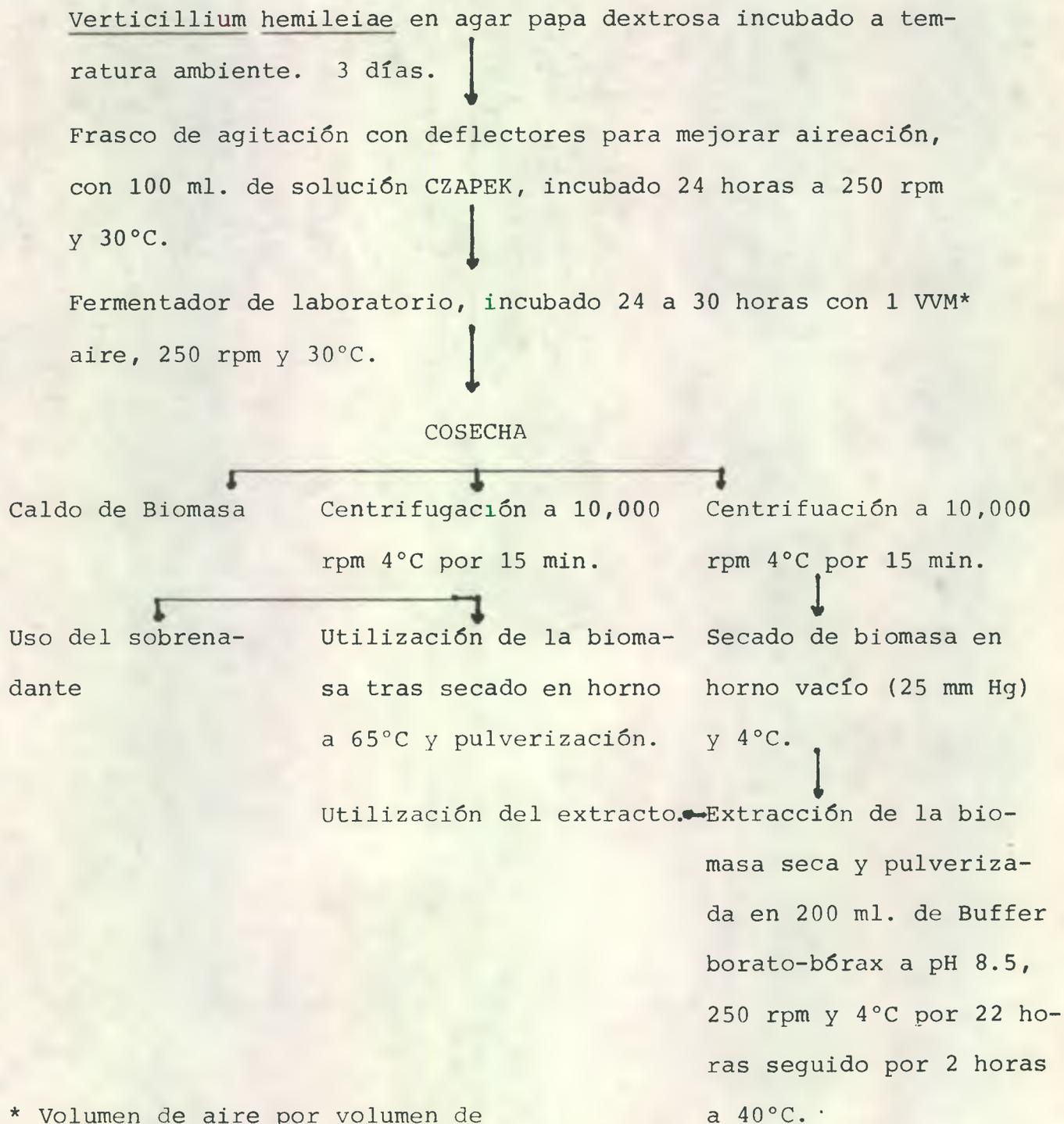
1. COMISION MIXTA MEXICO-GUATEMALA PARA LA PREVENCION Y CONTROL DE LA ROYA DEL CAFETO. Resistencia varietal; técnicas de inoculación. Guatemala, 1982, pp. 2 - 3.
2. FILHO, J.C. DA. y CHAVES, G.M. Antibióticos, fungicidas e nematocidas empregados no controle de doenca das plantas. Minas Gerais, Brasil, Universidad Federal de Vicosa, Centro de Encino de Extensao, 1979. pp. 65-69.
3. FUMAGALLI, A., RIVERA, M.A., y MENENDEZ, L.A. Métodos para calcular el efecto acumulativo de la roya del cafeto. Agronomía (Guatemala) no. 33: 28-31. 1982.
4. GUATEMALA. INSTITUTO NACIONAL DE SISMOLOGIA, VULCANOLOGIA, METEOROLOGIA E HIDROLOGIA, SECCION DE CLIMATOLOGIA. Registros climáticos. Guatemala, 1971. p. 201.
5. KUSHALAPPA, A.C. y CHAVEZ, G.M. An analysis of the development of coffee rust in the field. Fitopatología Brasileira (Brasil) 5: 95-97. 1980.
6. _____ y FILHO, J.C. DA. Principios de epidemiología. Trad. por Miguel A. Rivera Mármol. Guatemala, Comisión Mixta México-Guatemala para la Prevención y Control de la Roya del Cafeto, 1982. p. 40.
7. LEAL, J.C. y VILLANUEVA, J. R. Digestión de uredosporas por Verticillium hemileiae. Microbiología Española 15: 269-275. 1962.
8. _____ ACHA, I.G. y VILLANUEVA, J.R. Proteolytic activity of growth media filtrates from non pathogenic species of Verticillium. Nature 200 (4902) : 290-291. 1963.
9. _____ Lack of pectic enzyme production by non pathogenic species of Verticillium. Nature 195 (4848): 1328-1329. 1962.
10. MEDEIROS, E.F. y RODRIGUEZ Jr., C.J. Production fo phytoalexin like substances in Coffea arabica L. leaves inoculated with several rust not pathogenic to coffee. In Colloque Scientifique International Sur le Cafe, 8°, Abidjam, Cote d'Ivoire, 1977. Documentos. Paris, Association Scientifique Internationale du Café, 1979. pp. 511-512.

11. OSTER, K.A. and GOLDEN, M.J. Antiseptics, disinfectants, fungicides and sterilization. Edited by G.F. Reddish. Philadelphia, Lea & Febiger, 1954. p. 555, 583-625.
12. THOMSON W.T. Agricultural chemicals; fungicides. Fresno, California, s.e., 1979. vol. 4. pp. 15-16.



A N E X O

ESQUEMA 1

PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO DEL MICROORGANISMO. V. hemileiae

* Volumen de aire por volumen de caldo por minuto.

ESCALA PARA EVALUAR EL PORCENTAJE DE
 AREA AFECTADA POR ROYA EN HOJAS DE CAFE

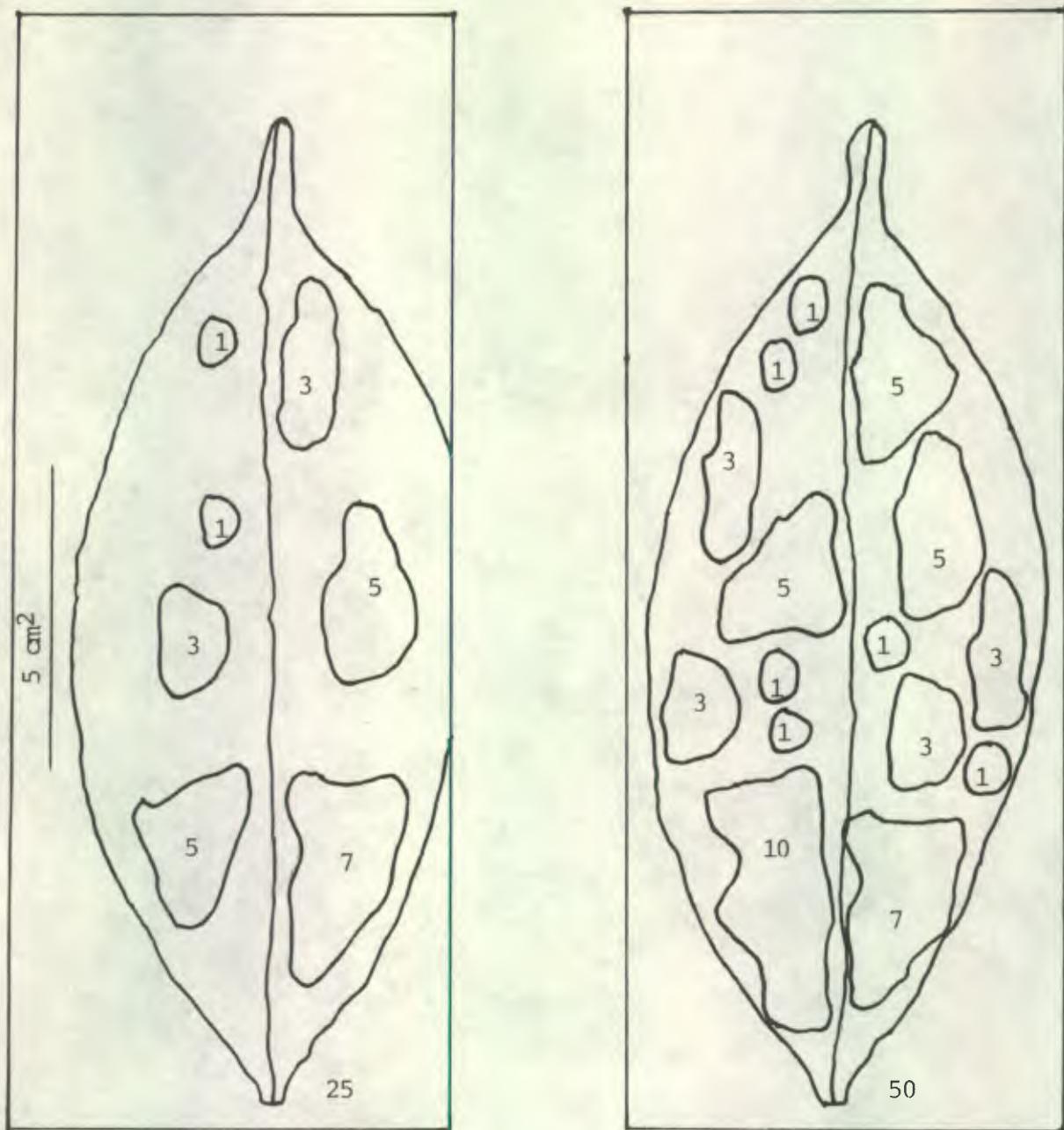


Fig. 1 El diagrama representa hojas de café de 50 cm² con lesiones de roya de varios tamaños (1, 3, 5, 7 y 10% del total del área foliar).

REGISTRO DE INFORMACION SEMANAL

EXPERIMENTO: Enzima + Sol. Buffer

LECTURA: 3

FACTORES A EVALUAR						
Hojas	Repetición	Tratamiento	RAP	RNP	RAC	RNC
1	1	1	2	0	0	0
2			0	8	0	0
3			2	0	0	0
4			2	0	0	0
5			2	0	0	0
$\Sigma =$			8	8	0	0
1	2	1	2.5	8	0	0
2			1	1	0	0
3			0	0	5	12
4			2	1	0	0
5			1.5	0	0	0
$\Sigma =$			7	10	5	12
1	3	1	1	1	0	0
2			0	0	0	2
3			0	5	0	0
4			1.5	0	0	0
5			1	0	0	0
$\Sigma =$			3.5	6	0	2
1	4	1	0	4	0	0
2			8	4	0	0
3			2	0	0	0
4			1	1	0	0
5			0	3	0	0
$\Sigma =$			11	12	0	0
1	5	1	6	8	0	0
2			0	0	4	12
3			0	5	0	0
4			0	0	5	10
5			1	1	0	0
$\Sigma =$			7	14	9	22

RAP = ROYA ACTIVA PRESENTE RAC = ROYA ACTIVA CAIDA
 RNP = ROYA NECROSADA PRESENTE RNC = ROYA NECROSADA CAIDA

NOTA: Se tomó como ejemplo la lectura No. 3 del tratamiento 1 correspondiente a la etapa Evaluación de la Enzima + Sol. Buffer; ya que las 2 lecturas anteriores aún no reportaban caída de datos por defoliación. De esta forma se registró semanalmente la información (por lectura) y se obtuvo la sumatoria de los factores a evaluar en cada repetición.

CUADRO 10

ORDENACION Y TABULACION DE LA INFORMACION

Tratamiento	Repetición	LECTURAS										LECTURAS											
		RAP/REPETICION										RNP/REPETICION											
	No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1 Enzima + Sol. Buffer	1	5	6.5	8	7.5	7	6	4	2	3	0	0	3	8	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	21.5	11	7	6	3.5	2.5	2.5	3	3	4	0	16.5	10	14	4	2.5	0	0	0	0	0	
	3	4.5	1.5	3.5	2.5	4.5	6	8	10	8	9	0	5.5	6	1	1	2	11	3	0	0	0	
	4	17	7	11	11	7	7	8	10.5	12	11.1	0	7	12	9	16	20	21	22	22	23	23	
	5	36	14.5	7	1	1	3	5.5	1.5	1.5	1.5	0	28	14	6	6	6	7	3	3	3	3	
	TOT/REP	34	40.5	36.5	28	23	24.5	28	27	27.5	26	0	60	50	30	27	30.5	39	28	25	26	26	
		LECTURAS										LECTURAS											
		RAC/REPETICION										RNC/REPETICION											
		No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	1	0	0	0	0	0	2	2	2	0	3	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	5	0	3	0	1.5	0	0	0	0	0	12	0	10	3	2.5	0	0	0	0	
	3	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	0	2	5	0	0	0	0	3	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	
	5	0	0	9	6	0	0	0	4	0	0	0	0	22	8	0	0	0	5	0	0	0	
	TOT/REP	0	0	14	7	3	2	3.5	6	3	3	0	0	36	25	10	3	2.5	5	3	0	0	

RAP = ROYA ACTIVA PRESENTE
 RNP = ROYA NECROSADA PRESENTE
 RTP = ROYA TOTAL PRESENTE
 RTP = RAP + RNP

RAC = ROYA ACTIVA CAIDA
 RNC = ROYA NECROSADA CAIDA
 RTC = ROYA TOTAL CAIDA
 RTC = RAC + RNC

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE AGRONOMIA

Ciudad Universitaria, Zona 12.

Apartado Postal No. 1945

GUATEMALA, CENTRO AMERICA

Referencia
Asunto
.....

"IMPRIMASE"



RECEIVED
FACULTAD DE AGRONOMIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

ING. AGR. CESAR A. CASTAÑEDA S.
D E C A N O