

Efficacy of indigenous and commercial *Simplicillium* and *Lecanicillium* strains for controlling *Hemileia vastatrix*

Comparación de cepas locales y comerciales de *Simplicillium* y *Lecanicillium* colonizando pústulas de *Hemileia vastatrix*

Gerardo García-Nevárez*, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Delicias. Carretera Delicias-Rosales Km 2.5. Delicias, Chihuahua, México, CP. 33000 México; **Eduardo Hidalgo-Jaminson**, Centre for Agriculture and Biosciences International, Turrialba, Cartago, Costa Rica, CP. 30501 Costa Rica. *Autor para correspondencia: garcia.gerardo@inifap.gob.mx

Recibido: 24 de Octubre, 2018.

Aceptado: 11 de Marzo, 2019.

García-Nevárez G and Hidalgo-Jaminson E. 2019. Efficacy of indigenous and commercial *Simplicillium* and *Lecanicillium* strains for controlling *Hemileia vastatrix*. Mexican Journal of Phytopathology 37(2): 237-250.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1810-4

Primera publicación DOI: 04 de Abril, 2019.

First DOI publication: April 04, 2019.

Resumen. La roya es la enfermedad del café de mayor importancia económica, puede ocasionar pérdidas de producción superiores a 50%. La información sobre prácticas de control biológico aplicado para controlar la roya del café en Costa Rica es limitada. El estudio tuvo por objetivo seleccionar una cepa local de *Simplicillium* con alto grado de virulencia, así como evaluar la eficiencia de cepas comerciales de micoparásitos destinados al control de *H. vastatrix* en Costa Rica. El estudio comprendió ocho cepas de hongos, cinco de ellas fueron aisladas de la zona cafetalera de Turrialba e identificadas como *Simplicillium lanosoniveum* y

Abstract. The aim of this research was to select an indigenous strain of *Simplicillium* with a high degree of virulence, as well as to assess the efficacy of commercial strains of mycoparasites for the control of *H. vastatrix* in Costa Rica. The study included eight strains of fungi, five of them were isolated from the coffee region of Turrialba, which were identified as *Simplicillium lanosoniveum* and three biopesticides recommended to control coffee rust in Costa Rica. The EC strain showed to be the most effective, by colonizing coffee rust pustules in a shorter time. This strain was compared with commercial formulations after two successive passes in PDA and after been stored on filter paper. The indigenous isolates showed a greater degree of specificity than the rest of the strains. This is the first report pointing out *Simplicillium* as the main natural enemy of *H. vastatrix* in Costa Rica.

Key words: indigenous isolates, colonization rate, mycoparasites.

tres biofungicidas comerciales recomendados para combatir la roya en cafetales de Costa Rica. La cepa EC mostró ser la más efectiva al colonizar en menor tiempo las pústulas de roya. Esta cepa fue comparada con formulados comerciales después de dos pases sucesivos en PDA y de haberla almacenado en papel filtro. Los aislamientos locales presentaron un mayor grado de especificidad que el resto de las cepas. Estos son los primeros resultados que anteponen a *Simplicillium* como principal agente de control biológico de *H. vastatrix* en Costa Rica.

Palabras clave: aislamientos locales, porcentaje de colonización, micoparásitos.

Dentro del complejo de enfermedades que atacan al cultivo de café, la roya (*Hemileia vastatrix* Berk. and Broome) es de las de mayor importancia económica, puede ocasionar pérdidas de producción superiores a 50% (Haddad *et al.*, 2009; Suresh *et al.*, 2012). El brote más perjudicial de roya en Centroamérica ocurrió en el ciclo 2012-2013, cuando las pérdidas estimadas fueron superiores a US\$499 millones, razón por la cual varios países consideraron el hecho como una emergencia nacional (Promecafe e IICA, 2013).

Cuando un organismo micoparásito se encuentra regulando a un fitopatógeno de manera natural, debe ser aislado y evaluado como agente de control (Campbell, 1990). Tal es el caso del hongo, con apariencia algodonosa, que frecuentemente aparece parasitando a la roya del café y el cual es citado como *Lecanicillium lecanii* Zimm. (Monzón, 1992; Canjura *et al.*, 2002; Vandermeer *et al.*, 2009; Rivillas, 2015; Pérez, 2015). Recientemente se ha demostrado que, en cafetales de la región de Turrialba, Cartago, Costa Rica, el principal enemigo natural de *H. vastatrix* es el hongo *Simplicillium* Gams and Zare (García, 2018), taxón relacionado

Within the complex of diseases that attack coffee crops, rust (*Hemileia vastatrix* Berk. and Broome) is one of the most important, since it can cause losses in production higher than 50% (Haddad *et al.*, 2009; Suresh *et al.*, 2012). The most harmful outbreak of rust in Central America occurred in the 2012–2013 cycle, when losses were estimated in over US\$499 million, leading several countries to consider the event as a national emergency (Promecafe e IICA, 2013).

When a mycoparasite is regulating a phytopathogen in a natural way, it must be isolated and evaluated as a control agent (Campbell, 1990). Such is the case of the fungus, with a cotton-like appearance, that frequently parasitizes the coffee rust and that is cited as *Lecanicillium lecanii* Zimm. (Monzón, 1992; Canjura *et al.*, 2002; Vandermeer *et al.*, 2009; Rivillas, 2015; Pérez, 2015). It has recently been proven that, in coffee plantations in the region of Turrialba, Cartago, Costa Rica, the main natural enemy of *H. vastatrix* is the fungus *Simplicillium* Gams and Zare (García, 2018), a taxon related with *Lecanicillium* (Zare and Gams, 2001). So once the correct identification is carried out, it is necessary to carry out an evaluation *in vitro* to select strains of greater virulence up to *H. vastatrix*.

Previous studies have demonstrated that the biological control of *H. vastatrix* can be a feasible and environmentally safe technique for the control of the disease; Monzón (1992), when evaluating *Verticillium* Nees for the control of rust in the laboratory, showed that the germination of uredospores is reduced. Vélez and Rosillo (1995), using a strain of *V. lecanii* (= *Lecanicillium*), also recorded a delay in the incubation period of *H. vastatrix* and in the reduction of the total incidence of the disease per plant. Likewise, Haddad *et al.*, (2009) documented the use of bacteria as a promising technique for the biological control of *H. vastatrix*.

con *Lecanicillium* (Zare y Gams, 2001). Así pues, una vez realizada la correcta identificación es necesario la evaluación *in vitro* para seleccionar cepas de mayor virulencia hacia *H. vastatrix*.

Estudios previos han demostrado que el control biológico de *H. vastatrix* puede ser una técnica factible y ambientalmente segura para el control de la enfermedad; Monzón (1992) al evaluar *Verticillium* Nees para el control de la roya a nivel de laboratorio demostró que la germinación de uredosporas se ve reducida. Vélez y Rosillo (1995), también con aplicaciones de una cepa de *V. lecanii* (= *Lecanicillium*) registraron un retraso en el periodo de incubación de *H. vastatrix* y en la reducción de la incidencia total de la enfermedad por planta. Por su parte, Haddad *et al.*, (2009) documentaron el uso de bacterias como una técnica promisorio para el control biológico de *H. vastatrix*.

Actualmente, el manejo de la roya en Costa Rica está enfocado en el uso de fungicidas protectantes (a base de cobre) y fungicidas sistémicos pertenecientes a la familia de los triazoles principalmente (los efectos indeseables de estas acciones de manejo son bien conocidos), además de prácticas culturales como la poda, el manejo de la sombra y el uso de variedades resistentes (Avelino *et al.*, 2004; Barquero, 2013). Si bien el uso de variedades resistentes es una práctica promisorio para mitigar la enfermedad, la variedad genética de la roya disminuye el tiempo de resistencia inicial (Gouveia *et al.*, 2005). Como contraparte, existen enemigos naturales de *H. vastatrix* que regulan su incidencia y severidad (Guharay *et al.*, 2001); como por ejemplo, los hongos *L. lecanii* y *Cladosporium hemileiae* (= *Digitopodium hemileiae* Steyaert). También es común encontrar larvas de *Mycodiplosis* Rüb. alimentándose de pústulas de roya (Virginio Filho, 2017). Desafortunadamente la información sobre prácticas de control biológico aplicado para controlar la roya del café en Costa Rica es limitada.

Currently, the control of rust in Costa Rica is focused on the use of protector (copper-based) and systemic fungicides that belong to the family of triazols, mainly (the undesirable effects of these control actions are well-known), along with cultural practices such as pruning, the use of shade and the use of resistant varieties (Avelino *et al.*, 2004; Barquero, 2013). Although the use of resistant varieties is a promising practice for the mitigation of the disease, the genetic variety of rust reduces the time of initial resistance (Gouveia *et al.*, 2005). On the other hand, there are natural enemies of *H. vastatrix* that regulate its incidence and severity (Guharay *et al.*, 2001), such as the fungi *L. lecanii* and *Cladosporium hemileiae* (= *Digitopodium hemileiae* Steyaert). It is also common to find larvae of *Mycodiplosis* Rüb. feeding of rust pustules (Virginio Filho, 2017). Unfortunately, the information on applied biological control practices for the control of coffee rust in Costa Rica is limited.

The aim of the study was to isolate and compare local and commercial strains of *Simplicillium* and *Lecanicillium* against coffee rust.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and identification of local and commercial strains. The study covered eight fungal strains, five of which were isolated from rust pustules in the coffee-growing region of Turrialba, Cartago, Costa Rica, in the locations of San Juan Norte (SJ), Jabillos (JV), Aquiares (AQ), Santa Rosa (SR) and CATIE (EC). A variation of this last strain was also included after having been kept for one month using the filter paper method (Morales, 2008) in order to observe the loss of virulence due to dehydration at the end of the process (codified as EC1). The plots in which the collections were performed are located between 600 and 950 masl;

El estudio tuvo por objetivo aislar y comparar cepas locales y comerciales de *Simplicillium* y *Lecanicillium* contra la roya del café.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación de cepas locales y comerciales. El estudio comprendió ocho cepas de hongos, cinco fueron aisladas de pústulas de roya en la zona cafetalera de Turrialba, Cartago, Costa Rica en las localidades de San Juan Norte (SJ), Jabillos (JV), Aquiares (AQ), Santa Rosa (SR) y CATIE (EC); también, se incluyó una variante de esta última cepa después de haber sido conservada durante un mes por el método de papel filtro (Morales, 2008), con la finalidad de observar pérdida de virulencia debida al sometimiento de deshidratación al final del proceso (codificada como EC1). Las parcelas donde se hicieron las colectas se encuentran entre los 600 a 950 msnm, la temperatura promedio registrada en el área de estudio durante los últimos años ha sido de 22.4 °C y 90.6% de humedad relativa. Todas las parcelas estaban plantadas con café arábica variedad Caturra con una densidad de 5000 plantas/ha bajo sombra

Las tres cepas restantes (INA, C1 y C2) corresponden a productos recomendados para combatir la roya en cafetales de Costa Rica. INA proviene de un centro de capacitación y transferencia de tecnología, esta cepa se reproduce de manera artesanal utilizando como sustrato arroz. C1 también fue producida con el mismo sustrato, pero a diferencia del anterior, esta contaba con empaque y etiquetado para su venta. C2 es un producto comercial cuya formulación era polvo humectable.

Colonias monospóricas de las diferentes cepas fueron enviadas al Laboratorio de Biología Molecular de la Corporación Bananera Nacional de Costa Rica (Corbana). Para la secuenciación de

the average temperature recorded in the area of study in recent years has been 22.4°C and a relative humidity of 90.6%. All plots were planted with Arabica coffee of the variety Caturra, with a density of 5000 plants/ha under shade.

The three remaining strains (INA, C1 and C2) are products recommended against rust in coffee plantations in Costa Rica. INA comes from a training and technology transfer center; this strain reproduces in a traditional manner, using rice as a substrate. C1 was also produced with the same substrate, but unlike the above, it was packaged and labeled for sale. C2 is a commercial product which was formulated as a wettable powder.

Monospori colonies of the different strains were sent to the Molecular Biology Lab of the Corporación Bananera Nacional de Costa Rica (National Banana Corporation of Costa Rica - Corbana). For the sequencing of the samples, the genetic material was extracted following the protocol described by Kuske *et al.* (1998) with modifications made by Corbana, followed by an amplification of the ITS region. The primers used for the amplification were ITS1 and ITS4; the corroboration of the amplification was carried out in a 1% agarose gel. The product of the amplification was sent to the company MacroGen Inc. for purifying and sequencing. After generating the sequences, they were edited using the program BioEdit and compared in the database of the NCBI (National Center for Biotechnology Information). The organisms identified for each product are shown in Table 1. The strains are safeguarded in the Microbial Control Laboratory of the *Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza* (Tropical Agriculture Research and Training Center - CATIE).

Collection of rust pustules and preparation of leaf discs. Initially, leaves of the coffee variety Caturra,

las muestras se realizó la extracción del material genético según el protocolo descrito por Kuske *et al.* (1998) con modificaciones hechas por Corbana, seguido de una amplificación de la región ITS. Los iniciadores utilizados para dicha amplificación fueron ITS1 e ITS4; la corroboración de la amplificación se hizo en un gel al 1% de agarosa. El producto de la amplificación se envió a la empresa Macrogen Inc. para su purificación y secuenciación. Una vez generadas las secuencias se editaron con el programa BioEdit y se compararon en la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information). Los organismos identificados para cada producto se enlistan en el Cuadro 1. Las cepas se encuentran resguardadas en el Laboratorio de Control Microbial del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).

Colecta de pústulas de roya y preparación de discos de hoja. Inicialmente se hicieron colectas de hojas de café variedad Caturra completamente desarrolladas y con presencia de pústulas de roya en sus diferentes estados de desarrollo y sin presencia de hongos micoparásitos; posteriormente las hojas fueron llevadas a laboratorio en donde con la ayuda de un sacabocado de 1.8 cm de diámetro, se extrajeron discos de hoja conteniendo pústulas de roya con lesiones recién esporuladas de color naranja intenso (estado intermedio) y lesiones completamente desarrolladas con apariencia naranja pálido (estado avanzado). Una vez hechos los discos de hoja se colocaron en placas multipozos CELLSTAR^(R) de seis cavidades donde previamente a cada cavidad se le agregaron 5 mL de agua destilada estéril (ADE) y sobre esta un disco de Foam de 2.5 cm de diámetro. Finalmente, los discos de hoja quedaron sobre los discos de Foam flotando en ADE (Figura 1). Previamente se inocularon con una suspensión de esporas de las diferentes cepas como se describe en el siguiente apartado.

Cuadro 1. Organismos identificados en cepas locales y comerciales.
Table 1. Organisms identified in local and commercial strains.

Cepa	Organismos coincidentes NCBI
EC	<i>Simplicillium lanosoniveum</i>
AQ	<i>Simplicillium lanosoniveum</i>
SR	<i>Simplicillium lanosoniveum</i>
SJ	<i>Simplicillium lanosoniveum</i>
JV	<i>Simplicillium lanosoniveum</i>
INA	<i>Simplicillium lanosoniveum</i>
C1	<i>Lecanicillium attenuatum</i>
C2 ^y	<i>Lecanicillium sp.</i>

^y Identificación hecha en base a las claves taxonómicas propuestas por Zare y Gams (2001) / ^y Identification performed based on the taxonomic codes proposed by Zare and Gams (2001).

fully developed and with rust pustules in different stages of development without microparasitic fungi were collected; these leaves were transferred to a lab, where, using a hole puncher, 1.8 cm in diameter, we extracted leaf discs with rust pustules with deep orange-colored, recently sporulated (intermediate stage) lesions and fully developed lesions colored pale orange (advanced stage). Once the leaf discs were made, they were placed in a CELLSTAR^(R) multiwell plate with six cavities, each of which previously contained 5 mL of sterile distilled water (SDW), and on top of this, a Foam disc, 2.5 cm in diameter. Finally, the leaf discs were placed on top of the Foam discs floating on SDW (Figure 1). They were then inoculated with a suspension of spores from the different strains, as described in the next section.

Application method and doses. Petri dishes with 15 day old monospore cultures of the different strains were flooded with SDW, followed by scraping with a Drigalsky spatula until the mycelium was completely separated from the culture medium.

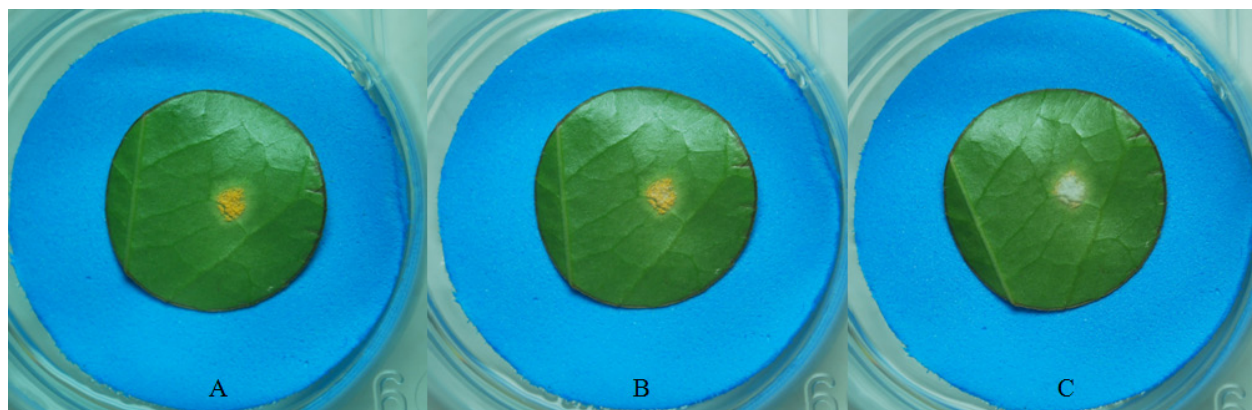


Figura 1. Discos de hoja con pústulas de roya en estado avanzado e inoculados con la cepa CATIE: A) dos días después de la inoculación; B) tres días después de la inoculación y C) cuatro días después de la inoculación.

Figure 1. Leaf discs with rust pustules in an advanced stage and inoculated with the strain CATIE: A) two days after inoculation; B) three days after inoculation, and C) four days after inoculation.

Método y dosis de aplicación. Cajas Petri con colonias monospóricas de 15 días de edad de las diferentes cepas fueron inundadas con ADE, seguido de un raspado con una espátula Drigalsky hasta separar completamente el micelio del medio de cultivo. El sobrenadante obtenido fue recuperado en viales de vidrio, los cuales se colocaron en baño ultrasonido por tres minutos y luego se agitó en un vortex durante un minuto. Posteriormente se hizo un filtrado para separar conidios de micelio. Después, se hicieron diluciones seriadas en ADE mas Tween^R 80 a 0.1% hasta obtener concentraciones que permitieran un conteo de esporas con la cámara Neubauer. Una vez determinado el número de conidios contenido en la suspensión inicial, se ajustó a una concentración final de 1×10^7 conidios/mL.

La cepa C2 venía en una presentación de polvo humectable, mientras que INA y C1 fueron producidas en arroz, de modo que para la estimación de la concentración de esporas primero se tomó un gramo de producto que fue suspendido en 10 mL de ADE, después se hizo una filtración para eliminar inertes de mayor tamaño; posteriormente

The supernatant obtained was recovered in glass, which were placed in an ultrasonic bath for three minutes, then stirred in a vortex for one minute. They were then filtered to separate conidia from mycelia. Next, serial dilutions were carried out in SDW plus Tween^R 80 to 0.1% until concentrations were obtained that allowed a spore count using a hemocytometer. After determining the number of conidia contained in the initial suspension, it was adjusted to a final concentration of 1×10^7 conidia/mL.

Strain C2 was packaged as a wettable powder, while INA and C1 were produced in rice, therefore, for the estimation of the concentration of spores, we first took one gram of the product that was suspended in 10 mL in SDW, followed by a filtration in a hemocytometer, and finally, it was adjusted to the same dose of the local strains based on the percentage of viability of each product.

The inoculation of the conidia on the leaf discs with rust was carried out using a DeVilbiss Modelo 15-RD sprayer. A volume of 0.27 mL of the final concentration was applied.

se hicieron diluciones seriadas, conteo en cámara Neubauer y por último se ajustó a la misma dosis de las cepas locales en base al porcentaje de viabilidad de cada producto.

La inoculación de conidios sobre los discos de hoja con roya fue realizada con la ayuda de un atomizador DeVilbiss Modelo 15-RD. Se aplicó un volumen de 0.27 mL de la concentración final.

Una vez hecha la aplicación, se dejó pasar el tiempo necesario para que estos perdieran la humedad obtenida durante la inoculación para luego ser puestos en las placas multipozos como se describe en el apartado anterior.

Medición de la variable respuesta. La variable medida fue el porcentaje de colonización de las cepas sobre las pústulas de *H. vastatrix*. Las mediciones se hicieron cada 24 horas hasta siete días después de la inoculación. Para la estimación del porcentaje diario de colonización fue necesario tomar fotografías diarias individuales a cada disco de hoja (Figura 1) para después hacer un procesamiento con el cambio de colores utilizando el programa ImageJ 1.47v (Rasband, 2016). Inicialmente, se seleccionó y midió el área ocupada por la lesión de roya. Después, se ajustó el umbral de color de manera tal que la coloración blanquecina debida a la colonización de *Simplicillium* sobre las pústulas quedará claramente definida. Finalmente, el porcentaje de colonización se calculó dividiendo el área cubierta por *Simplicillium* entre el área total de la lesión y el resultado multiplicado por 100.

Diseño y análisis estadístico. El experimento tuvo 10 repeticiones cada una de las cuales consistió de dos placas multipozos. Cada placa contenía seis discos de un mismo estado de desarrollo de la roya (intermedio o avanzado); cinco de estos discos fueron inoculados, cada uno con una cepa diferente,

After spraying, it was left to stand until the humidity obtained during inoculation was lost, and then placed in the multiwell plate, as described in the previous section.

Measurement of the response variable.

The variable measured was the percentage of colonization of the strains on the pustules of *H. vastatrix*. Measurements were made every 24 hours until 7 days after inoculation. To estimate the daily percentage of colonization, it was necessary to take daily, individual photographs of each leaf disc (Figure 1) to then process with the change of colors using the program ImageJ 1.47v (Rasband, 2016). Initially, we selected and measured the area covered by the rust lesion. Next, we adjusted the color threshold in such a way that the milky-white color due to the colonization of *Simplicillium* on the pustules was clearly defined. Finally, the percentage of colonization was calculated by dividing the area covered by *Simplicillium* by the total area of the lesion and multiplied the result by 100.

Design and statistical analysis. The experiment had 10 replicates, each one consisted of two multiwell plate, which contained six discs with one stage of development of rust (intermediate or advanced); five of these discs were inoculated, each one with a different strain, in such a way that a sixth disc was used as a control without inoculation. The analysis was carried out using General Linear and Mixed Models using the Infostat statistical package (Di Rienzo *et al.*, 2016). Growth curves were adjusted using mixed, non-linear models; the model that best described the growth curves was chosen using criteria AIC and BIC. Finally, an ANOVA was carried out, along with means separation test (LSD=0.05) for the coefficients Beta (increase in percentage of colonization).

de manera tal que un sexto disco fue usado como testigo sin inoculación. El análisis fue hecho mediante Modelos Lineales Generales y Mixtos con el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2016). Se ajustaron curvas de crecimiento utilizando modelos no lineales mixtos; el modelo que describió mejor las curvas de crecimiento fue elegido utilizando los criterios AIC y BIC. Finalmente, se hizo un ANOVA y prueba de separación de medias (LSD=0.05) para los coeficientes Beta (incremento en porcentaje de colonización).

RESULTADOS

Bioensayos de cepas locales contra *H. vastatrix*. El análisis estadístico muestra una diferencia altamente significativa entre las cepas evaluadas ($F_{4,81}=44.58$, $p<0.0001$). El avance en porcentaje de colonización de cepas tuvo un comportamiento similar en ambas etapas evaluadas; es decir, no se observó diferencia estadística para estado de desarrollo de la roya ($F_{1,81}=2.73$, $p=0.1025$). La cepa EC mostró ser la más efectiva, al colonizar en menor tiempo las pústulas de roya, seguida de la cepa SJ; en tercer lugar en grado de efectividad estuvieron las cepas SR y JV, cuyos valores no difirieron estadísticamente (LSD=0.05). La cepa AQ mostró un menor desempeño respecto a las demás (Figura 2).

Bioensayos de cepas comerciales contra *H. vastatrix*. Al hacer la comparación de cepas comerciales y la mejor cepa local seleccionada en el ensayo anterior, se observó una diferencia estadística altamente significativa ($F_{4,81}=76.55$, $p<0.0001$). Al igual que en el experimento anterior, la variable evaluada no difirió estadísticamente en los estados de desarrollo de pústulas de roya ($F_{1,81}=5.06$, $p=0.0272$). Los porcentajes más altos de colonización en menor tiempo se dieron en la cepa EC, esta

RESULTS

Bioassay of local strains against *H. vastatrix*. The statistical analysis shows a highly significant difference between the evaluated strains ($F_{4,81}=44.58$, $p<0.0001$). The progress in percentage of colonization of strains had a similar behavior in both stages evaluated; in other words, there was no statistical difference for the stage of rust development ($F_{1,81}=2.73$, $p=0.1025$). Strain EC proved to be the most effective, since it colonized the rust pustules in the least amount of time, followed by SJ; the third most effective strains were SR and JV, with values that had no statistical difference (LSD=0.05). Strain AQ proved to have a lower performance rate in comparison to the rest (Figure 2).

Bioassay of commercial strains against *H. vastatrix*. After comparing the commercial strains and the best local strain selected in the previous trial, a highly significant statistical difference ($F_{4,81}=76.55$, $p<0.0001$) was observed. As in the previous experiment, the evaluated variable did not differ statistically in the stages of development of rust pustules ($F_{1,81}=5.06$, $p=0.0272$). The highest percentages of colonization in the lowest times were recorded in strain EC, which, after having been stored with the filter paper method, did not undergo a loss in virulence. In second place in terms of efficacy was INA, and finally, with a very poor performance, were commercial strains C2 and C1 (Figure 3).

DISCUSSION

These are the first results that report the effect of *Simplicillium* as the main biological control agent for *H. vastatrix* in Costa Rica. Most publications

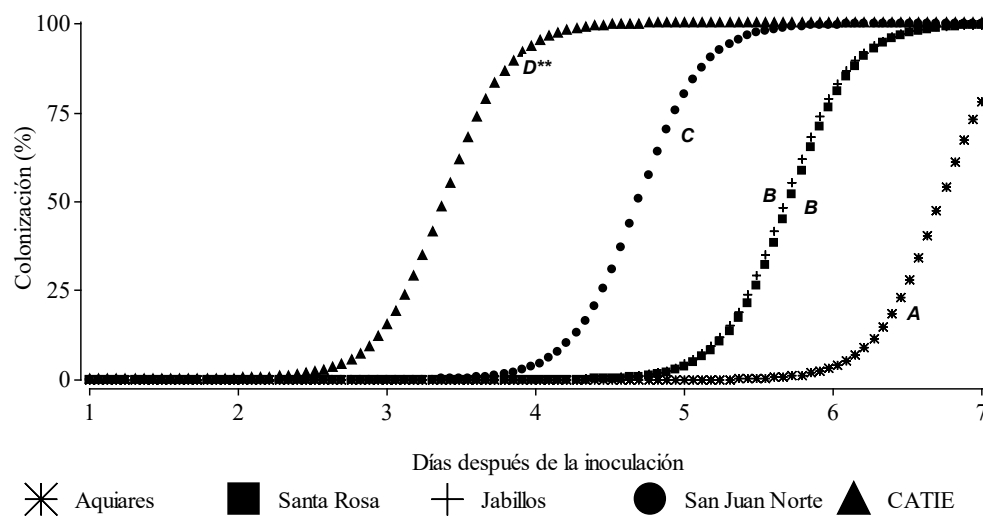


Figura 2. Eficacia de cepas locales de *Simplicillium* spp. colonizando pústulas de *H. vastatrix*

**Medias con misma letra no difieren estadísticamente (LSD=0.05).

(AQ: Aqiáres; SR: Santa Rosa; JV: Jabillos; SJ: San Juan Norte; EC: CATIE).

Figure 2. Efficacy of local strains of *Simplicillium* spp. colonizing *H. Vastatrix* pustules

**Means with the same letter do not differ statistically (LSD=0.05).

(AQ: Aqiáres; SR: Santa Rosa; JV: Jabillos; SJ: San Juan Norte; EC: CATIE)

misma cepa (EC1), después de ser almacenada mediante el método de papel filtro, no sufrió pérdida de virulencia. En segundo lugar de eficacia estuvo INA y, finalmente, y con un desempeño muy pobre las cepas comerciales C2 y C1 (Figura 3).

DISCUSIÓN

Estos son los primeros resultados que anteponen y miden el efecto de *Simplicillium* como el principal agente de control biológico de *H. vastatrix* en Costa Rica. La mayoría de publicaciones referidas al control biológico de roya del café son enfocadas al uso de *Lecanicillium* como controlador biológico (Esques *et al.*, 1991; Monzón, 1992; Rivas *et al.*, 1996; Canjura *et al.*, 2002; Vandermeer *et al.*, 2009; Jackson *et al.*, 2012; Rivillas, 2015; Pérez, 2015). Esto debido en parte a que algunos estudios relacionados fueron hechos previo a la división del género *Verticillium* hecha por Zare y

referring to the biological control of rust in coffee crops focus on the use of *Lecanicillium* as a biological control agent (Esques *et al.*, 1991; Monzón, 1992; Rivas *et al.*, 1996; Canjura *et al.*, 2002; Vandermeer *et al.*, 2009; Jackson *et al.*, 2012; Rivillas, 2015; Pérez, 2015). This is partly to the fact that some related studies were made before the division of the genus *Verticillium* by Zare and Gams (2001), and in other cases, there is no taxonomic or molecular identification of the isolated strain, and the assumption is made that it is *Lecanicillium*, due to the morphological characteristics they share (Lim *et al.*, 2014). Studies performed in the same region in which the strain CATIE was isolated mention that *Lecanicillium* can naturally parasitize rust pustules in levels near 9% in coffee plantations under the shade (Pico 2014). On the other hand, Canjura *et al.* (2002) evaluated different strains of *Verticillium* isolated in the same region applied on greenhouse plants, and did not find differences in the incidence of rust pustules; these authors recorded a natural

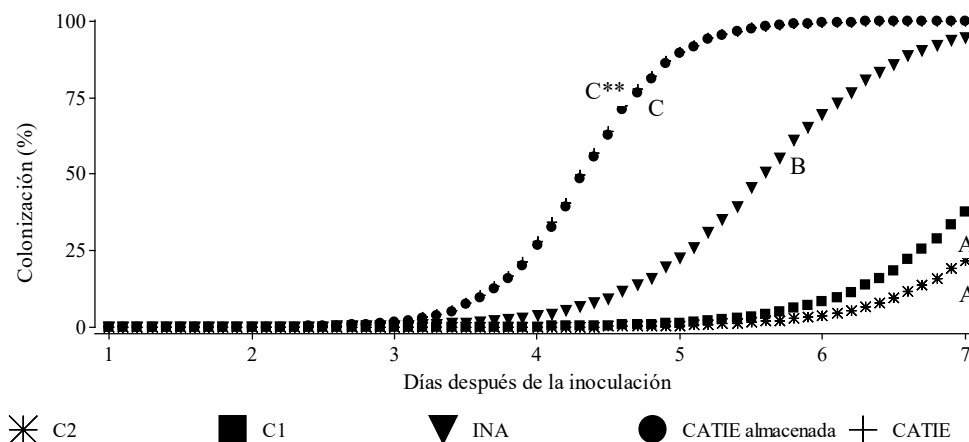


Figura 3. Eficacia de cepas comerciales en la colonización de pústulas de *H. vastatrix*
****Medias con misma letra no difieren estadísticamente (LSD=0.05).**
(C2: comercial; C1: comercial; INA: artesanal; EC1: CATIE almacenada; EC: CATIE)
Figure 3. Efficiency of commercial strains in the colonization of *H. Vastatrix* pustules
****Means with the same letter do not differ statistically (LSD=0.05).**
(C2: commercial; C1: commercial; INA: traditional; EC1: stored CATIE; EC: CATIE)

Gams (2001) y en otros casos no se cuenta con la identificación taxonómica o molecular de la cepa aislada y se llega a asumir que se trata de *Lecanicillium* por las características morfológicas que ambos géneros comparten (Lim *et al.*, 2014). Estudios hechos en la misma región donde se aisló la cepa CATIE mencionan que *Lecanicillium* puede llegar a parasitar de manera natural pústulas de roya en niveles cercanos a 9% de manera natural en plantaciones de café bajo sombra (Pico 2014). Por su parte, Canjura *et al.*, (2002) evaluaron diferentes cepas de *Verticillium* aisladas en la misma región aplicadas en plantas en invernadero, no encontrando diferencias en la incidencia de pústulas de roya, estos autores registraron un parasitismo natural de 10.5%. Monzón (1992) encontró que aplicaciones de *Verticillium* pueden reducir la germinación de uredosporas en 60%. Otros estudios han demostrado que la presencia de *Verticillium psalliotae* sobre hojas de café, disminuye la severidad de daño ocasionado por la roya. También, la germinación de uredosporas fue afectada de manera significativa

parasitism of 10.5%. Monzón (1992) found that applying *Verticillium* can reduce the germination of uredosporas by 60%. Other studies have shown that the presence of *Verticillium psalliotae* on coffee leaves reduces the severity of the damage caused by rust. Likewise, the germination of uredosporas was affected significantly when they were put in contact with conidia of the mycoparasite (Mahfud *et al.*, 2006).

The results obtained in this study indicate a higher degree of specificity of the local isolations, from *S. Lanosoniveum*, in comparison with the commercial strains evaluated. A relevant observation is that the strain INA, obtained from the *Instituto Nacional de Aprendizaje* (National Training Institute) of Costa Rica, according to the analyses for its identification, belong to the genus *Simplicillium*, as well as local strains; this strain was the second most efficient after EC and EC1, which only strengthens what was mentioned earlier. This is inferred by strains C1 (*L. attenuatum*) and C2 (*Lecanicillium* sp.) being unable to colonize completely, and weren't

cuando éstas fueron puestas en contacto con conidios del micoparásito (Mahfud et al., 2006).

Los resultados aquí obtenidos indican un mayor grado de especificidad de los aislamientos locales, los cuales corresponden a *S. lanosoniveum* en comparación de las cepas comerciales evaluadas. Una observación relevante es que la cepa INA, la cual se obtuvo del Instituto Nacional de Aprendizaje de Costa Rica, según los análisis para su identificación corresponde al género *Simplicillium*, al igual que las cepas locales; esta cepa fue segunda en eficacia después de EC y EC1, lo cual viene a reforzar lo anteriormente dicho. Se infiere lo anterior ya que la cepa C1 (*L. attenuatum*) y la cepa C2 (*Lecanicillium* sp.) no fueron capaces de colonizar completamente, incluso no lograron alcanzar un 50%. Nuestros resultados coinciden con estudios similares hechos en México por Gómez et al., (2017), quienes después de aislar y evaluar el efecto de control de diferentes cepas de hongos micoparásitos en pústulas de roya, determinaron que el hongo *Simplicillium* ofrece un 88.86 % de parasitismo en 120 h después de la inoculación, mientras que *Lecanicillium* en este mismo tiempo alcanzó 68.1 %.

Es importante señalar que las cepas comerciales C1 y C2 presentaron valores bajos de pureza y viabilidad (datos no presentados) y aún cuando la dosis se ajustó acorde a ello, es probable también la pérdida de virulencia debida al proceso de producción y formulación, por lo que es necesaria una evaluación constante de la calidad de los biofungicidas destinados al manejo de *H. vastatrix* en Costa Rica. Además de las pruebas de pureza, concentración y viabilidad, los formuladores de bioplaguicidas deben contar con pruebas rutinarias de efectividad hacia el organismo objetivo, sobre todo al final del proceso de formulación.

En base a lo expuesto anteriormente, es conveniente que antes de introducir cepas de micoparásitos para el manejo de *H. vastatrix*, se exploren las

even able to cover 50%. Our results coincide with similar studies carried out in Mexico by Gómez et al., (2017), who isolated and evaluated the control effect of different strains of mycoparasitic fungi in rust pustules, and determined that the fungus *Simplicillium* offers 88.86% of parasitism 120 h after inoculation, whereas *Lecanicillium* reached 68.1% in the same period of time.

It is important to point out that the commercial strains C1 and C2 presented low values of purity and viability (data not shown), and although the application rate was adjusted according to this, a loss of virulence due to the process of production and formulation is possible, making it crucial to constantly evaluate the quality of biofungicides for the management of *H. vastatrix* in Costa Rica. Along with the tests of purity, concentration and viability, biopesticide formulators must undergo routine tests of effectiveness towards the goal organism, particularly at the end of the formulation process.

Based on the above, it is convenient that, before strains of mycoparasites are introduced for the management of *H. vastatrix*, locally present strains are explored, or in this case, products based on *Simplicillium* be used, and not to assume, as has been the case so far, that *Lecanicillium* is the main natural regulator of *H. vastatrix* in Costa Rica, since this assumption can be determinant in the failure of programs of biological control against rust.

Along with this, it is advisable to evaluate fungicides that may have a certain degree of selectivity towards *Simplicillium* in order to favor the biological control by conservation, or in this case, to opt for strains that are resistant to fungicides commonly used for controlling *H. vastatrix* in Costa Rica.

In addition to the main objective of the study, it has been proven that the method of conservation using filter paper does not diminish

cepas locales presentes, o en su caso se haga uso de productos a base de *Simplicillium* y no se asuma como hasta el momento que *Lecanicillium* es el principal regulador natural de *H. vastatrix* en Costa Rica, dicha asunción puede ser un factor determinante en el fracaso de los programas de control biológico contra la roya.

Aunado a lo anterior, es aconsejable evaluar fungicidas que puedan presentar cierto grado de selectividad hacia *Simplicillium* con la finalidad de favorecer el control biológico por conservación, o en su caso seleccionar cepas resistentes a los fungicidas comúnmente usados para el combate de *H. vastatrix* en Costa Rica.

Adicional al principal objetivo del estudio, se demuestra que el método de conservación de papel filtro no demerita la patogenicidad de *Simplicillium* hacia *H. vastatrix*, el uso de éste método ha demostrado ser eficiente en conservar hongos entomopatógenos y fitopatógenos por más de cinco años sin afectar su capacidad patogénica (Morales, 2008); aun y cuando la cepa EC tenía solo un mes de almacenada al evaluarla, se destaca la capacidad de esta de soportar la desecación final del proceso sin ser afectada, y se recupera fácilmente del papel filtro para de nuevo ser utilizada.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que las cepas locales de *S. lanosoniveum* son más eficaces que productos comerciales a base de *Lecanicillium* en colonizar pústulas de roya. *Simplicillium* presenta un alto grado de especificidad hacia *H. vastatrix*, por lo que para la zona de estudio es recomendable que compañías formuladoras de biofungicidas para el combate de esta enfermedad, se enfoquen en cepas locales de *Simplicillium* antes de formular productos con otros géneros.

the pathogenicity of *Simplicillium* towards *H. Vastatrix*; the use of this method has proven to be efficient in the conservation of entomopathogenic and phytopathogenic fungi for more than five years without affecting its pathogenic capacity (Morales, 2008); although the EC strain had only been stored for one month at the moment of evaluating it, it is worth highlighting its capacity to tolerate the final desiccation at the end of the process without being affected, as well as its rapid recovery from the filter paper to be used.

CONCLUSIONS

The results obtained show that the local *S. lanosoniveum* strains are more efficient than commercial *Lecanicillium* – based products for colonizing rust pustules. *Simplicillium* shows a high degree of specificity towards *H. vastatrix*, and therefore, for the area of study, it is recommended that companies that manufacture biofungicides or the treatment of this disease focus on local strains of *Simplicillium* before formulating products with other genera.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author thanks the CONACYT and INIFAP for the support provided.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

## AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al CONACYT e INIFAP por el apoyo otorgado.

## LITERATURA CITADA

- Avelino J, Willocquet L and Savari S. 2004. Effects of crop management patterns on coffee rust epidemics. *Plant Pathology* 53(5): 541–547. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-3059.2004.01067.x>
- Barquero MM. 2013. Recomendaciones para el combate de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.). Tercera edición. Instituto del Café en Costa Rica. 63 p.
- Campbell R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University Press. New York, USA, 218 p.
- Canjura SEM, Sánchez GV, Krauss U y Somarriva E. 2002. Reproducción masiva de *Verticillium* sp. hiperparásito de la roya del café, *Hemileia vastatrix*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 66:1319. [https://www.researchgate.net/publication/324212242\\_Reproduccion\\_masiva\\_de\\_Verticillium\\_sp\\_hiperparasita\\_de\\_la\\_roya\\_del\\_cafe\\_Hemileia\\_vastatrix](https://www.researchgate.net/publication/324212242_Reproduccion_masiva_de_Verticillium_sp_hiperparasita_de_la_roya_del_cafe_Hemileia_vastatrix)
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M y Robledo CW; InfoStat versión 2016. Universidad Nacional de Córdoba. <http://www.infostat.com.ar>
- Esques A, Mendes MDL and Robbs CF. 1991. Laboratory and field studies on parasitism of *Hemileia vastatrix* with *Verticillium lecanii* and *V. leptobactrum*. *Café Cacao Thé*. 35(4): 275–282.
- García NG. 2018. Evaluación de la calidad y métodos de producción de bioplaguicidas para el manejo de *Hemileia vastatrix* en plantaciones de café. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Tesis de doctorado. Turrialba, Costa Rica. 62 p. [http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/8823/Evaluacion\\_de\\_la\\_calidad.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/8823/Evaluacion_de_la_calidad.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Gómez DCI, Pérez PE, Escamilla PE, Martínez BM, Carrion VGLL y Hernández LTI. 2017. Selección *in vitro* de micoparásitos con potencial de control biológico sobre roya del café (*Hemileia vastatrix*). *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1):172–183. <http://www.rmfm.smf.org.mx/ojs/index.php/RMF/article/view/93/90>
- Gouveia MMC, Ribeiro A, Várzea VMP and Rodríguez CJ. 2005. Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* base on RAPD markers. *Mycologia* 97(2):396–404. [http://www.academia.edu/5506510/Genetic\\_diversity\\_in\\_Hemileia\\_vastatrix\\_based\\_on\\_RAPD\\_markers](http://www.academia.edu/5506510/Genetic_diversity_in_Hemileia_vastatrix_based_on_RAPD_markers)
- Guharay F, Monterroso D and Staver C. 2001. El diseño y manejo de la sombra para la supresión de plagas en cafetales de América Central. *Agroforestería en las Américas* 8(29):22-29. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/publication/285079004\\_El\\_diseno\\_y\\_manejo\\_de\\_la\\_sombra\\_para\\_la\\_supresion\\_de\\_plagas\\_en\\_cafetales\\_de\\_America\\_Central](https://www.researchgate.net/publication/285079004_El_diseno_y_manejo_de_la_sombra_para_la_supresion_de_plagas_en_cafetales_de_America_Central)
- Haddad F, Maffia LA, Mizubuti ESG and Teixeira H. 2009. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. *Biological Control* 49(2):114-119. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964409000474>
- Jackson D, Zemenick K and Huerta G. 2012. Occurrence in the soil and dispersal of *Lecanicillium lecanii* a fungal pathogen of the green coffee scale (*Coccus viridis*) and coffee rust (*Hemileia vastatrix*). *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 15(2):389–401. <http://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/912/741>
- Kuske CR, Banton KL, Adorada DL, Stark PC, Gil KK and Jackson JP. 1998. Small – scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 64(7): 2463–2472.
- Lim SY, Lee S; Kong HG and Lee J. 2014. Entomopathogenicity of *Simplicillium lanosoniveum* isolated in Korea. *Mycobiology* 42(4):317-321. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4298834/>
- Mahfud MC, Mior AZA, Meon S and Kadir J. 2006. *In vitro* and *in vivo* tests for parasitism of *Verticillium psalliotae* Treschow on *Hemileia vastatrix* BERK. *And BR. Malaysian Journal of Microbiology*. 2(1):46-50. <http://mjm.usm.my/uploads/issues/117/research8.pdf>
- Monzón JA. 1992. Distribución de *Verticillium* sp. en tres zonas cafetaleras de Nicaragua y evaluación de dos aislamientos del hongo como agente de control biológico de la roya (*Hemileia vastatrix*) del cafeto (*Coffea arabica* L.). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Tesis de maestría. Turrialba, Costa Rica. 66 p.
- Morales A. 2008. A simple way to preserve fungal cultures. Cornell University. <https://blog.mycology.cornell.edu/2008/01/10/a-simple-way-to-preserve-fungal-cultures/>
- Pérez, V. L. 2015. La roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*) en Cuba: Evolución al manejo alternativo de la enfermedad. *In Memorias del Seminario Científico Internacional “Manejo Agroecológico de la Roya del Café”*. FAO. Panamá, Panamá p. 17-19. <http://www.fao.org/3/a-i5137s.pdf>
- Pico RJT. 2014. Efecto de la sombra del café y el manejo sobre la incidencia, severidad, cantidad de inóculo y dispersión de *Hemileia vastatrix* en Turrialba, Costa Rica. Thesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 65 p. [http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/7054/Efecto\\_de\\_la\\_sombra\\_del\\_cafe.pdf?sequence=4&isAllowed=y](http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/7054/Efecto_de_la_sombra_del_cafe.pdf?sequence=4&isAllowed=y)
- Promecafé (Programa Cooperativo Regional para el Desarrollo Tecnológico y la Modernización de la Caficultura); IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). 2013. La crisis del café en Mesoamérica. Causas y respuestas apropiadas. <http://promecafe.net/documents/Publicaciones/la%20roya%20en%20centroamerica.pdf>
- Rasband WS. 2016. ImageJ. National Institutes of Health, Bethesda. Maryland, USA. Disponible en línea: <https://imagej.net/ImageJ>
- Rivas, S; Leguizamón, J; Ponce, C. 1996. Estudio histológico, anatómico y morfológico de *Verticillium lecanii* y *Talaromyces wortmannii* con *Hemileia vastatrix*. *Cenicafé* 47(1):16–31.
- Rivillas OCA. 2015. Acciones emprendidas por Colombia en el manejo de la roya del cafeto. en Memorias del Seminario Científico Internacional “Manejo Agroecológico de la Roya del Café”. Panamá, Panamá. FAO. p. 11-16. <http://www.fao.org/3/a-i5137s.pdf>
- Suresh N, Ram AS and Shivanna MB. 2012. Coffee leaf rust and disease triangle: A Case Study. *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences* 2(2):50-55.
- Vandermeer J, Perfecto I and Liere H. 2009. Evidence for hyperparasitism of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) by

- entomogenous fungus, *Lecanicillium lecanii*, through a complex ecological web. *Plant Pathology* 58(4):636–641. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02067.x>
- Vélez APE y Rosillo GAG. 1995. Evaluación del antagonismo del hongo *Verticillium lecanii*, sobre *Hemileia vastatrix*, en condiciones de invernadero y de campo. *Cenicafé* 46(1): 45-55. <http://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/693>
- Virginio Filho EM. 2017. Cafetales sanos, productivos y ambientalmente amigables. Guía para trabajo con familias productoras. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 32 p. <http://www.iica.int/sites/default/files/publications/files/2018/BVE18029722e.pdf>
- Zare R and Gams W. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. *Nova Hedwigia* 73:1-50. [https://www.researchgate.net/profile/Rasoul\\_Zare/publication/279556292\\_A\\_revision\\_of\\_Verticillium\\_section\\_Prostrata\\_IV\\_The\\_genera\\_Lecanicillium\\_and\\_Simplicillium\\_gen\\_nov/links/5694de6408ae425c6897b3fd/A-revision-of-Verticillium-section-Prostrata-IV-The-genera-Lecanicillium-and-Simplicillium-gen-nov.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Rasoul_Zare/publication/279556292_A_revision_of_Verticillium_section_Prostrata_IV_The_genera_Lecanicillium_and_Simplicillium_gen_nov/links/5694de6408ae425c6897b3fd/A-revision-of-Verticillium-section-Prostrata-IV-The-genera-Lecanicillium-and-Simplicillium-gen-nov.pdf)