

Entrophospora colombiana, *Glomus manihotis* Y *Burkholderia cepacia* EN EL CONTROL DE *Rosellinia bunodes*, AGENTE CAUSANTE DE LA LLAGA NEGRA DEL CAFETO

Ángela María Castro-Toro*; Carlos Alberto Rivillas-Osorio**

RESUMEN

CASTRO T., A.M.; RIVILLAS O., C.A. *Entrophospora colombiana*, *Glomus manihotis* y *Burkholderia cepacia* en el control de *Rosellinia bunodes*, agente causante de la llaga negra del café. *Cenicafé* 53(3): 193-218. 2002.

Se evaluó el efecto de las micorrizas arbusculares en el control de la llaga negra del café en condiciones de invernadero dispuesto con polisombra, bajo un diseño completamente al azar al interior de tres grupos de plantas. Grupo 1 (agentes biocontroladores), grupo 2 (agentes biocontroladores con alta presión del patógeno) grupo 3 (agentes biocontroladores con baja presión del patógeno). Hubo mayor crecimiento de las plantas de café y valores más altos en los niveles de colonización en aquellos tratamientos donde se inoculó *G. manihotis* solo y en asociación con *E. colombiana*, con 42 y 43% de colonización radical, respectivamente. Luego de inoculado el patógeno, el promedio de colonización fue de 63% para *G. manihotis* + *R. bunodes* y 56% para la mezcla de las 2 MA + *R. bunodes*. *E. colombiana* y *B. cepacia* inoculadas individualmente estimularon el crecimiento de las plantas. La persistencia de la bacteria fue alta sola y asociada con las dos especies de MA y *R. bunodes*. No hubo diferencias entre tratamientos para la actividad metabólica del micelio de las MA, que mostró un rango de actividad hifal entre 60 y 77% en cada una de las especies evaluadas en los tres grupos de plantas evaluadas. Los cafetos inoculados con *R. bunodes* no mostraron la enfermedad. La información básica deberá complementarse en condiciones de campo.

Palabras claves: Café, enfermedades, control biológico, micorrizas

ABSTRACT

Under greenhouse conditions with 50% of shadow the effects of arbuscular mycorrhizas (AMF) on *Rosellinia bunodes* were evaluated, following a randomized design for each one of the three groups of plants. Group 1 (bio-controller agents); group 2 (bio-controller agents with the pathogen fungus by creating high inoculum's pressure of this latter on the plants); and group 3 (bio-controller agents with the pathogen fungus by creating low pathogen pressure on the plants). It was a greater growth of the coffee plants and higher values in the colonization levels in those treatments where *G. manihotis* was inoculated alone or in association with *E. colombiana*, showing 42% and 43% of radical colonization, respectively. After the pathogen inoculation the average of colonization was higher with 63% for *G. manihotis* + *R. bunodes* and 56% for the mixture of both Mycorrhizae + *R. bunodes*. Under the experiment conditions, *E. colombiana* and *B. cepacia* individually inoculated did not have a stimulator effect in the growth of the plants. The persistence of the bacterium was high when it was inoculated alone or in association with the two species of AMF and *R. bunodes*. Regarding the metabolic activity of mycelium of the AMF statistical differences between treatments were not detected. The plants inoculated with *R. bunodes* 5 months after the bio-controller agents (group 1 and group 2) and evaluated 3 months later, did not show any symptoms or signs of the disease. This information should be complemented under field conditions.

Keywords: Coffee, diseases, biological control, mycorrhizae

* Bacterióloga, M.Sc en Fitopatología, Universidad de Caldas.

** Asistente de Investigación. Fitopatología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

La llaga negra causada por *Rosellinia bunodes*, es una enfermedad de importancia económica en Colombia y en otros países productores de café, ya que el ataque es muy severo y una vez ha infectado el sistema radical de una planta, es muy difícil que el árbol pueda sobrevivir.

El uso de productos químicos ha traído consigo un desbalance en la biota nativa, residuos de fungicidas en las plantas y contaminación del medio ambiente; aspectos que han estimulado el manejo de esta enfermedad con microorganismos benéficos, con antecedentes de biocontroladores contra el ataque de numerosos patógenos radicales en diferentes cultivos.

Las Micorrizas Arbusculares (MA) ofrecen un amplio potencial biológico en la agricultura, ya que pueden ser utilizadas como agentes que mejoran la nutrición de la planta, sirven como agentes biocontroladores lo cual ha sido demostrado en diferentes experimentos en los cuales las plantas colonizadas por estos hongos son más tolerantes al ataque de numerosos patógenos. Además, promueven el desarrollo de las plantas.

Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* también han mostrado que poseen un alto potencial de antagonismo frente al ataque de diversos patógenos en diferentes cultivos; la bondad de esta clase de bacterias se debe en parte a la capacidad que tienen de producir componentes antimicrobiales (sideróforos y antibióticos) y enzimas extracelulares (quitinasas y β 1,3 gluconasa) (18).

El propósito de este estudio fue evaluar el efecto de *E. colombiana* y *G. manihotis* y la bacteria *B. cepacia* en el manejo de *R. bunodes* en plantas de café.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento. El estudio se realizó en Cenicafé, Chinchiná, Caldas, localizado a 1.400msnm, con una precipitación promedio anual de 2.125mm y una temperatura promedio de 21,5°C. Las plantas estuvieron durante el experimento en una casa de mallas dispuesta con polisombra a una altura de 1,40m por encima de las plantas, con el fin de facilitar el establecimiento y desarrollo del hongo patógeno luego de su inoculación. Durante la interacción de los agentes biocontroladores con el patógeno, se tuvo una temperatura promedio de 15°C con una humedad relativa del 93% en las horas de la mañana (7:00am) y una temperatura promedio de 23°C con una humedad relativa del 70% al medio día (12:00 meridiano).

Material vegetal - sustrato y riego. Para el desarrollo del experimento se emplearon chapolas de café de la variedad Colombia de 2 meses de germinadas las cuales se inocularon con *G. manihotis*, *E. colombiana* y la bacteria *B. cepacia* y se mantuvieron en invernadero durante 5 meses en materos de 3kg de capacidad; luego las plantas se transplantaron a bolsas de 5kg de capacidad para inocular el patógeno. El sustrato empleado fue suelo esterilizado de la Estación Central Naranjal, con 12% de materia orgánica, 60ppm de P y estructura franco-arcillosa. Durante el experimento las plantas recibieron riego oportuno (capacidad de campo) con agua destilada, evitando la sequedad del sustrato.

Microorganismos. En el experimento se evaluaron 4 microorganismos con marcadas diferencias en su modo de acción. El hongo patógeno *Rosellinia bunodes*, se aisló de raíces de plantas de café con síntomas y signos de la enfermedad (finca Santa Inés, Municipio Palestina). Las MA utilizadas fueron *Entrophospora colombiana* y *Glomus manihotis* aisladas de suelos cafeteros. También se utilizó la bacteria *Burkholderia cepacia* la cual

se aisló de raíces de plantas de café sanas (Cepa PC 9701).

Aislamiento y purificación de *Rosellinia bunodes*. Una vez obtenidas las raíces de plantas de café con síntomas y signos de la enfermedad, en el laboratorio de fitopatología de Cenicafé se procedió a realizar el aislamiento, purificación e incremento del patógeno y en las mismas condiciones del experimento se hicieron las pruebas de patogenicidad.

En condiciones de laboratorio las raíces infectadas se sembraron en el medio de cultivo agar extracto de malta (MEA) y se siguió la metodología empleada por Valencia (43).

Para la purificación de *R. bunodes* se realizaron continuos repiques de éste, en el medio de cultivo MEA. También durante el desarrollo del experimento se efectuaron sucesivas reactivaciones del hongo con el fin de mantenerlo patogénico.

Incremento del hongo patógeno. El incremento de *Rosellinia bunodes* se realizó a partir de una cepa pura, la cual se sembró en un erlenmeyer que contenía 60g de semilla de sorgo en 20ml de agua destilada, material que fue previamente esterilizado durante 2 horas. Esta siembra se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad hasta que el hongo cubriera por completo las semillas (10).

Trabajos realizados con *R. bunodes* por Restrepo (31), mostraron que 20 días después de sembrado el hongo en el sorgo, es el tiempo ideal para utilizarlo en las pruebas de patogenicidad.

Pruebas de patogenicidad de *Rosellinia bunodes*. Estas pruebas se realizaron a partir de un incremento de *R. bunodes* de 25 días de sembrado en sorgo. Por cada kilogramo de suelo se mezclaron 2, 4 y 8g de sorgo incrementado con el patógeno y se tuvo un

tratamiento testigo. Con estas mezclas se llenaron vasos de icopor de 375ml de capacidad y en cada uno de ellos se sembró una chapola de café. Las chapolas se dejaron en una casa de mallas y se evaluaron a los 15 y 30 días.

Tinción de raíces. La tinción de raíces para medir el porcentaje de colonización por parte de las MA se efectuó utilizando la técnica de Phillips y Hayman (29); modificada por Rivillas (32).

Desarrollo del experimento. Una vez que las plantas de café fueron colonizadas por las MA y la bacteria *B. cepacia* (5 meses), éstas se inocularon con *R. bunodes* con el propósito de determinar el efecto de estos agentes biocontroladores y sus interacciones sobre el patógeno. De esta manera, se dispuso de tres grupos de plantas. El primero correspondió a los tratamientos con los agentes biocontroladores solamente. El segundo y tercer grupo correspondieron a los tratamientos con los agentes biocontroladores y el patógeno.

Los tratamientos evaluados en este experimento se presentan en la Tabla 1.

- Inoculación de las micorrizas arbusculares. Para la inoculación de las chapolas se utilizaron 30g de inóculo completo de cada especie de MA. El inóculo de *E. colombiana* contenía 28 esporas/g de suelo y 31% de colonización radical en los fragmentos de raíz; en tanto que el inóculo de *G. manihotis* tuvo 90 esporas/g de suelo y 98% de colonización radical. En la parte superior de la bolsa se hizo el orificio de siembra y en éste se colocó el inóculo de cada micorriza arbuscular (momento de la siembra) para dejarlo en íntimo contacto con las raíces de las chapolas de café (32).

- Inoculación de *Burkholderia cepacia*. Las raíces de las chapolas de café que se inocularon con la bacteria se sumergieron en un recipiente que contenía leche descremada estéril

Tabla 1. Descripción de tratamientos

Tratamiento	Sustrato	<i>E. colombiana</i>	<i>G. manihotis</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>R. bunodes</i>	
1	1	MS	—	—	—	
2	1	MS	—	MS	—	
3	1	MS	MS	—	—	
4	1	MS	MS	MS	—	
5	1	—	MS	—	—	
6	1	—	MS	MS	—	
7	1	—	—	MS	—	
8	1	MS	—	—	150*	
9	1	MS	—	MS	150*	
10	1	MS	MS	—	150*	
11	1	MS	MS	MS	150*	
12	1	—	MS	—	150*	
13	1	—	MS	MS	150*	
14	1	—	—	MS	150*	
15	1	MS	—	—	150**	
16	1	MS	—	MS	150**	
17	1	MS	MS	—	150**	
18	1	MS	MS	MS	150**	
19	1	—	MS	—	150**	
20	1	—	MS	MS	150**	
21	1	—	—	MS	150**	
22	1	Testigo (Sustrato esterilizado)				
23	1	Testigo (Sustrato nativo)				

MS : Momento de siembra: Sistema de inoculación uno * Sistema de inoculación dos **

al 5% con la suspensión bacteriana (concentración de 10^9 bacterias /ml de agua). Éstas estuvieron en agitación a 110rpm durante 24h. Luego se sembró cada chapola en el matero (8).

- Inoculación de *Rosellinia bunodes*. Simultáneamente a la inoculación de *R. bunodes* en las plantas del experimento, se inocularon 30 chapolas de café con sus respectivos testigos con el fin de confirmar la patogenicidad del hongo en chapolas de café. La inoculación del patógeno se realizó empleando dos sistemas diferentes. Con base en los resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad para determinar la dosis, se utilizaron 4g de inóculo por kilogramo de suelo, por ser la dosis

que mostró resultados de mortalidad a los 15 días de inoculadas las chapolas (88%) similares a la dosis de 8g/kg de suelo la cual tuvo 90% de mortalidad. La dosis de 2g/kg de suelo mostró la más baja mortalidad (58%).

SISTEMA 1

Las plantas de café previamente inoculadas con las dos MA y la bacteria, se transplantaron a bolsas plásticas y una vez realizada la siembra se les removió el suelo alrededor de la planta a diferentes profundidades, con el fin de dejar el inóculo de *R. bunodes* (4g de inóculo/kg de sustrato) en la rizosfera de esas plantas de café. Con este sistema de inocula-

ción se crearon unas condiciones de mayor presión del patógeno sobre las raíces colonizadas por los diferentes agentes biocontroladores.

SISTEMA 2

Las plantas de café previamente inoculadas con los agentes biocontroladores se transplantaron a la bolsa con el pilón de suelo que traían del matero de 3kg (siembra original) y el complemento de suelo fue la mezcla de éste con el inóculo del patógeno (4g de inóculo/kg de sustrato). Este inóculo se colocó alrededor de la rizosfera de la planta transplantada. Con este sistema de inoculación se buscó favorecer el efecto protector de los agentes biocontroladores sobre la planta.

Las plantas de café inoculadas con *R. bunodes* y los agentes biocontroladores permanecieron en la casa de mallas durante 3 meses.

Determinación del porcentaje de colonización.

Por cada planta evaluada (unidad experimental) se prepararon 3 placas en las que se colocaron 5 trozos de raíces por cada placa. Las raíces se observaron al microscopio de luz en 10X para contar los campos colonizados con algunas de las estructuras de las MA (hifa, arbusculos, vesículas, esporas) y los campos sin colonizar. En algunas ocasiones se utilizaron los objetivos 40X y 100X (con aceite de inmersión) para detallar las diferentes estructuras de las MA.

Actividad de la enzima succinato dehidrogenasa en la hifa de las MA. La actividad de la enzima succinato dehidrogenasa se realizó usando el método descrito por Hamel *et al.* (16).

Reaislamiento de la bacteria. Para realizar el reaislamiento de *B. cepacia* a partir de las raíces de las plantas de café se siguió la metodología empleada por Cárdenas (8).

Porcentaje de raíces afectadas por el hongo patógeno. El porcentaje de raíces infectadas por *R. bunodes* se efectuó usando una escala (9) con valores de 0 a 5, así:

- Grado 0: Sistema radical sano
- Grado 1: Sistema radical afectado 20%
- Grado 2: Sistema radical afectado 40%
- Grado 3: Sistema radical afectado 60%
- Grado 4: Sistema radical afectado 80%
- Grado 5: Sistema radical muerto.

Para seguridad de la observación de los síntomas y signos de la enfermedad, se evaluaron al estereoscopio todas las raíces de las plantas inoculadas con el patógeno.

Transcurridos 3 meses de inoculado *R. bunodes*, se realizó la evaluación de todos los tratamientos con el fin de determinar los niveles de colonización de las MA, el crecimiento y desarrollo de las plantas, la persistencia de la bacteria en la rizosfera y el grado de infección radical por parte del patógeno.

Variables evaluadas

- Colonización de raíces por las MA (%).
- Actividad metabólica del micelio de las MA (%).
- Raíces atacadas por *R. bunodes* (%).
- Persistencia de *B. cepacia* (UFC/g de suelo)
- Crecimiento de la planta de café (área foliar, peso fresco de raíz y parte aérea).

La cuantificación de las variables se realizó a través de un muestreo destructivo de cada unidad experimental.

Diseño experimental y análisis estadístico. El diseño que se utilizó en el experimento fue completamente al azar al interior de los 3 grupos de plantas que se conformaron. Se utilizó un análisis de varianza para las variables porcentaje de colonización, actividad metabólica de la hifa y crecimiento de las plantas. La com-

paración de promedios entre tratamientos y la detección de diferencias estadísticas entre ellos se hizo a través de la prueba de Tukey al 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación del grupo 1. En la Tabla 2, se aprecian los resultados obtenidos (valores transformados a Log 10) en el crecimiento de las plantas en los tratamientos donde se inocularon los agentes biocontroladores. Se detectaron di-

ferencias estadísticas entre tratamientos, con valores más altos en el crecimiento de las plantas de café en los tratamientos donde se inoculó *G. manihotis* solo (Figura 1) y en asociación con *E. colombiana* (Figura 2). Con la mezcla de las MA se obtuvo un peso fresco de raíz de 4.83g y 13,14g de peso fresco aéreo valores altamente contrastantes con los obtenidos por las plantas testigo que fueron de 0,68 y 1,23g, respectivamente (Tabla 2), mostrando de esta forma; la eficacia de estos hongos para estimular el crecimiento de las plantas. Fue im-

Tabla 2. Variables de crecimiento en plantas de café, 8 meses después de inoculadas con *E. colombiana*, *G. manihotis* y *B. cepacia*.

TRATAMIENTO	PESO FRESCO (g)**		ÁREA FOLIAR (cm ²) **
	RAÍZ	AÉREO	
<i>Entrophospora colombiana</i>	0,75 c*	1,46 b	55 b
<i>E. colombiana</i> + <i>B. cepacia</i>	0,70 c	1,50 b	57 b
<i>E. colombiana</i> + <i>G. manihotis</i>	4,83 a	13,14 a	517 a
<i>E. c</i> + <i>G. m</i> + <i>B. c</i>	2,60 ab	8,22 a	361 a
<i>Glomus manihotis</i>	3,66 ab	9,73 a	415 a
<i>G. manihotis</i> + <i>B. cepacia</i>	3,15 ab	8,72 a	368 a
<i>Burkholderia cepacia</i>	0,65 c	1,16 b	37 b
Testigo (Suelo estéril)	0,68 c	1,23 b	48 b
Testigo (Suelo nativo)	2,44 b	6,77 a	318 a

* Letras iguales comparan igualdad estadística según Tukey al 5%

** Datos transformados a Log 10



Figura 1. Crecimiento de las plantas de café, 8 meses después de la inoculación con *G. manihotis*



Figura 2.
Crecimiento de las plantas de café, 8 meses después de la inoculación con *E. colombiana* + *G. manihotis*.

portante apreciar el desarrollo aéreo de las plantas en los tratamientos donde se inoculó *G. manihotis*, con un área foliar de 415cm², mientras las plantas testigo solamente tuvieron 48cm² de área foliar (Tabla 2). En este estudio, *G. manihotis* tuvo un buen comportamiento en las plantas, lo cual se detectó en un mayor crecimiento de éstas, comparado con las plantas testigo y las inoculadas con *E. colombiana* o con *B. cepacia* (Tabla 2).

Con los resultados obtenidos en este trabajo se confirma la eficacia y efectividad de esta especie al colonizar raíces de plantas de café (1, 25, 28, 34, 39). Parra *et al.* (28), demostraron que *G. manihotis* en cultivos de café var. Colombia, estimuló el crecimiento y favoreció el desarrollo vegetativo de las plantas de café comparado con las plantas testigo. Igualmente Rivillas (32), encontró que *G. manihotis* fue la especie más efectiva en cuanto a incrementar el crecimiento y desarrollo de las variedades Colombia y Caturra comparada con *Scutellospora heterogama* y *Acaulospora tuberculata*, bajo condiciones de invernadero. En la presente investigación, los tratamientos donde se inoculó *E. colombiana* sola y en combinación con *B. cepacia*, no mostraron

diferencias estadísticas entre tratamientos, siendo evidente la escasa influencia que tuvieron las interacciones de estos dos microorganismos en el crecimiento de las plantas de café. *E. colombiana* es un microorganismo que necesita de sustratos mejorados y suelos ácidos (mezclados con arena) para su establecimiento y desarrollo en las plantas (14, 25, 33, 44).

E. colombiana presentó un limitado desempeño como estimulante del crecimiento de las plantas, resultado observado en las 3 variables de crecimiento evaluadas, 8 meses después de la inoculación con este hongo (Figura 3). En la Tabla 2, se aprecia que no hubo diferencias estadísticas en el crecimiento de las plantas que se inocularon con *E. colombiana* (peso fresco de raíz 0,75g y peso fresco de parte aérea 1,46g) y las plantas testigo (peso fresco de raíz 0,68g y peso fresco de parte aérea 1,23g). Las condiciones físicas del suelo de no ir mezclado con otro sustrato que mejorara sus condiciones, no favorecieron el desarrollo de esta MA, mostrándola como la especie más afectada y con mayores limitaciones como estimuladora del crecimiento de plantas de café. Igualmente, los contenidos de P, Na, Fe y Al

Figura 3.
Crecimiento de las
plantas de café, 8
meses después de
la inoculación con
E. colombiana.



de este suelo no fueron los más adecuados para el establecimiento de esta MA.

Un grupo de plantas testigo sembradas en el suelo nativo, mostraron un notable crecimiento, reflejado en un mayor peso fresco de raíz y parte aérea y el área foliar, comparado con las plantas testigo sembradas en suelo esterilizado (Tabla 2; Figura 4). De esta forma se confirma que en un suelo sin esterilizar hay especies nativas de MA adaptadas a esas condiciones. Estas especies tuvieron 54% de colonización radical (Tabla 3) y promovieron el crecimiento de las plantas de café, demostrando que la complementariedad de especies nativas de MA proporcionan un beneficio para las plantas. Al identificar las especies nativas presentes en este suelo se encontraron esporas pertenecientes a los géneros *Glomus* spp., *Sclerocystis* spp. y *Acaulospora* spp.

Las plantas de café inoculadas con *B. cepacia* no mostraron diferencias estadísticas entre tratamientos con respecto a las variables de crecimiento, comparadas con las plantas testigo. Cárdenas (8), obtuvo resultados similares cuando inoculó *B. cepacia* (PC 9701) en chapolas de café var. Colombia. Ese autor encontró que plantas inoculadas con la bac-

teria no mostraron diferencias estadísticas con respecto al tratamiento testigo. Las plantas de café a los 60 días de inoculadas con la bacteria presentaron un crecimiento limitado (peso fresco de chapola 1,54g) comparadas con las plantas que no fueron inoculadas (peso fresco de chapola 0,84g).

En este estudio se apreció el escaso crecimiento de las plantas en aquellos tratamientos donde se inoculó solamente la bacteria. Ya se había demostrado que la actividad estimuladora del crecimiento y de competencia de *Pseudomonas* spp. en la rizosfera de las plantas se aumenta en suelos mejorados con otras clases de sustratos, en especial con arena (17, 19, 20, 21, 24). Sin embargo, respecto al crecimiento de las plantas inducido por la bacteria existen ciertas controversias. Blacol *et al.* (6), encontraron que las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* producen sideróforos que es un mecanismo para promover el crecimiento de las plantas. Estos sideróforos son compuestos bacterianos que compiten con los microorganismos patógenos por hierro (Fe), por tanto, al tomar el Fe presente en el suelo, se reduce la cantidad disponible para los patógenos allí presentes disminuyendo su agresividad en el ataque hacia

Tabla 3. Porcentaje de colonización en raíces de plantas de café, 8 meses después de la inoculación con *E. colombiana*, *G. manihotis* y *B. cepacia*.

Tratamiento	Colonización (%) **
<i>Entrophospora colombiana</i>	17 c*
<i>E. colombiana</i> + <i>B. cepacia</i>	17 c
<i>E. colombiana</i> + <i>G. manihotis</i>	43 ab
<i>E. c</i> + <i>G. m</i> + <i>B. c</i>	32 b
<i>Glomus manihotis</i>	42 ab
<i>G. manihotis</i> + <i>B. cepacia</i>	33 ab
<i>Burkholderia cepacia</i>	—
Testigo (Suelo estéril)	0
Testigo (Suelo nativo)	54 a

* Promedios con letras iguales no presentan diferencia estadística. Tukey al 5%

** Datos transformados a Log 10



Figura 4. Tratamiento testigo (suelo esterilizado), 8 meses después de sembradas las plantas de café

la planta. De este modo las bacterias facilitan la toma de Fe por parte de la planta; permitiendo que las plantas se desarrollen mejor sin la presencia de agentes microbianos perjudiciales para ellas. Estos conceptos son compartidos por Hebbar *et al.* (17), quienes observaron en condiciones *in vitro* que *B. cepacia* promovió el crecimiento de plantas de maíz. Leben *et al.* (23), observaron en condiciones de invernadero que *P. fluorescens* inoculada en semillas de papa no mostró diferencias significativas en cuanto al crecimiento entre los

tratamientos inoculados y sin inocular. Todos estos resultados indican que las condiciones en las que se realiza un experimento, especialmente el sustrato y la condición ambiental, juegan un papel muy importante en la asociación y beneficio de las plantas con los microorganismos.

B. cepacia sola y asociada con las dos especies de MA, mostró una alta persistencia ocho meses después de inoculada en las chapolas de café. Esta persistencia se deter-

minó al obtener fácilmente su aislamiento en un medio de cultivo para *Pseudomonas* (agar P) (Figura 5) a partir de las raíces inoculadas. También se observó su alto efecto de sinergismo con *G. manihotis* y *E. colombiana*, reflejado en el establecimiento de los 3 microorganismos en la rizosfera de las plantas de café. Existen evidencias que las bacterias promotoras del crecimiento como *Pseudomonas putida* y *P. fluorescens* actúan en forma de sinergia con algunas especies de MA (42). Blancel *et al.* (6), mencionan que el efecto es mayor si los microorganismos se inoculan simultáneamente al momento de la siembra de las plantas, tal como se realizó en esta investigación.

Algunos estudios han comprobado que las rizobacterias, en especial las pertenecientes al género *Pseudomonas* tienen un efecto estimulador en el establecimiento de las ecto y las endomicorrizas. Frey-Klett *et al.* (12), evaluaron la ectomicorriza *Laccaria bicolor* y la bacteria *P. fluorescens* inoculadas en pinos. Los autores plantean algunas hipótesis relacionadas con el efecto de la estimulación de la bacteria hacia la micorriza. Una primera

hipótesis hace referencia al hecho que la bacteria puede actuar cuando las MA ya se han establecido. Una segunda hipótesis sugiere que la bacteria puede actuar las primeras 5 semanas mejorando la receptividad de la raíz hacia el hongo y una tercera hipótesis plantea que puede existir un efecto temprano de la bacteria sobre el desarrollo presimbótico del hongo. En el presente estudio, se considera que estos aspectos pudieron jugar un papel importante en la relación de las dos especies de MA con la bacteria y de esta forma consolidar el efecto de sinergismo entre estos microorganismos.

Los niveles de colonización mostraron diferencias estadísticas entre las plantas inoculadas con *E. colombiana*, *G. manihotis* y con la mezcla de ambas MA. Estas diferencias fueron constantes durante todo el experimento, resultando los tratamientos con *G. manihotis* y con la mezcla los de más altos porcentajes de colonización (Tabla 3).

Los tratamientos con *E. colombiana* y *G. manihotis* no mostraron diferencias estadísticas con los tratamientos donde se inocularon los 3 agentes biocontroladores. En ambos casos,

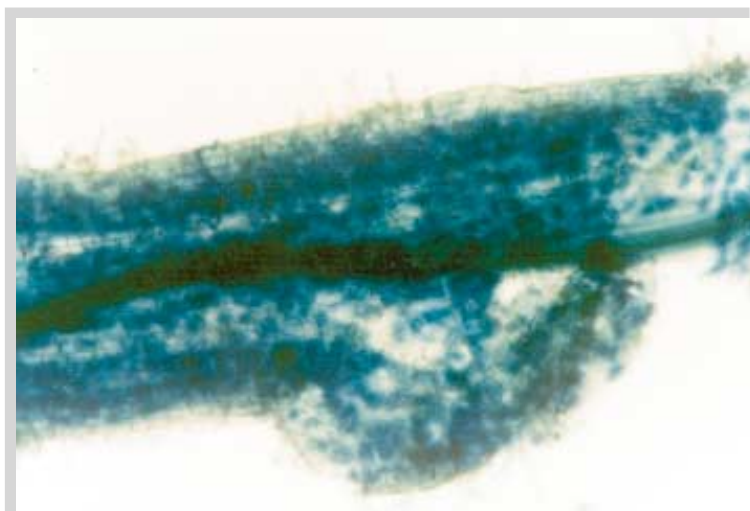


Figura 5.

Persistencia de la bacteria en asociación con las dos especies de MA, 8 meses después de la colonización (crecimiento en agar P después de 24 horas).

el porcentaje de colonización fue similar, 43% de colonización radical para *E. colombiana* + *G. manihotis* y 32% de colonización radical para *E. colombiana* + *G. manihotis* + *B. cepacia* (Tabla 3). Estos resultados muestran que la bacteria no influyó negativamente en el establecimiento de las MA, confirmando el sinergismo de los tres microorganismos.

Los tratamientos donde se inocularon *G. manihotis* y *B. cepacia* tuvieron 33% de colonización radical y no mostraron diferencias estadísticas con los inoculados sólo con *G. manihotis* (42% de colonización radical). La asociación de la bacteria con *G. manihotis*, no perturbó el grado de colonización de esta MA.

E. colombiana no mostró diferencias estadísticas en el grado de colonización, sola y en asociación con *B. cepacia* (en ambos casos tuvo 17% de colonización radical), resultado que demuestra nuevamente que la asociación

de la bacteria con cualquiera de las dos especies de MA no afectó su establecimiento en las raíces de las plantas de café. Bianciotto *et al.* (5), encontraron *Pseudomonas* adheridas a las hifas y a las esporas germinadas de micorrizas arbusculares bajo condiciones de sustrato esterilizado. Este grado de asociación o compatibilidad varía con el aislamiento bacterial y sugieren los autores que el grado de antagonismo o sinergismo en las interacciones entre MA y bacterias puede estar mediado por el contacto físico entre ellos.

La evaluación de los niveles de colonización radical en todos los tratamientos mostró una gran producción de arbusculos y en menor proporción micelio interno (Figura 6). Los arbusculos son las estructuras esenciales en la simbiosis de las MA con las plantas, ya que a través de estas estructuras se realizan los intercambios de metabolitos entre la planta y el hongo.

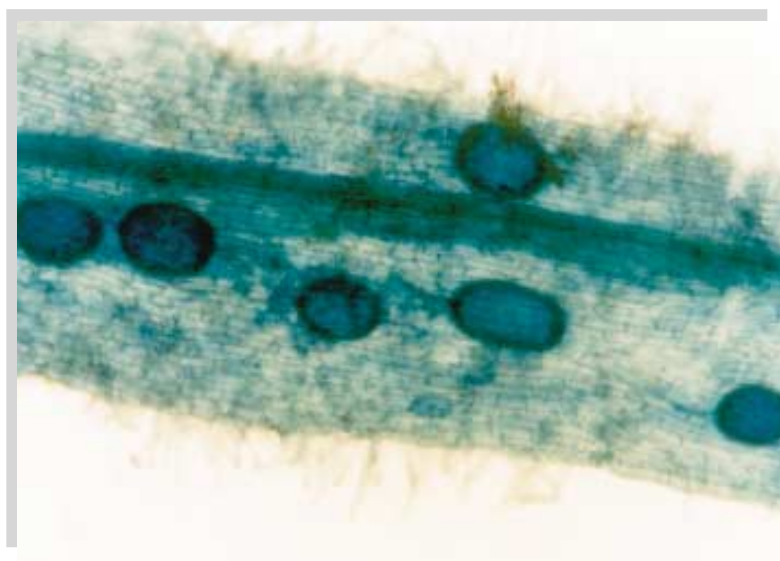


Figura 6.
Presencia de arbusculos
en las raíces de las
plantas de café
inoculadas con *E.*
colombiana + *G.*
manihotis (40X).

Las plantas correspondientes al tratamiento testigo en el cual no se inoculó ningún microorganismo, sembradas en el suelo nativo, mostraron un alto grado de colonización (54%), resultado que indica la presencia y el efecto de las MA nativas en este suelo y las posibles asociaciones con otros microorganismos los cuales no fueron valorados en este estudio. En estas plantas, ese nivel de colonización repercutió en un mayor crecimiento de ellas, comparadas con las plantas testigos sembradas en suelo esterilizado.

La evaluación de la actividad metabólica del micelio de *E. colombiana* y *G. manihotis* (Tabla 4), no mostró diferencias estadísticas entre tratamientos, obteniéndose altos niveles de actividad en todos los tratamientos evaluados (mayores del 60%).

En la asociación de las dos especies de MA con la bacteria se observaron altos niveles de actividad de la hifa, resultados que coinciden con los trabajos realizados por Gryndler y Vosatka (15), Barea *et al.* (3), Ravnskov y Jakobsen (30), quienes mencionan que *Pseudomonas* spp. no exhibe una

actividad inhibitoria contra especies de MA y por el contrario, las bacterias presentan un efecto estimulador en el desarrollo del micelio y esporas de estos hongos. También indican que las bacterias tienen un efecto estimulador en la actividad dehidrogenasa de algunas especies de MA.

Al observar las hifas se apreció una mayor actividad de las hifas de *G. manihotis* comparadas con la actividad de las hifas de *E. colombiana* (Figuras 7, 8 y 9), corroborando de esta manera que *G. manihotis* fue una especie efectiva en las raíces de plantas de las café al extender sus hifas y el micelio al exterior de las raíces para tomar los nutrimentos necesarios y mejorar la nutrición de las plantas. En este estudio se apreció que algunas hifas no presentaron actividad. Saito *et al.* (36), demostraron en raíces de cebolla inoculadas con *Glomus mosseae*, que la actividad de la hifa dentro de la raíz no fue homogénea y sugieren que las hifas viejas son mucho menos activas fisiológicamente que las hifas más jóvenes. Por tal motivo, las hifas fisiológicamente activas son las que tienen una mayor capacidad de tomar los metabolitos del

Tabla 4. Actividad metabólica del micelio de *E. colombiana* y *G. manihotis* en raíces de plantas de café, 8 meses después de su inoculación.

Tratamiento	Actividad metabólica (%)
<i>Entrophospora colombiana</i>	64 a*
<i>E. colombiana</i> + <i>B. cepacia</i>	62 a
<i>E. colombiana</i> + <i>G. manihotis</i>	61 a
<i>E. c</i> + <i>G. m</i> + <i>B. c</i>	63 a
<i>Glomus manihotis</i>	64 a
<i>G. manihotis</i> + <i>B. cepacia</i>	53 a
<i>Burkholderia cepacia</i>	—
Testigo (Suelo estéril)	—
Testigo (Suelo nativo)	0 b

* Promedios con letras iguales no presentan diferencia estadística. Tukey al 5%

Figura 7. Actividad metabólica de las hifas de *G. manihotis*, 8 meses después de la inoculación. (100x).

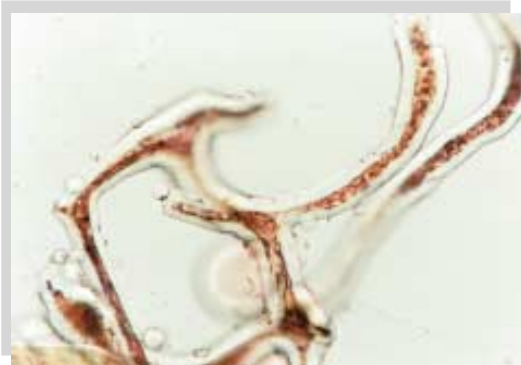


Figura 8. Espora de *G. manihotis* con su hifa mostrando una actividad de 100% (40X).



Figura 9. Actividad metabólica de las hifas de *E. colombiana*, 8 meses después de la inoculación. (100x).

suelo y llevarlos al interior del hongo para realizar la translocación de minerales hacia la planta por medio de los arbusculos.

Evaluación del grupo 2. Se observó que el crecimiento de las plantas no se vio afectado cuando se inoculó el patógeno utilizando el sistema 1, en los tratamientos con *G. manihotis* y en asociación con *E. colombiana* (Tabla 5; Figura 10).

Las plantas inoculadas con *E. colombiana* y con *R. bunodes* continuaron presentando el limitado efecto estimulador de la MA en el crecimiento de las plantas, con resultados similares a los obtenidos en el Grupo 1 donde no se inoculó el patógeno. En todas las va-

riables de crecimiento evaluadas, la unión de esta MA con el patógeno no mostró diferencias estadísticas con las plantas testigo en suelo esterilizado (Tabla 5).

G. manihotis evidenció nuevamente que es una especie que induce el crecimiento de las plantas, a pesar de la asociación con el patógeno. Este resultado es importante por cuanto muestra a esta especie con otro atributo como es su efecto protector de raíces de plantas de café frente al ataque de *R. bunodes*. La inoculación con este patógeno no fue un impedimento para que las plantas continuaran su desarrollo normal. Este desarrollo de las plantas inoculadas con *G. manihotis* y con el hongo patógeno, se reflejó en el peso fresco de raíz

Figura 10.
Crecimiento de las plantas de café, 8 meses después de inoculados los agentes biocontroladores y 3 meses después de la inoculación con *R. bunodes* (Sistema 1).



Tabla 5. Variables de crecimiento en plantas de café, 8 meses después de inoculados los agentes biocontroladores y 3 meses después de la inoculación con *R. bunodes* (Sistema 1 y 2).

Sistema inoculación	Tratamiento	Peso Fresco (G)		Área Foliar (Cm ²) **
		Raíz	Aéreo	
1	<i>E. colombiana</i> + <i>R. bunodes</i>	0,63 d*	1,20 c	54 c
	<i>E. c</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	0,81 cd	1,59 c	49 c
	<i>E. c</i> + <i>G. m</i> + <i>R. bunodes</i>	6,02 ab	13,68 a	493 ab
	<i>E. c</i> + <i>G. m</i> + <i>B. c</i> + <i>R. b</i>	2,48 abc	7,39 ab	297 ab
	<i>G. manihotis</i> + <i>R. bunodes</i>	6,51 ab	14,90 a	548 a
	<i>G. m</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	5,32 ab	9,73 ab	475 a
	<i>B. cepacia</i> + <i>R. bunodes</i>	2,29 bcd	4,03 bc	185 bc
	Testigo (Suelo estéril)	0,68 d	1,23 c	48 c
	Testigo (Suelo nativo)	2,44 abc	6,77 ab	318 ab
2	<i>E. colombiana</i> + <i>R. bunodes</i>	1,14 de	2,74 cd	120 bc
	<i>E. c</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	0,67 e	1,34 cd	54 c
	<i>E. c</i> + <i>G. m</i> + <i>R. bunodes</i>	6,23 a	16,33 a	620 a
	<i>E. c</i> + <i>G. m</i> + <i>B. c</i> + <i>R. b</i>	1,85 cd	7,24 ab	342 a
	<i>G. manihotis</i> + <i>R. bunodes</i>	5,30 ab	13,55 a	505 a
	<i>G. m</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	1,41 cde	4,33 bc	231 ab
	<i>B. cepacia</i> + <i>R. bunodes</i>	0,82 de	1,02 d	61 bc
	Testigo (Suelo estéril)	0,68 e	1,23 d	48 c
	Testigo (Suelo nativo)	2,44 bc	6,77 ab	318 a

* Promedios con letras iguales no presentan diferencia estadística. Tukey al 5%

** Datos transformados a Log 10.

y aéreo con valores de 6,51g y 14,90g, respectivamente; comparado con el testigo en sustrato esterilizado que tuvo valores de 0,64g en el peso fresco de raíz y 1,23g en el peso fresco aéreo (Tabla 5). Al comparar el tratamiento de *G. manihotis* + *R. bunodes* con los valores obtenidos por esa MA en el Grupo 1, donde obtuvo 3,66g en el peso fresco de raíz y 9,73g en el peso fresco aéreo (Tabla 2), se aprecia que hubo un mayor crecimiento de las plantas inducido por esta MA cuando se asoció con el patógeno, lo cual abre la posibilidad de que el sustrato de inoculación del patógeno (sorgo) pudo servir como base alimenticia para las MA, potencializando su acción en las plantas de café.

B. cepacia mezclada con el patógeno no mostró diferencias estadísticas en las variables de crecimiento respecto a las plantas testigo en el suelo esterilizado (Tabla 5). En este estudio, la bacteria no cumplió un papel relevante en la estimulación del crecimiento de las plantas; sin embargo, fue evidente que la presencia de ésta, al inocular el patógeno, contribuyó al crecimiento de las plantas, ya que éstas tuvieron un mayor crecimiento (peso fresco de raíz 2,29g y peso fresco aéreo 4,03g) que las plantas testigo en suelo esterilizado (peso fresco de raíz 0,68g y peso fresco aéreo (Tabla 5).

La persistencia de *B. cepacia* continuó siendo alta, a pesar de la incorporación del hongo patógeno. Este es un aspecto fundamental ya que abre una perspectiva importante para trabajar con esta bacteria protegiendo raíces de plantas de café frente al ataque de *R. bunodes*.

En este Grupo 2, donde hubo una mayor presión del inóculo del patógeno hacia las raíces y también hacia los agentes biocontroladores, se demostró que los tres agentes biocontroladores presentes en el sistema radical de las plantas, ocuparon gran parte de las raíces evitando la penetración de *R. bunodes*.

Igualmente, en este grupo la variable colonización, no mostró diferencias estadísticas entre tratamientos. Sin embargo, el testigo nativo mostró diferencias estadísticas con los demás tratamientos, demostrando la gran importancia de las MA nativas y su rol cuando no se modifican las condiciones que le son favorables. Conviene tener presente que estos microorganismos son habitantes nativos de los suelos, lo cual, sin embargo, no implica que ellos puedan formar simbiosis con todas las plantas o que en determinados momentos algunas condiciones ambientales o del suelo no los limiten en el desarrollo de los diferentes sucesos que se registran entre los simbioses. También se observó, que en presencia del patógeno se aumentaron los niveles de colonización (Tabla 6), comparados con los niveles obtenidos en los tratamientos sin *R. bunodes* (Tabla 3). Las MA necesitan de fuentes nutritivas para su desarrollo (38, 44); por ello es factible que el sorgo utilizado como sustrato para inocular el patógeno haya servido como base alimenticia para estos hongos a través de su proceso de biotransformación y de esta manera, se haya potencializado su efecto produciendo mayores niveles de colonización en presencia del patógeno. Las plantas testigo en suelo nativo, sin la presencia del patógeno, mostraron un mayor grado de colonización radical corroborando lo discutido anteriormente; sobre la adaptabilidad que tuvieron las MA nativas en el suelo de Naranjal, con 54% de colonización radical, valor considerado alto comparado con los demás tratamientos (Tabla 6).

El sinergismo presentado entre las dos especies de MA en términos de protección de las raíces, fue importante, ya que se demostró; luego de inocular a *R. bunode*, que el porcentaje de colonización radical no disminuyó con la asociación de las dos especies de MA (sin la presencia del patógeno 43%) (Tabla 3); (con la presencia del patógeno 45%) (Tabla 6),

Tabla 6. Porcentaje de colonización en raíces de plantas de café, 8 meses después de la inoculación con *E. colombiana*, *G. manihotis* y *B. cepacia* y 3 meses después de la inoculación con *R. bunodes* (sistema uno y dos).

Sistema	Tratamiento	Sistema de inoculación	Colonización (%) **
1	<i>E. colombiana</i> + <i>R. bunodes</i>	1	24 b*
	<i>E. c</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	1	18 b
	<i>E. c</i> + <i>G. m</i> + <i>R. bunodes</i>	1	45 ab
	<i>E. c</i> + <i>G. m</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	1	42 ab
	<i>G. manihotis</i> + <i>R. bunodes</i>	1	34 ab
	<i>G. m</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	1	33 ab
	<i>B. cepacia</i> + <i>R. bunodes</i>	1	—
	Testigo (Suelo estéril)	1	0
	Testigo (Suelo nativo)	1	54 a
2	<i>E. colombiana</i> + <i>R. bunodes</i>	2	24 b
	<i>E. c</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	2	19 b
	<i>E. c</i> + <i>G. m</i> + <i>R. bunodes</i>	2	56 a
	<i>E. c</i> + <i>G. m</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	2	41 a
	<i>G. manihotis</i> + <i>R. bunodes</i>	2	63 a
	<i>G. m</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	2	40 a
	<i>B. cepacia</i> + <i>R. bunodes</i>	2	—
	Testigo (Suelo estéril)	2	0
	Testigo (Suelo nativo)	2	54 a

* Promedios con letras iguales no presentan diferencia estadística. Tukey al 5%

** Datos transformados a Log 10.

resultado que demuestra la complementariedad de las dos especies de MA para proteger el sistema radical de plantas de café.

Al evaluar la variable colonización se observó que en los tratamientos donde no se inoculó el patógeno, no hubo presencia de vesículas, propágulos de reserva de las MA (reservas de carbono en forma de lípidos), mientras que en los tratamientos donde se inoculó *R. bunodes* se observaron vesículas (Figura 11), aspecto que indica que el patógeno al competir por espacio y nutrición con las MA en las raíces de las plantas, propició una condición de estrés que se reflejó en la producción de propágulos de reserva por parte de estos hongos.

G. manihotis a pesar de estar en contacto con el patógeno; presentó altos niveles de

colonización superiores a *E. colombiana*, confirmando que se trata de una especie agresiva que coloniza raíces de plantas de café, con mayor adaptación que *E. colombiana* a las condiciones del suelo de Naranjal. El suelo de Naranjal tiene alto contenido de fósforo (60 ppm), cifra que históricamente ha sido más baja, condición que pudo originarse por el manejo agronómico de ese lote (aplicación de fertilizantes). Este aspecto pudo influir en el comportamiento de *E. colombiana* en el presente trabajo. Algunos autores han mencionado, que los altos contenidos de este elemento en el suelo causan detrimento en el funcionamiento de las MA (42).

Las dos especies de MA *G. manihotis* y *E. colombiana* inoculadas individualmente y en asociación, mostraron niveles altos de ac-

Figura 11.
Vesículas en las raíces de
las plantas de café,
inoculadas con *E.*
colombiana + *G.*
manihotis y *R. bunodes*
(40X).



tividad metabólica de las hifas, similares a los obtenidos con la inoculación de los tres agentes biocontroladores. Esta actividad no se afectó como consecuencia de la inoculación con *R. bunodes* (Tabla 7). Estos resultados confirmaron la asociación y el funcionamiento de las MA en las raíces de las plantas de café. El significado de este resultado radica en que la hifa es el propágulo de la MA que se extiende desde las raíces de las plantas hasta sitios del suelo donde absorben agua y elementos minerales no asimilables por las plantas (4). Por tal motivo, es fundamental que la hifa esté activa para tomar los nutrimentos necesarios, transportarlos y llevarlos hacia la planta.

Evaluación del grupo 3. Los tratamientos donde se inocularon *E. colombiana* y *B. cepacia* + el patógeno, y la interacción de estos dos agentes biocontroladores con el patógeno no mostraron diferencias estadísticas en el crecimiento de las plantas, comparados con el tratamiento testigo (Tabla 5). Los resultados obtenidos en este grupo corroboran los resultados de los grupos 1 y 2 con *E. colombiana* y *B. cepacia*,

microorganismos que no fueron efectivos para estimular el crecimiento de las plantas. Sin embargo, estos dos microorganismos, cumplieron un papel importante colonizando y protegiendo las raíces de las plantas de café, ya que impidieron que el hongo patógeno se estableciera en el sistema radical de estas plantas.

Se detectaron diferencias estadísticas en el crecimiento de las plantas entre los tratamientos inoculados con *E. colombiana* y *R. bunodes* comparados con los tratamientos inoculados con *G. manihotis* y *R. bunodes* y la mezcla de las dos especies de MA más el patógeno, en donde en estos últimos tratamientos ocurrió el mayor crecimiento de las plantas (Tabla 5). En la evaluación de este tercer grupo, al igual que lo observado en los dos grupos anteriores, *G. manihotis* sola y en combinación con los demás agentes biocontroladores, fue la especie que presentó los mayores efectos estimuladores en el crecimiento de las plantas, como consecuencia de su adaptabilidad al suelo y por su eficiencia y eficacia en el cultivo de café.

Tabla 7. Actividad metabólica del micelio de *E. colombiana* y *G. manihotis* en raíces de plantas de café, 8 meses después de su inoculación y 3 meses después de la inoculación con *R. bunodes* (sistema uno y dos).

Sistema inoculación	Tratamiento	Actividad Metabólica (%)
1	<i>E. colombiana</i> + <i>R. bunodes</i>	66 a*
	<i>E. c</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	63 a
	<i>E. c</i> + <i>G. m</i> + <i>R. bunodes</i>	63 a
	<i>E. c</i> + <i>G. m</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	70 a
	<i>G. manihotis</i> + <i>R. bunodes</i>	69 a
	<i>G. m</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	73 a
	<i>B. cepacia</i> + <i>R. bunodes</i>	—
	Testigo (Suelo estéril)	—
	Testigo (Suelo nativo)	0 b
2	<i>E. colombiana</i> + <i>R. bunodes</i>	68 a
	<i>E. c</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	61 a
	<i>E. c</i> + <i>G. m</i> + <i>R. bunodes</i>	77 a
	<i>E. c</i> + <i>G. m</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	72 a
	<i>G. manihotis</i> + <i>R. bunodes</i>	71 a
	<i>G. m</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	67 a
	<i>B. cepacia</i> + <i>R. bunodes</i>	—
	Testigo (Suelo estéril)	—
	Testigo (Suelo nativo)	0 b

* Promedios con letras iguales no presentan diferencia estadística. Tukey al 5%

Con respecto a *B. cepacia*, desde el inicio del experimento hasta el final de éste (8 meses después de inoculada), la bacteria tuvo un comportamiento positivo en su establecimiento y persistencia en las raíces de las plantas de café. Independiente de su condición (sola, en asociación con las dos MA o inoculada con el hongo patógeno), la persistencia de ésta fue alta, asegurando su permanencia por largo tiempo en las raíces de este cultivo. Con estos resultados *B. cepacia* abre caminos para continuar trabajando con ella en el control de patógenos radicales en plantas de café y de otros cultivos.

El testigo nativo mostró ser importante en el crecimiento de las plantas presentando una población nativa de esporas funcionales, lo cual indica que bajo estas circunstancias estos hongos deben ser considerados en un sistema

de producción de café antes que realizar labores de cultivo que desestimen y reduzcan estos microorganismos.

En este Grupo 3, se detectaron diferencias estadísticas entre tratamientos en la variable colonización (Tabla 6), donde los tratamientos inoculados con *E. colombiana* + el patógeno y *E. colombiana* + *B. cepacia* + el patógeno, presentaron menores niveles de colonización en relación con los demás tratamientos. Como se mencionó anteriormente, los bajos niveles de colonización y la baja efectividad de *E. colombiana* pudieron estar influenciados por las condiciones del sustrato en las que se llevó a cabo este estudio, que fueron adversas para la adaptabilidad de *E. colombiana*. Esta especie, en otras condiciones experimentales, ha mostrado ser muy eficiente cuando se le asocia con raíces de café (32).

En este grupo, al igual que en los anteriores, los tratamientos inoculados con *G. manihotis* y la mezcla de las dos MA presentaron los más altos niveles de colonización radical en ausencia o presencia del patógeno. Igualmente se apreciaron gran cantidad de arbusculos, propágulo micorrizal que indica la actividad metabólica entre los simbioses.

G. manihotis y *E. colombiana* inoculados individualmente y en asociación mostraron los más altos porcentajes de actividad de la hifa (77%), los cuales no disminuyeron luego de la inoculación con *R. bunodes* (Tabla 7).

La actividad metabólica de las hifas de las dos especies de MA presentaron niveles superiores al 60% en los tres grupos de tratamientos evaluados, en presencia o ausencia del patógeno. Este resultado es de resaltar, pues como se mencionó anteriormente, una hifa con esta actividad tiene una mayor funcionalidad en la toma de nutrimentos del hongo hacia la planta que aquella que no la tiene.

Un resultado observado en los tres grupos de tratamientos con respecto a la actividad metabólica de las hifas, consistió en que las MA presentes en el suelo nativo presentaron una baja actividad metabólica. Este resultado indica, que éstas especies presentaron un alto porcentaje de especificidad en el cultivo, pero tienen poca efectividad en algunas de sus funciones como en el caso de las hifas.

La salinidad del suelo es una condición de estrés para las MA (37). El suelo de Naranjal tiene un valor en sodio de 0,18meq/100g de suelo, valor que es alto comparado con el normal (0,05meq/100g de suelo). Es posible que esta condición haya afectado la funcionalidad de las hifas de las MA nativas. Este mismo autor menciona que altas concentraciones de elementos tóxicos como el hierro y el aluminio limitan la producción y funcionalidad de algu-

nas especies de MA. El suelo empleado en este experimento tuvo 831ppm de Fe (cifra normal: 150) y 1,6meq/100g de suelo de Al (cifra normal: 0,8-1,0); estos valores pudieron interferir con la funcionalidad de las MA presentes en el suelo de Naranjal. De otro lado, el alto contenido de fósforo (60ppm) también pudo afectar la actividad de las MA tanto de las nativas como de las introducidas. Este es el macroelemento que ha sido más estudiado en la asociación con las MA y que en mayor proporción condiciona el establecimiento de estos hongos.

Tres meses después de inoculado *R. bunodes* se determinó el antagonismo (100%) ejercido por los 3 agentes biocontroladores. Al momento de realizar la evaluación de las plantas, éstas no mostraron síntomas ni signos de la enfermedad, como tampoco se registraron diferencias entre los dos grupos de tratamientos inoculados con *R. bunodes* (Tabla 8).

En varios trabajos sobre el tema (2, 3, 11, 13, 20) se ha demostrado la efectividad de las MA y las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, como agentes controladores de patógenos radicales, disminuyendo el ataque de éstos en diferentes cultivos.

El efecto de control sobre *R. bunodes* ejercido por las dos especies de MA y la bacteria se puede explicar de varias maneras. Un primer aspecto tiene que ver con el hecho que *G. manihotis* y *E. colombiana* son consideradas especies selectivas para el cultivo del café (25, 28, 31, 32, 34), condición ésta que favorece la simbiosis entre las plantas de café y las especies mencionadas. Esta compatibilidad entre simbioses aumenta la eficiencia de la absorción de nutrimentos por parte de la planta, y uno de los componentes de la protección de los cultivos contra los patógenos radicales se fundamenta en el hecho de que una planta vigorosa como consecuencia de una buena

Tabla 8. Infección en raíces de plantas de café (%) colonizadas por *E. colombiana*, *G. manihotis* y *B. cepacia*, 3 meses después de inoculadas con *R. bunodes*.

Sistemas de inoculación	Tratamiento	Tratamiento infección (%)
1	<i>E. colombiana</i> + <i>R. bunodes</i>	0
	<i>E. c</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	0
	<i>E. c</i> + <i>G. m</i> + <i>R. bunodes</i>	0
	<i>E. c</i> + <i>G. m</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	0
	<i>Glomus manihotis</i> + <i>R. bunodes</i>	0
	<i>G. m</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	0
	<i>B. cepacia</i> + <i>R. bunodes</i>	0
2	<i>E. colombiana</i> + <i>R. bunodes</i>	0
	<i>E. c</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	0
	<i>E. c</i> + <i>G. m</i> + <i>R. bunodes</i>	0
	<i>E. c</i> + <i>G. m</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	0
	<i>Glomus manihotis</i> + <i>R. bunodes</i>	0
	<i>G. m</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	0
	<i>B. cepacia</i> + <i>R. bunodes</i>	0

nutrición, ejerce mejor control contra el ataque de los patógenos, que aquellas que no lo están.

Otro aspecto fundamental que evidentemente ocurrió en esta investigación fue la protección ejercida sobre el sistema radical de las plantas por las dos especies de MA. Estas ocuparon gran extensión de la raíz y de esta forma inhibieron la penetración de *R. bunodes*. Palacino (26) observó en raíces de pitaya, que *G. manihotis* disminuyó la población de *Meloidogyne incognita* y redujo el nivel de infección del nematodo en las raíces. Este resultado lo explicó debido a la competencia ocurrida por los sitios de colonización e infección entre las MA y el nematodo.

Dehne (11), menciona que las raíces colonizadas por las MA son más lignificadas que las raíces sin ellas; y este efecto puede ser el responsable de la restricción de los patógenos radicales. También encontró que las raíces colonizadas por MA exhiben una alta activi-

dad quitinolítica, actuando de esta manera; en forma muy efectiva contra los patógenos que atacan las raíces de plantas.

Este efecto de control de patógenos radicales por parte de las MA, está ligado al hecho que estos hongos tienen la capacidad de activar los mecanismos de defensa de las plantas (2). En este experimento, aunque no se midió la producción de compuestos fenólicos y fitoalexinas; se considera que alguna influencia tuvieron para que las plantas no se vieran afectadas por *R. bunodes*.

Numerosos autores (7, 18, 20, 22, 40, 45), han indicado que la producción de componentes antimicrobiales, la alta tasa de desarrollo en el hospedante, la capacidad de utilizar un amplio rango de fuentes de carbono y la producción de enzimas extracelulares (quitinasas y β 1,3- glucanasa), han sido las bases para considerar a *B. cepacia* como uno de los mejores agentes biocontroladores.

El efecto de *B. cepacia* sobre *R. bunodes* pudo ocurrir debido a la alta capacidad de esta bacteria en producir componentes antimicrobianos (sideróforos, β 1,3- glucanasas, quitinasas, pyrrolnitrina, etc.), lo cual ha sido demostrado en varios trabajos de investigación. La pyrrolnitrina ha sido uno de los antibióticos más importantes producidos por *B. cepacia*, producto que ha mostrado ser muy efectivo para controlar un gran número de agentes fitopatógenos; tales como, especies del género *Agrobacterium*, *Alternaria*, *Bipolaris*, *Botrytis*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Sclerotinia*, entre otros. En adición a la pyrrolnitrina existen otros metabolitos que son producidos por varias cepas de *B. cepacia*; estos metabolitos incluyen otros fenilpirroles, compuestos antibacteriales como cepacin A y cepacin B, bacteriocinas, pigmentos y sideróforos y metabolitos no determinados (27, 41).

Janisiewicz y Roitman (22), con *B. cepacia* inhibieron el desarrollo del moho gris (*Botrytis cinerea*) y el moho azul (*Penicillium expansum*) en manzana y arveja. Los autores mencionan que el principal modo de acción del aislamiento utilizado fue la producción de pyrrolnitrina como un compuesto de potente características antifúngicas. Iguales resultados obtuvieron Zaki *et al.* (45) quienes encontraron que un aislamiento de *B. cepacia* inhibió el desarrollo *in vitro* de *Rhizoctonia solani*. En plántulas de algodón, esta efectividad se atribuyó a la producción de pyrrolnitrina por parte de la bacteria.

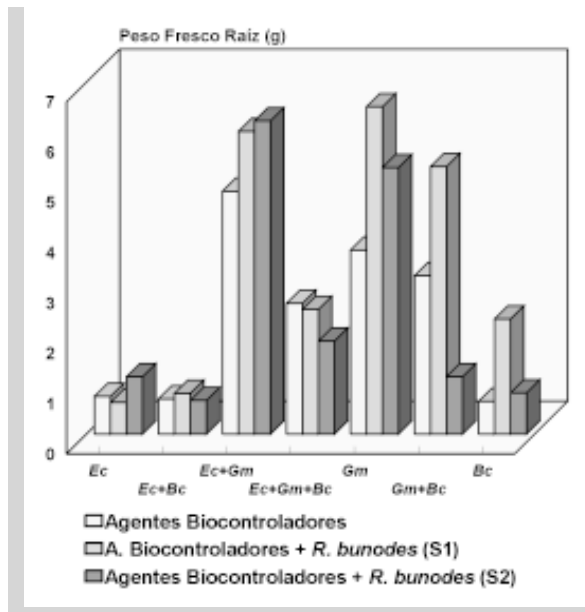
Sindhu *et al.* (40), demostraron que la producción de sideróforos juega un papel importante en el efecto antagónico de las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*. Estos autores indican, que estos sideróforos inhiben el desarrollo de hongos fitopatógenos, debido a que la bacteria reduce la disponibilidad del Fe necesario para la germinación de los hongos patógenos de plantas.

Se ha mencionado que algunas rizobacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* actúan sinérgicamente con algunas especies de MA y este efecto es mayor si se inoculan simultáneamente al momento de la siembra (6). Diferentes estudios han demostrado que en la asociación MA – Bacterias se presenta un efecto de sinergismo donde la bacteria actúa en la rizosfera dándole un nicho de albergue a la MA. Smith y Read (42), mencionan que las bacterias *Pseudomonas fluorescens* tiene un efecto favorable en la formación de micorrizas. Este efecto estimulador de *P. fluorescens*, *P. putida* y otro grupo de bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* ha sido reportado para el caso de las MA y a la vez, se menciona un efecto en el mismo sentido de la micorriza hacia la bacteria. En esta investigación, cuando *E. colombiana* y *G. manihotis* se inocularon en forma individual o asociados con *B. cepacia*, se observó en todos los casos una importante relación simbiótica de los tres microorganismos.

Análisis combinado. Se realizó un análisis combinado con los tres grupos de tratamientos evaluados, con el fin de observar las interacciones entre los tres grupos de tratamientos.

En la Figura 12, se aprecia que la interacción microorganismo por grupo fue significativa para la variable peso fresco de raíz, como consecuencia que no siempre el grupo donde estuvieron inoculados los agentes biocontroladores tuvo los valores más altos. En esta variable, el grupo donde hubo mayor presión de *R. bunodes*, mostró los más altos valores y el grupo donde esta presión de *R. bunodes* fue menor, tuvo los valores más bajos. En este resultado el sustrato empleado para la inoculación del patógeno, pudo servir de base alimenticia para las plantas y para los biocontroladores, ya que el hongo patógeno incrementado en sorgo, se colocó en este grupo más cerca de las raíces y de los agentes

Figura 12.
Análisis comparativo del peso fresco de raíz de las plantas de café, entre los agentes biocontroladores solos y en interacción con *R. bunodes*.



biocontroladores, aspectos que ya fueron mencionados y discutidos anteriormente.

Las plantas inoculadas con *E. colombiana* y *B. cepacia* mostraron los más bajos niveles en el peso fresco de raíz en los tres grupos evaluados y contrario a esto, los tratamientos inoculados con *G. manihotis* en combinación con los demás microorganismos presentaron los más altos valores en los tres grupos de tratamientos evaluados.

En la Tabla 9, se observan diferencias estadísticas para la variable peso fresco aéreo entre microorganismos. *E. colombiana* sola, *B. cepacia* sola y la mezcla de ambos microorganismos mostraron diferencias estadísticas con respecto a *G. manihotis* y a la mezcla de esta especie con los demás microorganismos. Estos resultados fueron persistentes a lo largo de todo el experimento.

El análisis combinado para la variable colonización, mostró diferencias estadísticas entre grupos de tratamientos (Tabla 10).

En esta variable; se observaron diferencias estadísticas entre el Grupo 1 (inoculación de los agentes biocontroladores) y el Grupo 3 (inoculación de los agentes biocontroladores y *R. bunodes* alrededor de la rizosfera). Sin embargo, biológicamente no hubo un impacto notable en estas diferencias (31% y 40%, respectivamente). Un aspecto para destacar es el hecho que no se vieron afectados estos niveles de colonización con la presencia del hongo patógeno; por el contrario, estos niveles tuvieron un ligero aumento en los dos grupos inoculados con *R. bunodes* al compararlos con el grupo donde estuvieron los agentes biocontroladores sin el patógeno (Tabla 10).

Entre los Grupos 2 y 3 (donde se inoculó *R. bunodes*) no se presentaron diferencias estadísticas significativas en colonización.

En la evaluación de la actividad metabólica de las hifas de las MA, se observaron diferencias estadísticas entre los Grupos 1 y 3. Sin embargo, con esta variable ocurrió algo semejante a lo presentado con la variable

Tabla 9. Valores promedios para la variable peso fresco aéreo, en cada uno de los tratamientos evaluados (Análisis combinado).

Microorganismo	Peso fresco aéreo (G) **
<i>Entrophospora colombiana</i> + <i>R. bunodes</i>	1,8 c*
<i>E. colombiana</i> + <i>B. cepacia</i> + <i>R. bunodes</i>	1,5 c
<i>E. colombiana</i> + <i>G. manihotis</i> + <i>R. bunodes</i>	14,3 a
<i>E. c</i> + <i>G. m</i> + <i>B. c</i> + <i>R. bunodes</i>	7,6 ab
<i>Glomus manihotis</i> + <i>R. bunodes</i>	12,8 ab
<i>G. manihotis</i> + <i>B. cepacia</i> + <i>R. bunodes</i>	7,6 b
<i>Burkholderia cepacia</i> + <i>R. bunodes</i>	2,0 c

* Promedios con letras iguales no presentan diferencia estadística. Tukey al 5%

** Valores promedios transformados a Log 10.

Tabla 10. Valores promedios para la variable colonización, en cada uno de los grupos evaluados (Análisis combinado).

Grupo	Colonización (%) **
Agentes biocontroladores	31 b*
Agentes biocontroladores + <i>R. bunodes</i> (sistema 1)	33 ab
Agentes biocontroladores + <i>R. bunodes</i> (sistema 2)	40 a

* Promedios con letras iguales no presentan diferencia estadística. Tukey al 5%

** Valores promedios transformados a Log 10.

colonización, ya que biológicamente la actividad metabólica de la hifa fue similar en los tres grupos, con valores entre 60 y 70% (Tabla 11). El aumento en la actividad de la hifa en los grupos donde estuvo el patógeno, es factible que haya ocurrido por la presencia del sorgo (sustrato de inoculación del patógeno), el cual pudo potencializar la actividad de estos hongos. Esta alta actividad es de importancia en trabajos de control biológico, ya que una planta que esté asociada con MA con sus hifas activas, consecuentemente produce plantas grandes y vigorosas, más tolerantes al ataque de un patógeno.

En general, el alto contenido de fósforo, hierro y sodio en el suelo de Naranjal pudo influir negativamente en el comportamiento de *E. colombiana* como organismo inductor de crecimiento y desarrollo de las plantas de café. En otros tipos de suelos esta especie ha sido muy eficiente como promotora del crecimiento y nutrición de plantas de café. Igual conside-

ración se hace para la mezcla de *E. colombiana* con *B. cepacia*.

G. manihotis solo o en mezcla con *E. colombiana* produjo los mayores beneficios en las plantas de café y mostró la importancia de esta asociación para ser utilizados en un programa de manejo integrado de la llaga negra del cafeto.

Las MA nativas, mostraron los más altos niveles de colonización en comparación con las especies inoculadas. Sin embargo, se presentó mayor efectividad en el crecimiento de las plantas con las especies introducidas.

La actividad metabólica de la hifa de las dos especies de MA introducidas presentó valores superiores al 60% en presencia o ausencia del hongo patógeno.

La persistencia de la bacteria *Burkholderia cepacia* sola y en asociación con *E. colombiana* y *G. manihotis* fue alta a los 8 meses

Tabla 11. Valores promedios para la variable actividad metabólica de la hifa, en cada uno de los grupos evaluados (Análisis combinado).

Grupo	Actividad Metabólica (%) **
Agentes biocontroladores	61 b*
Agentes biocontroladores + <i>R. bunodes</i> (sistema 1)	67 a
Agentes biocontroladores + <i>R. bunodes</i> (sistema 2)	69 a

* Promedios con letras iguales no presentan diferencia estadística. Tukey al 5%

** Valores promedios transformados a Log 10.

de inoculada en las plantas de café. Esto garantiza su uso en un programa de manejo integrado de *R. bunodes*.

La inoculación individual y asociada de *E. colombiana*, *G. manihotis* y *B. cepacia* no permitió que las raíces de las plantas de café fueran atacadas por *R. bunodes*.

En el control de *R. bunodes* algunos mecanismos de defensa de las plantas pudieron ser activados por las MA y la bacteria *B. cepacia*, los cuales deberán ser valorados en futuras investigaciones.

LITERATURA CITADA

- ARANGO, C.; ROBLEDO, A.; OCHOA, G. Efecto de la micorriza vesículo arbuscular en la producción de café cv. Colombia con dos niveles de fertilizantes. *Fitopatología Colombiana* 16 (1-2): 120-125. 1992.
- AZCON A., C.; BAREA, J.M. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens- an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6 (6): 457- 464. 1996.
- BAREA, J. M.; ANDRADE, G.; BIANCIOTTO, V.; DOWLING, D.; LOHRKE, S.; BONFANTE, P.; O'GARA, F.; AZCON-AGUILAR, C. Impact on arbuscular mycorrhiza formation of *Pseudomonas* strain used as inoculants for biocontrol of soil-borne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (6): 2304-2307. 1998.
- BETHLENFALVAY, G.; LINDERMAN, R. Mycorrhizae in sustainable agriculture. Madison, American Society of Agronomy. p. 1-27. 1992.
- BIANCIOTTO, V.; MINERDI, D.; PEROTTO, S.; BONFANTE, P. Cellular interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria. *Protoplasma* 193: 123-131. 1996.
- BLANCOL, F.; SALAS, E. Micorrizas en la agricultura: Contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 21 (1): 55-67. 1997.
- BURKEAD, K.; SCHISLER, D.; SLININGER, P.. Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B 37W in culture and in colonized wounds of potatoes. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (6): 2031-2039. 1994.
- CÁRDENAS L., J. Efecto de *Pseudomonas* fluorescentes sobre *Rosellinia bunodes* (Berk y Br) Sacc. en plantas de café. Turrialba, CATIE. 86 p. (Tesis: Magister Scientiae). 1997.
- CASTRO C., B.L. Manejo y control de Llagá Negra del cafeto. In: CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFE. CENICAFÉ. Informe anual de labores de la Disciplina de Fitopatología. Chinchiná, CENICAFÉ. 13 p. (Mecanografiado). 1992.
- CASTRO C., B.L. Control de Llagá negra del café, *Rosellinia bunodes* con *Trichoderma koningii*. Chinchiná, CENICAFÉ. (Seminario noviembre de 1994). 1994.
- DEHNE, H. W. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology* 72 (8): 1115-1119. 1982.

12. FREY-KLETT, P.; PIERRAT, J. C.; GARBAYE, J. Location and survival of mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens* during establishment of ectomycorrhizal symbiosis between *Laccaria bicolor* and Douglas Fir. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (1): 139-144. 1997.
13. FRIDLINDER, M.; INBAR, J.; CHET, I. Biological control of soilborne plant pathogens by a b- 1,3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biology & Biochemistry* 25 (9): 1211-1221. 1993.
14. GAUR, A.; ADHOLEYA, A. Effects of the particle size of soil-less substrates upon AM fungus inoculum production. *Mycorrhiza* 10 (1): 43 – 48.
15. GRYNDLER, M.; VOSATKA, M. The response of *Glomus fistulosum*-maize mycorrhiza to treatments with culture fraction from *Pseudomonas putida*. *Mycorrhiza* 6: 207-211. 1996
16. HAMEL, C.; FYLES, H.; SMITH, D.L. Measurement of development of endomycorrhizal mycelium using three different vital stain. *New Phytologist* 115: 297-302. 1990.
17. HEBBAR, K.; DAVEY, A.; MERRIN, J.; MCLOUGHLIN, T.; DART, P. *Pseudomonas cepacia*, a potential suppressor of maize soil-borne diseases-seed inoculation and maize root colonization. *Soil Biology & Biochemistry* 24 (10): 999-1007. 1992.
18. HEBBAR, K.; ATKINSON, D.; TUCKER, W.; DART, P. Suppression of *Fusarium moniliforme* by maize root-associated *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biology & Biochemistry* 24 (10): 1009-1020. 1992.
19. HEYDARI, A.; MISAGHI, I. J. Biocontrol active of *Burkholderia cepacia* against *Rhizoctonia solani* in herbicide-treated soil. *Plant and Soil* 202: 109-116. 1998.
20. HUANG, Y.; WONG, P. T. W. Effect of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* and soil type on the control of crown rot in wheat. *Plant and Soil* 203: 103-108. 1998.
21. JACOBSEN, C. Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* DBO1 (pRO101) in 2,4 -D contaminated soil. *Plant and Soil* 189: 139-144. 1997.
22. JANISIEWICZ, W. J.; ROITMAN, J. Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology* 78 (12): 1697-1700. 1998.
23. LEBEN, S. D.; WADI, J. A.; EASTON, G. D. Effects of *Pseudomonas fluorescens* on potato plant growth and control of *Verticillium dahlie*. *Phytopathology* 77 (11): 1592-1595. 1987.
24. MARSCHNER, P.; GERENDAS, J.; SATTELMACHER, B. Effect of N concentration and N source on root colonization by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 RLI. *Plant and Soil* 215: 135-141. 1999.
25. OROZCO P., F.H. Efecto de la inoculación con hongos formadores de micorrizas vesículo arbuscular en plantas de café (*Coffea arabica* var. Colombia). *Suelos Ecuatoriales* 18 (2): 213-219. 1988.
26. PALACINO, J.H. Interacción de *Glomus manihotis* y *Meloidogyne incognita* Chitwood en pitaya amarilla (*Selenicereus Megalanthus Britt y Rose*) y pitaya roja (*Hylocereus* sp. Britt y Rose) bajo condiciones de vivero. Manizales, Universidad de Caldas. Facultad de Agronomía. 97 p. (Tesis: Ingeniero Agrónomo). 1990.
27. PARKER, W.L.; RATHNUM, L.; SEINER, V.; TREJO, W.H.; PRINCIPE, P.A.; SYKES, P.B. Cepacin A and cepacin B, two new antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia*. *J. Antibiotics* 37: 431-440. 1984.
28. PARRA, M.; SANCHEZ DE P., M.; SIEVERDING, E. Efecto de micorriza vesículo arbuscular en café *Coffea arabica* variedad Colombia en almácigo. *Acta Agronómica* 40 (1-2): 88-99. 1990.
29. PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*. 55, 158-161. 1970.
30. RAVNSKOV, S.; JAKOBSEN, I. Effect of *Pseudomonas fluorescens* DF 57 on growth

- and P uptake of two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with cucumber. *Mycorrhiza* 8 (6): 329-334. 1999.
31. RESTREPO, G.M. Efecto de *Entrophospora colombiana* y *Glomus fistulosum* en el control de la Llaga negra del cafeto *Rosellinia bunodes* Berk y Br. Manizales, Universidad Católica de Manizales. Facultad de Estudios Avanzados en Ciencias de la Salud. 95 p. (Tesis: Especialización en Microbiología). 1998.
 32. RIVILLAS O., C.A. The effects of arbuscular mycorrhizal fungi on two different coffee varieties from Colombia and their biochemical detection in roots. Kent, University of Kent. Research School of Biosciences. 88 p (Tesis: Magister Science). 1995.
 33. RIVILLAS O., C.A. Identificación de hongos micorrizógenos del suelo de Planalto - Cenicafé y de inóculo comercial. In: CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ. CENICAFÉ. Informe Anual de Labores de la Disciplina de Fitopatología 1994-1995. Chinchiná, CENICAFÉ. 1995.
 34. RIVILLAS O., C.A. Evaluación de plantas de café de la variedad Colombia inoculadas con un inóculo comercial y *Glomus manihotis*. In: CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ. CENICAFÉ. Informe Anual de Labores de la Disciplina de Fitopatología 1997-1998. Chinchiná, CENICAFÉ. 1998.
 35. RIVILLAS O., C.A.; HERRERA, J.C. Inoculación de plantas de café *in vitro* con dos meses de endurecimiento. In: CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ. CENICAFÉ. Informe Anual de Labores de la Disciplina de Fitopatología 1995-1996. Chinchiná, CENICAFÉ. 1996.
 36. SAITO, M.; STRIBLEY, D.; HEPPEL, CH. Succinate dehydrogenase activity of external and internal hyphae of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mossae* (Nicol. & Gerd.) gerdman and trappe, during mycorrhizal colonization of root of leek (*Allium porrum* L.), as revealed by in situ histochemical staining. *Mycorrhiza* 4: 59-62. 1993.
 37. SÁNCHEZ DE P., M. Endomicorrizas en Agroecosistemas Colombianos. Universidad Nacional de Colombia – Departamento de Ciencias Básicas. Palmira. 227 p. 1999.
 38. SIEVERDING, E. El papel de las micorrizas en la agricultura. *Suelos Ecuatoriales* 16 (1): 52-57. 1986.
 39. SIEVERDING, E.; TORO T., S. Efecto de la inoculación de hongos micorrizicos VA en plántulas de café (*Coffea arabica* L.) y de té (*Camelia sinensis*) In: Investigaciones sobre micorrizas en Colombia N. 2. Medellín, Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo. p 101-110. 1988.
 40. SINDHU, S. S.; GUPTA, S. K.; DADARWALL, K. R. Antagonistic effect of *Pseudomonas* spp. on pathogenic fungi and enhancement of growth of green gram (*Vigna radiata*). *Biology and Fertility of Soil* 29 (1): 62-68. 1999.
 41. SMIRNOV, V.; KIPRIANOVA, E.; GARAGULYA, A.; DODATKO, T.; PILYASHENKO, I. Antibiotic activity and siderophores of *Pseudomonas cepacia*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 26: 58-63. 1990.
 42. SMITH, S.E.; READ, D.J. *Mycorrhizal symbiosis*. 2. ed. San Diego, Academic Press. 605 p. 1997.
 43. VALENCIA C., M. Estudio del antagonismo de *Pseudomonas* spp. fluorescentes a *Rosellinia bunodes* (Berk y Br). Manizales, Universidad Católica de Manizales. 62 p (Tesis: Bacterióloga y Laboratorista). 1996.
 44. YU-PING SUN.; UNESTAM, T.; LUCAS, S.; JOHANSON, J.; KENNE, L.; FINLAY, R. Exudation – reabsorption in a mycorrhizal fungus, the dynamic interface for interaction with soil and soil microorganisms. *Mycorrhiza* 9 (3): 137 – 144. 1999.
 45. ZAKI, K.; MISAGUI, I. J.; HEYDARI, A. Control of cotton seedling damping-off in the field by *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *Plant Diseases* 82 (3): 291-293. 1998.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al Dr. Bernardo Chaves C. Igualmente a los señores Fernando Galvis C., Carlos A. Zuluaga E. y Gonzalo Hoyos. A la Disciplina de Fitopatología.