

EFFECTO DE EXTRACTOS METABOLICOS DE *Verticillium lecanii* SOBRE *Hemileia vastatrix*

Jairo E. Leguizamón-Caycedo.*, Patricia Eugenia Vélez-Arango.**, Arcesio González-Serna.***

RESUMEN

Leguizamón C., J.E.; Vélez A., P.E.; González S., A. Efecto de extractos metabólicos de *Verticillium lecanii* sobre *Hemileia vastatrix*. Cenicafé (Colombia) 40(2): 31- 39. 1989.

En el Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFE, se estudió el efecto de los extractos del hiperparásito *Verticillium lecanii* sobre los procesos germinativo e infectivo de *Hemileia vastatrix* Berk. y Br., en plántulas de *Coffea arabica* var. Caturra, en condiciones de laboratorio e invernadero. A medida que se aumentó la concentración del extracto de *V. lecanii*, se disminuyó la tasa de germinación de urediniosporas de roya, con un comportamiento cuadrático y un ajuste del 77%. De igual manera, estos extractos prolongaron los periodos de incubación y de latencia de *H. vastatrix*, redujeron el grado de infección y la tasa de producción de urediniosporas del hongo. El efecto persistió a través del tiempo. Las plantas de café en estado cotiledonar, sometidas a la absorción del extracto por las raíces, se marchitaron y redujeron en un 41% su peso, con respecto al peso inicial entre 24 y 48 horas después del tratamiento. Estos resultados sugieren la presencia de uno ó varios metabolitos producidos por el hiperparásito de la roya del cafeto que pueden ser empleados en el control biológico de la enfermedad.

Palabras claves: Colombia, *Hemileia vastatrix*, roya del cafeto, control biológico, hiperparasitismo, *Coffea arabica*, *Verticillium lecanii*.

ABSTRACT

At the National Coffee Research Centre, CENICAFE, the effect of extracts of *Verticillium lecanii* (a hyperparasite of rusts) on the germinative and infective processes of *Hemileia vastatrix* Berk. and Br. in *Coffea arabica* var. Caturra, was studied under laboratory and greenhouse conditions. Germination rates decreased as extract concentration increased, with a quadratic behavior and 77% adjust. Incubation and latent periods were delayed and the infection degree and rate of urediniospore production decreased persistently throughout the time. When seedlings of coffee were put for 24-48 hours in the extract, they wilted and showed a 41% decrease in dry weight. These results suggest the presence of toxic metabolites in extracts from *Verticillium lecanii* which could be promising for biological control of the disease.

Keywords: Colombia, *Hemileia vastatrix*, coffee leaf rust, biological control, hyperparasitism, *Coffea arabica*, *Verticillium lecanii*.

* Investigador Principal I. Fitopatología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFE, Chinchiná, Caldas, Colombia.

** Investigador Científico I. Fitopatología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFE, Chinchiná, Caldas, Colombia.

*** Auxiliar IV. Fitopatología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFE, Chinchiná, Caldas, Colombia.

El uso de métodos convencionales para el control de enfermedades en plantas ha originado problemas tales como la resistencia de los patógenos a los fungicidas y la presencia de residuos de plaguicidas en las plantas y en el ambiente. Esto, sumado a los altos costos del control químico, ha despertado el interés de los investigadores en los métodos biológicos de control (2, 3, 21).

Los agentes de control biológico tienen tres posibles formas de acción, ninguna de las cuales es mutuamente exclusiva: parasitismo o predación de un organismo por otro (hiperparasitismo), antibiosis, en la cual los microorganismos antagonistas secretan metabolitos nocivos a otros organismos, y competencia, en la cual la demanda sobrepasa el suministro inmediato de nutrimentos o espacio (2, 3, 21).

El control biológico en la filósfera está basado en el antagonismo microbiano en la fase de penetración del patógeno o en el hiperparasitismo, una vez se ha establecido la infección. El biocontrol en la fase de prepenetración requiere una microflora antagonista estable antes de la llegada del patógeno. Además de la introducción de antagonistas, el uso de antagonismo natural en un programa de control integrado de enfermedades, es un medio más eficiente de combate (2, 3, 21).

Existen dos escuelas básicas de pensamiento en la selección inicial de los agentes de biocontrol: la primera afirma que los aislamientos deben hacerse de sitios en los cuales se conoce la presencia del patógeno, pero no se expresa la enfermedad (suelos supresivos); o de sitios en los cuales se sabe que el patógeno ha causado enfermedad, pero no está presente al momento del muestreo (de la rizósfera para un patógeno de raíz o la filósfera para un patógeno foliar) o de estructuras fúngicas en reposo (micelio o esclerocios). Cualquier organismo aislado de estas situaciones puede

tener el potencial para controlar el patógeno y habilidad para vivir y sobrevivir en el mismo ambiente del patógeno. La segunda escuela se refiere a que los agentes de control biológico pueden encontrarse en cualquier lugar y por tanto, un microorganismo de un ambiente foráneo debe ser tan útil como un microorganismo nativo (2, 21).

Las urediniosporas de *Hemileia vastatrix* Berk. y Br., agente causante de la roya del café, son frecuentemente hiperparasitadas por el hongo *Verticillium lecanii* (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 18, 19, 20). El tejido de la hoja de café no es infectado por este hongo, pero las hojas en las que se encuentra parasitando pústulas de roya, muestran a menudo necrosis y caen más rápido que las no parasitadas. Esto sugiere que algunos metabolitos son producidos como resultado de la interacción *H. vastatrix* - *V. lecanii*, lo cual origina la necrosis de la hoja. El hiperparásito *V. lecanii* actúa mediante penetración y muerte de urediniosporas de roya en la pústula. De esta manera, el hiperparásito reduce el grado de infección en la hoja (11, 19, 20).

Eskes *et al.* (5) registraron en aislamientos de *V. lecanii* y *V. leptobactrum*, mejor germinación en presencia de urediniosporas de *H. vastatrix* que en agua destilada. El hiperparasitismo de estas especies sobre el hongo de la roya en condiciones de laboratorio, se completó entre 5 y 7 días, con una humedad relativa del 99%.

La producción de sustancias tóxicas por patógenos vegetales es conocida desde hace mucho tiempo. En los últimos años, químicos y patólogos se han dedicado a estudiar los mecanismos de acción de las toxinas y su naturaleza química (2, 6).

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del extracto obtenido del hongo

V. lecanii sobre la germinación de urediniosporas y sobre los períodos de incubación, latencia y el grado de infección de *H. vastatrix*. De otra parte, evaluar la toxicidad de los metabolitos presentes en los extractos de *V. lecanii* mediante una prueba biológica en plantas de café de la variedad Caturra con un par de hojas cotiledonares.

MATERIALES Y METODOS

Obtención del extracto filtrado de *V. lecanii*. La cepa de *V. lecanii* (Cenicafé 004) aislada de lesiones de roya del café, se cultivó inicialmente en medio Papa-dextrosa-agar (PDA) y posteriormente se hicieron transferencias a 100 ml de caldo con papa-dextrosa (CPD) contenido en erlenmeyeres de 250 ml. Al cabo de 10 a 12 días de cultivo con alternancia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, a 22°C, se obtuvo un micelio blanco algodonoso en toda la superficie del medio. En condiciones asépticas, se obtuvo el extracto metabólico del hongo (parte acuosa) al descartar la masa micelial. Posteriormente, se centrifugó a 3.400 r.p.m. durante 15 minutos y el "sobrenadante" obtenido se filtró a través de Millipore por una membrana con un tamaño de poro de 0,45 μ m. Finalmente, se obtuvo el extracto metabólico de *V. lecanii* el cual se utilizó para las diferentes pruebas con roya.

Efecto del extracto de *V. lecanii* sobre la germinación de urediniosporas de *H. vastatrix*. Con el objetivo de evaluar el efecto del extracto filtrado sobre la germinación de urediniosporas de roya, se tomaron 100 ml de agua destilada estéril y se agregaron urediniosporas de roya hasta obtener una concentración de $7,5 \times 10^4$ urediniosporas/ml. La viabilidad de las esporas fue del 70%, promedio de 5 lecturas por alícuota de 5 microlitros (μ l). La preparación del inóculo y el control

de la concentración de urediniosporas se hizo de acuerdo con la metodología descrita por Leguizamón (12). Luego se fueron adicionando a la suspensión de urediniosporas, cantidades crecientes del extracto obtenido del hongo *V. lecanii*. De esta forma, los tratamientos fueron: (1-2-5-10-15 y 20 partes del extracto en 1.000 partes de la suspensión). Como testigo se usó la suspensión de urediniosporas en agua destilada estéril.

Cada uno de los tratamientos y el testigo, se sometieron a agitación magnética continua durante 1 a 2 minutos aproximadamente, en recipientes en condiciones de oscuridad. De cada uno de los tratamientos se montaron 2 placas con 2 alícuotas de 10 μ l en cada una. Se colocaron las placas en cajas de petri plásticas, recubiertas con papel filtro, previamente humedecidas. Se mantuvieron durante 12 horas en un cuarto con humedad a saturación y en condiciones de oscuridad, a 23°C (12). Posteriormente se hizo la lectura microscópica (16x) de urediniosporas germinadas y no germinadas. Se consideró la urediniospora germinada, cuando el tubo germinativo superó su diámetro.

Efecto del extracto de *V. lecanii* sobre los períodos de incubación y de latencia de urediniosporas de roya y el grado de infección en plántulas de café en condiciones de invernadero. En 10 plántulas de la variedad Caturra, de 3 meses de edad, se seleccionaron los 2 primeros pares de hojas y se asperjó el extracto obtenido del hongo *V. lecanii* al envés de cada una de las hojas seleccionadas. Se dejó secar el extracto a temperatura ambiente durante 15 horas, al cabo de las cuales se inoculó a cada hoja (envés), 8 alícuotas de 5 μ l de una suspensión de urediniosporas de roya con una concentración de 16×10^4 por mililitro. La viabilidad de las urediniosporas fue mayor del 50%, promedio de 5 lecturas por alícuota de 5 μ l. Como testigo se dejaron

10 plántulas, a las cuales se inoculó roya en las mismas condiciones del tratamiento sin previa aspersión del extracto del hongo. Las plántulas se llevaron, inmediatamente después de la inoculación, al cuarto húmedo y en condiciones de oscuridad, durante 12 horas. Luego se llevaron a condiciones de umbráculo, con seguimiento diario de temperatura y humedad relativa durante el ensayo. Al cabo de los 20 días de inoculadas las plántulas y cada 2 ó 3 días, se efectuaron las evaluaciones mediante la escala de Leguizamón, para inoculaciones por gota, citada por Alvarez y Sierra (1), la cual describe el desarrollo de la lesión individual a través del tiempo.

Efecto del extracto obtenido del hongo *V. lecanii* sobre plántulas en estado cotiledonar, "chapolas", de la variedad Caturra. Para esta prueba se empleó la metodología sugerida por Renaud (16), con algunas modificaciones. Se seleccionaron 44 "chapolas" de germinadores que utilizaron como sustrato arena lavada de río. Posteriormente se lavó cada una de ellas y se determinó su peso inicial. En estas condiciones se colocaron en forma individual en el extracto filtrado del hongo *V. lecanii* depositado en tubos de ensayo, con un volumen que permitiera el contacto permanente del extracto con las raíces de la "chapola". Como testigo, se tomaron 12 "chapolas" del total y se pusieron en contacto con agua destilada estéril. Al momento de la aparición de síntomas de marchitamiento en las hojas cotiledonares de las "chapolas" en contacto permanente con el extracto del hiperparásito, se tomó su peso, secando previamente la raíz. Simultáneamente, se registró el peso de aquellas que permanecieron en contacto con agua destilada estéril.

Análisis estadístico. Para evaluar el efecto del extracto de *V. lecanii* sobre la germinación de las urediniosporas de *H. vastatrix* se efec-

tuó un análisis de regresión, donde la variable dependiente fue el porcentaje de germinación y la variable independiente las observaciones en las diferentes concentraciones del extracto.

Para determinar el efecto del extracto obtenido del hongo *V. lecanii* sobre los períodos de incubación y de latencia y el grado de infección en plántulas, se evaluó en cada período de lectura, la frecuencia de infección de las urediniosporas en cada alícuota y para cada uno de los grados de la escala. En cada período de lectura se aplicó la estadística descriptiva (media, desviación estándar, coeficiente de variación) del grado de infección para cada uno de los tratamientos y se comparó la diferencia entre ellos mediante la prueba "t", según su varianza igual ó diferente.

Se consideró el período de incubación cuando el 75% de sitios inoculados presentaron síntomas de enfermedad con grados en la escala mayores o iguales a 1 y el período de latencia, cuando el 75% de sitios inoculados y con síntomas de enfermedad esporularon con grados en la escala mayores o iguales a 4.

RESULTADOS Y DISCUSION

Efecto del extracto obtenido del hongo *V. lecanii* sobre la germinación de urediniosporas de *H. vastatrix*. En la Tabla 1 se presenta el promedio de 4 lecturas de germinación de urediniosporas de roya en las diferentes concentraciones del extracto de *V. lecanii* filtrado. Se observó que a medida que aumentaba la concentración del extracto, disminuía la tasa de germinación, al comparar con el testigo en agua destilada estéril.

La respuesta del porcentaje de germinación a los aumentos en la concentración del ex-

TABLA 1. Efecto de diferentes concentraciones del extracto filtrado de *Verticillium lecanii* sobre el porcentaje de germinación de urediniosporas de roya (*Hemileia vastatrix*). CENICAFE.

Concentración de <i>V. lecanii</i> (‰)	Germinación de <i>H. vastatrix</i> *
0 Testigo	73,04
1	46,35
2	38,87
5	36,72
10	20,69
15	14,08
20	11,05

* Promedio de 4 repeticiones.

tracto (0 a 20‰) mostró un comportamiento cuadrático, con un ajuste del 77%, de tal manera que, a mayor concentración del extracto menor porcentaje de germinación (Figura 1).

Leal *et al.* (11) registraron la producción de enzimas antifúngicas en cepas de *Verticillium*. La más activa de las cepas de *Verticillium* fue aislada de pústulas de roya de café *H. vastatrix*. El agente lítico detectado en los filtrados

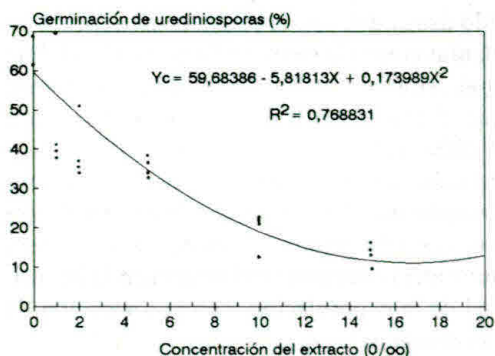


Figura 1. Germinación de urediniosporas de roya bajo diferentes concentraciones del extracto de *Verticillium lecanii* (0 a 20‰). CENICAFE.

del cultivo del hongo *Verticillium*, era de naturaleza termolábil y fue activo *in vitro* en esporas de *Puccinia graminis* y en hifas y urediniosporas de *H. vastatrix*.

Este mismo efecto ha sido registrado con suspensiones acuosas de esporas de *Helminthosporium carbonum*, hongo no patógeno a plantas de café, las cuales producen metabolitos que inhiben la germinación de urediniosporas de *H. vastatrix*. Esta actividad depende de la concentración del filtrado del hongo, usada para las pruebas (15).

Silveira *et al.* (19), encontraron que filtrados de *V. hemileiae* Bour., crecidos en el medio Czapek suplementado con caseína o caseína hidrolizada, inducían la desintegración de urediniosporas de *Puccinia hordei* Otth., *Uromyces gabae* (Pers.) de Bary y *Uromyces trifolii* (Hew. f) Lev., lo cual indica que estos metabolitos actúan sobre varios géneros del orden Uredinales.

Leal *et al.* (11) correlacionaron la actividad proteolítica y pectolítica de las especies de *Verticillium* con el efecto lítico observado en la roya. Concluyeron en sus experimentos que todas las especies patógenas de *Verticillium* estudiadas, son pectolíticas y no proteolíticas y las especies no patógenas como *V. hemileiae* (*V. lecanii* en la clasificación taxonómica actual) tienen actividad proteolítica y no pectolítica (9, 10).

Efecto del extracto de *V. lecanii* sobre los períodos de incubación y latencia de *H. vastatrix* en plántulas de café. Los resultados (Figura 2, Tabla 2) indican que el filtrado de *V. lecanii* prolonga los períodos de incubación y de latencia de *H. vastatrix*. En las plantas asperjadas previamente con el extracto de *V. lecanii* el período de incubación se prolongó en promedio 5 días, y el de latencia 7 días, en relación con el testigo.

TABLA 2. Efecto de extractos de *Verticillium lecanii* sobre la duración de los períodos de incubación y latencia de *Hemileia vastatrix*. CENICAFE.

	PI* (días)	PL** (días)
Roya	20	32
<i>Verticillium</i>	25	39

*PI : Cuando en el 75% de sitios inoculados se observan síntomas de enfermedad. Grados en la escala de Leguizamón mayores ó iguales a 1.

**PL : Cuando el 75% de sitios inoculados y con síntomas de enfermedad esporulan. Grados en la escala de Leguizamón mayores ó iguales a 4.

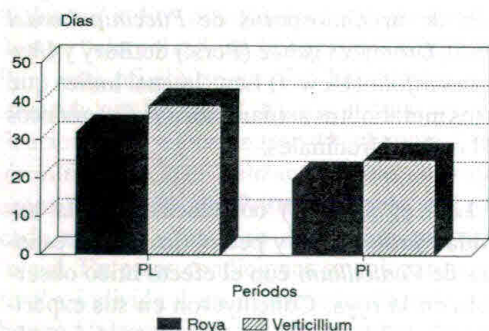


Figura 2. Efecto de los extractos de *Verticillium lecanii* sobre los períodos de incubación y de latencia de urediniosporas de *Hemileia vastatrix*. CENICAFE.

Efecto del extracto de *V. lecanii* sobre el grado de infección de *H. vastatrix* en plántulas. El filtrado de *V. lecanii* afectó a través del tiempo el desarrollo de *H. vastatrix* (Figura 3). La diferencia entre los tratamientos fue altamente significativa y persistente a través del tiempo, lo que se demuestra por la prueba de "t" en cada lectura (Tabla 3).

La reducción del grado de infección de *H. vastatrix* por efecto de los extractos metabóli-

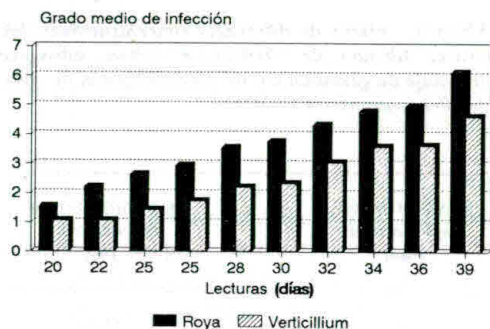


Figura 3. Comportamiento del grado medio de infección de *Hemileia vastatrix* (Escala de Leguizamón) a través del tiempo. CENICAFE.

cos de *V. lecanii*, ha sido registrada previamente por algunos autores, con otros géneros de hongos hiperparásitos de *H. vastatrix* (6). Un gran número de hongos y bacterias puede desarrollarse sobre las pústulas de roya. Por ejemplo, *Cladosporium hemileiae*, *Fusarium* sp y *Paranectria hemileiae*, parasitan las urediniosporas y reducen la infección ocasionada por éstas (15).

Martins *et al.* (14, 15) sugieren que estos metabolitos fúngicos actúan como elicitores e inducen la formación de otros compuestos como mecanismo de defensa de las plantas a la infección.

Diferentes aislamientos bacterianos han sido asociados con la resistencia inducida en plantas contra hongos patógenos (17). Dehne *et al.*, citados por Roveratti (17), observaron que el tratamiento de plantas de trigo con *Bacillus subtilis* o sus productos metabólicos inducían un alto nivel de resistencia contra *Erysiphe graminis* f.s. *tritici*. El desarrollo del patógeno fue inhibido considerablemente y hubo una reducción significativa en la intensidad de la esporulación y en la formación de cleistotecios.

El tratamiento de hojas de café con productos comerciales a base de *Bacillus*

TABLA 3. Análisis estadístico del grado medio de infección de la Roya del café por lectura y comparación de los tratamientos estudiados mediante la prueba de "t". CENICAFE.

Lecturas (días después de la inoculación)	Tratamientos					
	Roya			<i>V. lecanii</i>		
	N	\bar{X}	CV	N	\bar{X}	CV
20	153	1,54	58,82	141	1,06	88,17
		t =	4,48	p > t:	0,0001	
22	145	2,22	36,95	146	1,06	79,94
		t =	11,84	p > t:	0,0001	
25	145	2,64	24,99	146	1,43	86,79
		t =	12,26	p > t:	0,0001	
26	145	2,95	23,73	146	1,73	63,71
		t =	11,15	p > t:	0,0001	
28	145	3,55	22,18	146	2,20	55,32
		t =	11,23	p > t:	0,0001	
30	145	3,76	20,04	146	2,33	55,15
		t =	11,56	p > t:	0,0001	
32	145	4,32	20,56	147	3,05	44,49
		t =	9,46	p > t:	0,0001	
34	145	4,80	20,26	146	3,58	40,30
		t =	8,43	p > t:	0,0001	
36	145	4,97	22,28	146	3,63	41,09
		t =	8,62	p > t:	0,0001	
39	145	6,14	14,85	147	4,62	28,20
		t =	11,54	p > t:	0,0001	

thuringiensis o con una suspensión pura de la bacteria, indujo protección local contra una inoculación posterior con una raza patogénica de *H. vastatrix* (17).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que los metabolitos de *V. lecanii* inducen protección en el área de la hoja asperjada, tal como se ha demostrado en otras relaciones entre no-patógenos y café y otros complejos patogéno-hospedantes (13).

Estos hiperparásitos no existen en número suficiente como para asegurar un control natural de la roya. Es necesario un mejor conocimiento de la biología de estos hongos, así como de las condiciones ecológicas y de la diseminación artificial en el campo de estos antagonistas de *H. vastatrix*.

Efecto del extracto de *V. lecanii* sobre "chapolas" de la variedad Caturra. Al sumergirse las raíces de plántulas de la variedad Caturra en estado cotiledonar, en el extracto filtrado del hiperparásito, se produjo en corto tiempo (entre 24 a 48 horas) marchitamiento y reducción del 41% de su peso con respecto al peso inicial, mientras que en las plántulas testigo sumergidas en agua destilada estéril la reducción fue del 7% (Tabla 4). Estos resulta-

TABLA 4. Variación en el peso de plántulas de café var. Caturra, en estado cotiledonar, 24 - 48 horas después de sumergidas en el extracto filtrado de *Verticillium lecanii*. CENICAFE.

	Peso(g)			Pérdida (%)
	Inicial	Final	Diferencia	
Extracto	0,6147	0,3662*	0,2485	40,77
C.V. (%)	18,91	31,15	44,79	
Agua	0,60508	0,56233	0,04275	7,05
C.V. (%)	18,84	20,77	68,8	

* Presenta diferencia significativa. Prueba de t al 5%.

dos coinciden con los registrados por Renaud en 1985 (16) con el hongo *Eutypa armeniacae*, agente etiológico de la Gomosis de la vid, mediante el empleo de una prueba de toxicidad o "test biológico" en plantas de tomate. La evaluación del efecto del extracto obtenido del hongo *V. lecanii* sobre "chapolas" de la variedad Caturra se hizo mediante una modificación a esta técnica. Lo anterior, evidencia la presencia de metabolitos tóxicos en el extracto, posiblemente asociados con el efecto sobre urediniosporas de roya.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a la Doctora Lucelly Orozco Gallego de la disciplina de Biometría de Cenicafe por su colaboración en el análisis estadístico de los datos y sus valiosas sugerencias.

LITERATURA CITADA

1. ALVAREZ G., I.C.; SIERRA S., C.A. Metodología para la evaluación del efecto de fungicidas sobre la reproducción de *Hemileia vastatrix*. Cenicafe (Colombia) 40(1):15-25. 1989.
2. BAKER, K.F.; COOK, R.J. Biological control of plant pathogens. San Francisco. (Estados Unidos), W.H. Freeman and Company, 1974. 433 p.
3. BLAKEMAN, J.P.; FOKKEMA, N.J. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. Annual Review of Phytopathology. (Estados Unidos) 20:167-192. 1982.
4. ESKES, A.B. Assessment methods for resistente to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk. and Br.) In: ESKES, A.B. Incomplete resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). Wageningen (Holanda), Agricultural University of Wageningen, 1983. p. 4-14 (Doctoral thesis).

5. ESKES, A.B.; MENDES, M.D.L.; ROBBS, C.F.; GAMS, W. Estudos do hiperparasitismo de *Hemileia vastatrix* por *Verticillium* spp. In: CONGRESSO Paulista de Fitopatologia. 10. Piracicaba, (Brasil) 9-12 Fevereiro de 1987. Resumos. Piracicaba (Brasil), Grupo Paulista de Fitopatologia, 1987.
6. FORRER, H.R. Possibilities of the utilization of Hyperparasites and application of natural compounds for the control of rusts. In: LUCHA contra la roya del café; informe sobre un seminario de estudios en Paipa, (Colombia), octubre 1979. Eschbron (Alemania), Agency for Technical Cooperation, 1979. p.63-70.
7. GARCIA A., I.; LEAL, J.A.; VILLANUEVA, J.R. Lysis of uredospore germ tubes of rusts by species of *Verticillium*. Phytopathology (Estados Unidos) 55(1):40-42. 1965.
8. GATTANI, M.L. Lysis in rust uredospore germ tubes. Phytopathology (Estados Unidos) 42(2):70-71. 1952.
9. LEAL, J.A.; GARCIA A., I.; VILLANUEVA, J.R. Proteolytic activity of growth media filtrates from non-pathogenic species of *Verticillium*. Nature (Inglaterra) 200(4903): 290-291. 1963.
10. LEAL, J.A.; VILLANUEVA, J.R. Lack of pectic enzyme production by non-pathogenic species of *Verticillium*. Nature (Inglaterra) 195(4848):1328-1329. 1962.
11. LEAL, J.A.; VILLANUEVA, J.R. Fungilytic activity of species of *Verticillium*. Science (Estados Unidos) 136(3517): 715-716. 1962.
12. LEGUIZAMON C., J.E. Contribution à la connaissance de la resistance incomplete du cafeier à *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. Montpellier (Francia), Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier. 1983. 183 p. (Tesis Docteur Ingenieur en Agronomie).
13. LEVINE, M.N.; BAMBERG, R.H.; ATKINSON, R.E. Microorganisms antibiotic or pathogenic to cereal rusts. Phytopathology (Estados Unidos) 26:99-100. (Abstr.). 1936.
14. MARTINS, E.M.F.; MARIA, A.C. DE; GRUNEWALDT-STOCKER, G.; MORAES, W.B.C. Changes in the resistance of detached coffee leaves by yeast extract filtrate and heat treatment. Fitopatologia Brasileira (Brasil) 11:898-909. 1986.
15. MARTINS, E.M.F.; ROVERATTI, D.S.; MORAES, W.B.C. Elicitation of stress metabolites in coffee leaves by a non-pathogen. Fitopatologia Brasileira (Brasil) 11:683-695. 1986.
16. RENAUD, T.M. Isolement et identification de metabolites secondaires et phytotoxiques d'*Eutypa armeniacae*. Neuchatel (Suiza). Université de Neuchatel, 146 p.1985. (Tesis Ph.D.).
17. ROVERATTI, D.S.; TEIXEIRA, A.N.R.; MORAES, W.B.C. *Bacillus thuringiensis*; a new perspective for an induced protection to coffee leaf rust. Journal of Phytopathology (Alemania) 126(2):149-159. 1989.
18. SHAW, D.E. *Verticillium lecanii* a hyperparasite on the coffee rust pathogen in Papua New Guinea. Australasian Plant Pathology (Australia) 17(1):2-3. 1988.
19. SILVEIRA, H. L.; RODRIGUES J.R., C.J. Bursting of rust uredospores caused by *Verticillium hemileiae* Bour. culture filtrates. Agronomia Lusitana (Portugal). 33(1/4):391-396.1971.
20. SUBRAMANIAN, S. Problems in pathology of coffee. Indian Coffee (India) 36(2-3):81-85. 1972.
21. WHIPPS, M. Use of microorganisms for biological control of vegetable diseases. Aspects of Applied Biology (Inglaterra) 12: 75-94. 1984.