

ESTUDIO MACRO Y MICROSCOPICO DEL EFECTO DE *Verticillium lecanii* SOBRE EL DESARROLLO DE LESIONES DE LA ROYA DEL CAFETO

Patricia Eugenia Vélez-Arango*

RESUMEN

VELEZ A., P.E. Estudio macro y microscópico del efecto de *Verticillium lecanii* sobre el desarrollo de lesiones de la roya del café. *Cenicafé (Colombia)*, 42(1):13-20, 1991.

En el Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFE, se encontró que el cultivo licuado (micelio y conidias) y el extracto metabólico de *V. lecanii* cultivado en caldo papa dextrosa (CPD) afectó la evolución de la lesión y la germinación de urediniosporas de *Hemileia vastatrix*. Al asperjar cultivo licuado de *V. lecanii* sobre lesiones establecidas de *H. vastatrix*, se observó cubrimiento e invasión de la lesión por el micelio blanco del hongo con pérdida completa de ésta. El extracto metabólico de *V. lecanii* asperjado a lesiones establecidas de *H. vastatrix*, originó una depresión central en la lesiones que se acentuó a través del tiempo. Microscópicamente el efecto se manifestó con inhibición total de la germinación y algunos cambios morfológicos en las urediniosporas. Histológicamente las hojas asperjadas con el cultivo de *V. lecanii* mostraron al micelio del hongo formando redes alrededor de las urediniosporas de roya, en el sitio de penetración al estoma. El cultivo y extracto metabólico de *V. lecanii* asperjado en hojas sanas, no provocó ningún cambio visible en la hoja. El seguimiento efectuado, evidencia el efecto erradicativo de *V. lecanii* y su inocuidad en plantas sanas; factores fundamentales en un microorganismo usado en control biológico.

Palabras claves: Roya del café, control biológico, hiperparasitismo, *Verticillium lecanii*.

ABSTRACT

In the National Coffee Research Centre, CENICAFE, it was found that liquid culture (mycelium and conidia) and metabolic extracts of *V. lecanii* grown on potatoe dextrose medium (PDM) affected the evolution of the lesion and the germination of the urediniospores of *Hemileia vastatrix*. After spraying liquid culture of *V. lecanii* on established lesions of *H. vastatrix*, it was observed that the white mycelium of the fungus covered and invaded the lesion with complete loss of the lesion. The metabolic extract of *V. lecanii* sprayed onto established lesions of *H. vastatrix* formed a central depression in the lesion which became more accentuated with time. Microscopically the effect was manifested by total inhibition of spore germination and morphological changes in the urediniospores. Histologically, the leaves sprayed with a culture of *V. lecanii* showed the mycelium of the fungus formed nets around the urediniospores of the rust, in the site of penetration at the stoma. The cultivate and metabolic extract of *V. lecanii* sprayed onto healthy leaves did not cause any visible change in the leaf. The following work presents evidence of the erradicative action of *V. lecanii* and its lack of effect on healthy leaves; fundamental factors required for a microorganism used in biological control.

Keywords: Coffee leaf rust, biological control, hyperparasitism, *Verticillium lecanii*.

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

El hongo *Verticillium lecanii* se ha encontrado naturalmente en hojas de café, creciendo sobre lesiones esporuladas de roya en condiciones de alta humedad (8).

Spencer y Atkey (11), en experimentos realizados en invernadero, registraron reducción en el grado de infección de *Uromyces dianthi*, roya del clavel, en presencia de *V. lecanii*. Cuando *V. lecanii* y *Puccinia recondita* se aplicaron simultáneamente a secciones de hojas de trigo, el grado de infección por roya marrón fue menor, con respecto a testigos en los que se aplicó *P. recondita* solamente.

Grabski y Mendgen (5), en estudios del parasitismo de la roya del frijol *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* por el hiperparásito *V. lecanii*, encontraron numerosas enzimas líticas en los filtrados de cultivo o extracto metabólico de *V. lecanii*. Cuando adicionaron sustratos específicos a dichos filtrados se encontró una degradación alta de quitina y almidón.

Hanssler et al. (7), investigando al microscopio de luz la interacción entre *Puccinia graminis* var. *tritici* y *V. lecanii*, encontraron el hiperparásito entre las urediniosporas de la roya, después de 24 horas de inoculación. Observaciones al microscopio electrónico de esta interacción confirmaron que la penetración directa depende fundamentalmente de la capacidad enzimática de *V. lecanii* (6).

Mendgen (9), no registró ataque de tubos germinativos de *V. lecanii* a *Puccinia striiformis*, *in vitro* pero, en hojas de trigo las hifas del hiperparásito crecieron internamente y alrededor de las urediniosporas.

García et al. (4), probaron en 40 especies de *Verticillium* la habilidad para causar lisis de los tubos germinativos de urediniosporas de 11

especies de roya. Sólo las cepas saprofitas de *V. hemileiae* (*V. lecanii* (Zimm.) Viegas) (2) mostraron actividad lítica sobre los componentes de las urediniosporas. Así mismo, se observó que tanto cultivos en crecimiento como filtrados de cultivo de *V. hemileiae* incorporados en agua causaron lisis de tubos germinativos de especies de *Puccinia* y otras royas (4).

Con criterios y metodologías sugeridas por los pioneros en el campo del control biológico de patógenos (1, 12), se han conducido experimentos en el Centro Nacional de Investigaciones de Café, en laboratorio e invernadero, los cuales demostraron la presencia de metabolitos en el extracto de *V. lecanii*. El extracto metabólico aplicado a plantas en invernadero con posterior infección por roya prolongó los períodos de incubación y latencia de *H. vastatrix* Berk. y Br., y disminuyó los índices de infección por roya (8).

Así mismo, ensayos de laboratorio confirmaron que el extracto metabólico de *V. lecanii* afectó drásticamente el proceso de germinación de las urediniosporas de roya. Estos ensayos en invernadero y laboratorio evidenciaron el efecto protector de dicho extracto contra la infección por roya (8).

Silveira y Rodríguez (10), encontraron que filtrados obtenidos de *V. hemileiae* Bour. inyectados en hojas de café con y sin roya, causaban desecación de los tejidos y aceleraban su caída.

Debido a que un agente de control biológico no debe causar toxicidad en los tejidos sanos de la planta sobre la cual se dirige el control, una etapa crucial la constituye el conocimiento del proceso mediante el cual se lleva a cabo este fenómeno biológico. Si el agente de control origina alguna alteración en la planta, debe eliminarse para uso en programas de manejo de patógenos (12).

Esta investigación tuvo como objeto evaluar específicamente el efecto del hongo *V. lecanii* sobre hojas de café sanas y afectadas por roya, mediante observaciones secuenciales en laboratorio e invernadero.

MATERIALES Y METODOS

El hongo *V. lecanii* aislado de lesiones de roya, se cultivó en Caldo Papa Dextrosa (CPD) a una temperatura promedio de 24 grados centígrados por un período de 10 a 12 días. Luego se tomó el extracto líquido, se centrifugó a 3.400 r.p.m. durante 15 minutos y se filtró a través de filtro Millipore por una membrana con tamaño de poro de 0,20 micras. Con la masa micelial se obtuvo asépticamente el cultivo licuado (micelio y conidias) del hongo.

Para los ensayos de invernadero se usaron 30 plantas de la variedad Caturra de 8 meses de edad, 15 con roya, inoculadas previamente en laboratorio y 15 sin roya. Se seleccionaron 2 hojas por planta y 5 plantas por tratamiento. Los tratamientos fueron:

- 1: 5 plantas sanas y 5 con roya, inoculadas con extracto metabólico de *V. lecanii*.
- 2: 5 plantas sanas y 5 con roya, inoculadas con cultivo licuado de *V. lecanii*.
- 3: 5 plantas sanas y 5 con roya, inoculadas con agua destilada estéril (testigos).

Las hojas con roya seleccionadas fueron evaluadas previamente para conocer el estado de infección, mediante la escala de Eskes (3) que correlaciona el número de lesiones con el porcentaje de área enferma; y se realizaron pruebas de germinación de las urediniosporas

presentes para determinar la efectividad del inóculo.

Las plantas asperjadas con extracto metabólico del hongo y con agua destilada estéril fueron dejadas 15 horas a la temperatura del laboratorio (24°C); y las asperjadas con cultivo licuado del hongo fueron llevadas inicialmente 15 horas a cámara húmeda, en oscuridad y humedad a saturación y posteriormente a invernadero con condiciones de temperatura y humedad relativa óptimas para el desarrollo de la enfermedad.

Para determinar macroscópicamente el efecto del extracto y el cultivo de *V. lecanii* en hojas sanas y afectadas por roya, se realizó un seguimiento a los 9, 14 y 17 días en condiciones de invernadero y 3, 5, 7 y 11 días en condiciones de laboratorio; se hicieron pruebas histológicas para observar el proceso de penetración e infección por roya usando para los cortes una base de gelatina al 20% y un criótomo. Se hicieron cortes de 10 micras. Además, se efectuaron observaciones al estereoscopio para todos los tratamientos y pruebas de germinación periódicas en los tratamientos 1, 2 y 3, para hojas con roya.

Con las mismas condiciones probadas para el experimento en invernadero se trabajó en el laboratorio con hojas individuales sanas y afectadas por roya, colocadas en cámara húmeda y sometidas a los mismos tratamientos anteriormente citados. Se realizaron pruebas de germinación de las urediniosporas y se consideró como buena, la germinación superior al 50%

RESULTADOS Y DISCUSION

El hongo *Verticillium lecanii* aislado de lesiones de roya y cultivado en caldo papa

dextrosa (CPD) desarrolló un micelio blanco algodonoso en 7 a 10 días. Al microscopio presentó conidias pequeñas hialinas que se agrupan sobre ramas verticiladas o conidióforos.

El seguimiento macroscópico en condiciones de invernadero y de laboratorio evidenció el siguiente comportamiento: El extracto metabólico de *V. lecanii* aplicado a hojas con un porcentaje de infección por roya mayor del 50% del área foliar, según la escala de Eskes y 90% de germinación de las urediniosporas, originó una depresión central de la lesión que se acentuó a través del tiempo. Las hojas sanas tratadas con el extracto metabólico de *V. lecanii* no presentaron ningún cambio en su morfología.

El cultivo licuado de *V. lecanii* asperjado a hojas con roya dió lugar a una invasión completa de la lesión por un micelio blanco algodonoso (Figura 1). Este cubrimiento fue mayor en buenas condiciones de humedad (prueba de laboratorio). El hongo tiene la capacidad de proliferar sólo en las áreas de la hoja que albergan lesiones de roya. Este comportamiento sugiere que *V. lecanii* utilizó como sustrato las urediniosporas de roya.

El cultivo de *V. lecanii* en un medio con urediniosporas de roya, mostró una clara evidencia de la capacidad que tiene el hongo de desarrollarse a expensas de las urediniosporas, utilizadas como único sustrato (Figura 2).

Las hojas sanas asperjadas con el cultivo licuado de *V. lecanii*, no mostraron ningún cambio aparente en su morfología con relación al testigo. Macroscópicamente se apreció en las hojas vestigios del cultivo licuado del hongo, que no proliferaron ni afectaron las características normales de la hoja aún en excelentes condiciones de humedad (prueba de laboratorio).



FIGURA 1. Aspecto macroscópico de hojas de café con roya, previa aplicación del cultivo de *V. lecanii*, a) en condiciones de invernadero 17 días después, y b) de laboratorio 3 días después de la aplicación del cultivo. Se observa cubrimiento progresivo de *V. lecanii* sobre las áreas esporuladas de la hoja.

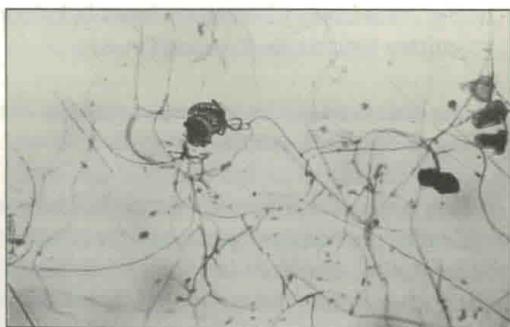


FIGURA 2. Aspecto microscópico de *V. lecanii* creciendo en medio de urediniosporas de roya como único sustrato.

Al estereoscopio se observó en las hojas con roya una depresión central en las lesiones asperjadas con el extracto metabólico; cubrimiento total de las urediniosporas de roya por el micelio blanco algodonoso en las lesiones asperjadas con el cultivo licuado; lesiones intactas o con síntomas de necrosis y esporas blanquecinas en el centro de la lesión como consecuencia del envejecimiento de las urediniosporas en las lesiones asperjadas con agua destilada estéril.

Histológicamente se presentaron algunos cambios morfológicos evidentes en las urediniosporas de *H. vastratrix* asperjadas con el extracto metabólico tales como: desintegración con pérdida del contenido, anomalías en las paredes con pérdida de espinas, pérdida de la turgencia y cambios relacionados con tinción (figura 3), al ser coloreadas con azul de lactofenol. Asimismo, se apreció el micelio del hongo formando redes alrededor de las urediniosporas en el punto de entrada al estoma, en las hojas asperjadas con cultivo licuado. En cuanto al desarrollo de micelio de *H. vastratrix* en el interior de la hoja se observaron cambios en las hifas, tales como engrosamiento e hinchazón anormal (Figura 4). Dichos cambios no se apreciaron en las plantas testigo.

En hojas de café sanas con previa aplicación de extracto y cultivo del hongo no se presentaron cambios anatómicos y los tejidos permanecieron intactos, con respecto al testigo.

La germinación de las urediniosporas de roya se afectó drásticamente al ser expuestas al extracto metabólico y cultivo de *V. lecanii*, reduciéndose en un 100% (Tabla 1) con respecto al testigo (Figura 5). Hubo evidencia de desarrollo de tubos germinativos engrosados, anormales, en los tratamientos asperjados con extracto metabólico y cultivo de *V. lecanii* en invernadero y laboratorio.

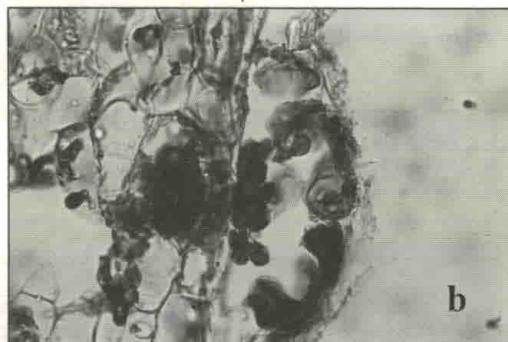
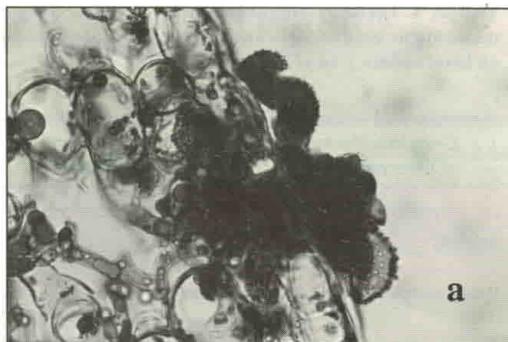


FIGURA 3. Aspecto histológico de las hojas de café con roya. a) Testigo y b) con previa aplicación del extracto en condiciones de laboratorio e invernadero: se observa pérdida de espinas que recubren la totalidad de la urediniospora; desintegración de las paredes de las urediniosporas con pérdida del contenido citoplasmático, cambios en tinción de las urediniosporas y pérdida de la turgencia de las urediniosporas.

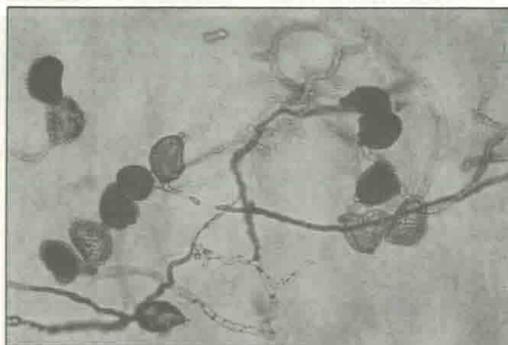


FIGURA 4. Micelio de *V. lecanii* formando redes en el punto de entrada de la urediniospora de roya al estoma de la hoja y engrosamiento de las hifas de *H. vastratrix* en el tejido interno de la hoja.

TABLA 1. Lecturas obtenidas en las pruebas de germinación de urediniosporas de roya a través del tiempo, en invernadero y en el laboratorio.

Germinación en invernadero		Germinación en Laboratorio	
Inicial	90%	Inicial	50%
9 días después	50% (t.) 0 (e.) 0 (c.)	6 días después	30% (t.) 0 (e.) 0 (c.)
28 días después	14% (t.) 0 (e.) 0 (c.)	13 días después	10% (t.) 0 (e.) 0 (c.)

t: testigo
e: extracto
c: cultivo

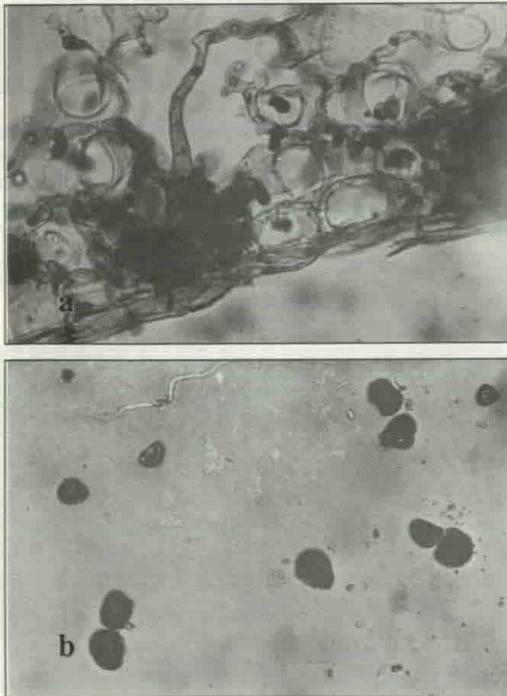


FIGURA 5. Aspecto microscópico de las pruebas de germinación de urediniosporas de roya a) en agua destilada estéril en condiciones de laboratorio e invernadero. b) Expuestas al extracto metabólico de *V. lecanii*.

Estudios citológicos de la degradación de *V. lecanii* a urediniosporas y teliosporas de *Uromyces appendiculatus*, evidenciaron estructuras semejantes a apresorios que iniciaban la penetración directa de las paredes de la urediniospora. Además, se observaron otras rutas adicionales de penetración: a través de los poros germinales de ambos tipos de esporas y a través de los pedicelos de las teliosporas; también se describió la degradación del citoplasma de las urediniosporas (5).

El seguimiento microscópico de la interacción *Puccinia graminis* var. *tritici* y *V. lecanii* mostró la penetración de las hifas del hiperparásito a través de los poros germinales y la pared de la urediniospora. Las paredes de las urediniosporas adyacentes a las hifas fueron destruidas y se encontró que la región más sensible de estas urediniosporas fue el plano ecuatorial. Las espinas y la película que cubren totalmente la urediniospora fueron más resistentes al ataque del hongo que la pared de la urediniospora. Los tubos germinativos de *P. graminis* fueron parasitados sólo en forma ocasional, pero hubo marcado efecto en su patrón de crecimiento (7).

Interacciones entre urediniosporas de *P. graminis* var. *tritici* y *V. lecanii* al microscopio electrónico, después de 72 horas, registraron disolución casi completa del contenido de la espora por efecto del hiperparásito. Las espinas y la película de las urediniosporas fueron más resistentes a la digestión enzimática de *V. lecanii* (6).

Las hifas del hiperparásito *V. lecanii* no penetraron el tejido esporógeno de la roya, *Puccinia striiformis* o el tejido de la hoja, pero presentaron ataque marcado a las paredes de la urediniospora y al contenido de la espora, dejando intactas la película y las espinas de las urediniosporas (9).

AGRADECIMIENTOS

Los resultados obtenidos en el seguimiento realizado coincidieron con las observaciones de la interacción *V. lecanii-U. appendiculatus*, *V. lecanii-P. graminis* var. *tritici* y *V. lecanii-P. striiformis*, en lo referente al ataque de las paredes de la uredinospora de roya con degradación de su citoplasma. Esta desintegración de las paredes de las uredinosporas de *H. vastatrix* con pérdida del contenido citoplasmático se atribuye a la presencia de enzimas líticas en los extractos metabólicos de *V. lecanii*, al igual que los cambios de tinción y la pérdida de la turgencia de las uredinosporas de roya.

Las interacciones *V. lecanii - P. striiformis*, *V. lecanii-H. vastatrix* no penetraron el tejido esporógeno o el tejido del hospedante.

A diferencia de la interacción *V. lecanii-P. graminis* var. *tritici* (7), en la cual sólo fueron parasitados los tubos germinativos de *P. graminis* en forma ocasional con marcado efecto en su patrón de crecimiento, la interacción *V. lecanii-H. vastatrix* contempló alteraciones en la germinación caracterizadas por anomalías en los tubos germinativos y pérdida de la germinación y ausencia de espinas en las uredinosporas. En las otras interacciones hiperparásito-roya, no se presentaron alteraciones en las espinas y la película que cubren totalmente la uredinospora (6, 9).

Lo anteriormente planteado, demostró el efecto erradicativo de *V. lecanii* asperjado a las hojas como extracto metabólico y como cultivo licuado, una vez ha tomado lugar la infección por roya. Por otra parte, el comportamiento de las hojas sanas asperjadas con extracto y cultivo de *V. lecanii* reflejó la inocuidad del hongo y su potencial para el uso en el control biológico de la roya del café.

Al Doctor Jairo Eduardo Leguizamón Caycedo de la disciplina de fitopatología y a la Microbióloga Adriana Gisela Rosillo Guerrero, en año rural en Cenicafé, quienes hicieron una revisión final del contenido de este artículo.

LITERATURA CITADA

1. BAKER, K.F. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology (Estados Unidos) 25:67-85. 1987.
2. DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. Compendium of soil fungi. Academic Press, New York (Estados Unidos) 1980, 840p.
3. ESKES, A.B. Incomplete resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). Wageningen, (Holanda) Agricultural University of Wageningen. 1983. 14p. (Doctoral thesis).
4. 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.
5. GRABSKI, G.C.; MDNGEN, K. Parasitism of the bean rust *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* by the hyperparasite *Verticillium lecanii*: studies on host recognition, penetration and degradation of the rust fungus spores. Journal of Phytopathology 115(2):116-123. 1986. (Resumen consultado en: Review of Plant Pathology 65(8). 1986).
6. HANSSLER, G.; KNORZER, M.; REISENER, H.J. Light microscope investigations of the interaction between *Puccinia graminis* var. *tritici* and *Verticillium lecanii*. Phytopathologische Zeitschrift 102 (3/4):310-319. 1981. (Resumen consultado en: Review of Plant Pathology 61(9). 1982).
7. HANSSLER, G.; HERMANN, M.; REISENER, H.J. Electron microscope observations of the interactions between urediospores of *Puccinia*

- graminis* var. *tritici* and *Verticillium lecanii*. *Phytopathologische Zeitschrift* 103(2):139-148. 1982. (Resumen consultado en: Review of Plant Pathology 61(9). 1982).
8. LEGUIZAMON C., J.E.; VELEZ A., P.E. Efecto de extractos de *Verticillium lecanii* sobre la roya del cafeto *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. In: Congreso ASCOLFI, 9. San Juan de Pasto, Colombia, Junio 22-24. 1988.
 9. MENDGEN, K. Growth of *Verticillium lecanii* in pustules of stripe rust (*Puccinia striiformis*). *Phytopathologische Zeitschrift* 102 (3/4)301:309. 1981. (Resumen consultado en Review of Plant Pathology 61(9). 1982).
 10. SILVEIRA, H.L.; RODRIGUES Jr., C.J. Bursting of rust uredospores caused by *Verticillium hemileiae* Bour. Culture filtrates. *Agronomía Lusitana* (Portugal) 33 (1-4): 391-396. 1971.
 11. SPENCER, D.M.; ATKEY, P.T. Parasitic effects of *Verticillium lecanii* on two rust fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 77(3):535-542. 1981. (Resumen consultado en: Review of Plant Pathology 61(7). 1982).
 12. WHIPPS, J.M. Use of microorganisms for biological control of vegetable diseases. *Aspects of applied Biology* (Inglaterra) 12: 75 - 94. 1986.