

# EFFECTO PROTECTOR DE LA BACTERIA *Bacillus thuringiensis* EN PLANTAS DE CAFE CONTRA EL DESARROLLO DE *Hemileia vastatrix* Berk. y Br.

Marco Aurelio Cristancho-Ardila\*, Jairo Eduardo Leguizamón-Caycedo\*\*

---

## RESUMEN

**CRISTANCHO A., M.A. Efecto protector de la bacteria *Bacillus thuringiensis* en plantas de café contra el desarrollo de *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. Cenicafé (Colombia) 46(3): 140-151. 1995.**

Los aislamientos y productos comerciales de *Bacillus thuringiensis* (Bt) en las concentraciones evaluadas sobre discos de hojas y plántulas de *Coffea arabica* var. Caturra presentaron efecto protector contra la roya del cafeto, medido por la reducción en el grado de infección de *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. En plántulas de var. Caturra el efecto inductor fue al menos de 16 días y tuvo un máximo de acción a los 8 días después de la aplicación de la suspensión bacteriana. La mayor reducción en el desarrollo de la infección por roya fue obtenida en plántulas en condiciones de umbráculo asperjadas con la formulación comercial de la bacteria DIPEL a una concentración de 10g/l. Con la aspersión simultánea de Bt y el hiperparasito *Verticillium lecanii* no fue observado un mayor efecto protector que con los dos microorganismos inoculados individualmente. Todos los aislamientos de la bacteria afectaron la tasa de germinación de *H. vastatrix*. Estudios histológicos mostraron en los tejidos de hojas de café var. Caturra, tratados con la bacteria, compuestos autoflorescentes del tipo fenólico. La tinción de lesiones con dietanol mostró urediniosporas en todos los casos incompletos, producidos en las hojas tratadas y en muchos casos, el proceso fue inhibido totalmente, afectando la producción de urediniosporas. También fue posible observar la disminución de células madres de haustorios en hojas tratadas con la bacteria.

**Palabras claves:** *Hemileia vastatrix*, *Bacillus thuringiensis*, café, hongos, control biológico, enfermedades, bacterias.

---

## ABSTRACTS

Various isolates and commercial *Bacillus thuringiensis* (Bt) products were evaluated on leaf discs and plantules of *Coffea arabica* var. Caturra which produced a protective effect against coffee leaf rust *Hemileia vastatrix* Berk. y Br., as measured by a reduction in the level of infestation of the rust. With plantules of var. Caturra the inductor effect was at a minimum at 16 days and had a maximum effect 8 days after application of the bacterial suspension. The greatest reduction in development of rust infection was obtained on plantules in greenhouse conditions sprayed with a commercial formulation of the bacteria (DIPEL) at an concentration of 10g/l. A simultaneous application of Bt and the fungal hyperparasite *Verticillium lecanii* showed no greater protective effect than when the two microorganisms were applied separately. All isolates of the bacteria affected the rate of germination of *H. vastatrix*. Histological studies of var. Caturra leaf tissue treated with the bacteria displayed fluorescent phenolic-type compounds. Lesions stained with diethanol showed that the urediniospores produced in the treated tissues were in all cases incomplete and in many cases there was total inhibition with no production of urediniospores. It was also possible to observe the reduction of haustorium mother cells in leaves treated with the bacteria.

**Keywords:** *Hemileia vastatrix*, *Bacillus thuringiensis*, coffee, fungus, biological control, diseases, bacteria.

---

\* Asistente de Investigación. Fitopatología. Centro Nacional de Investigaciones de café CENICAFE, Chinchiná, Caldas.

\*\* Investigador Principal I. Fitopatología. Centro Nacional de Investigaciones de café CENICAFE, Chinchiná, Caldas.

El mecanismo de inmunización inducida en plantas ha sido estudiado desde comienzos del siglo pero solo recientemente fue vislumbrado su potencial para el control de las enfermedades (26).

Hojas de café previamente tratadas con una suspensión de urediniosporas de *H. vastatrix* muertas al calor, filtrados de las urediniosporas, suspensiones de diferentes especies bacterianas, o muchos otros hongos y bacterias no patogénicas han resultado protegidas del patógeno. La protección fue local o sistémica y fue evidente por el decrecimiento en el número de lesiones por hoja. Esta reducción en la severidad de la infección no siempre se debió a la protección inducida, sino que en algunos casos fue o el resultado del efecto local del inductor sobre la germinación de las urediniosporas del patógeno, o debido a baja adhesión de las urediniosporas sobre la superficie del hospedante (25).

Se encontró protección en plantas de café *C. arabica* variedad Mundo Novo tratadas con una suspensión de *B. thuringiensis* o con tres de los productos comerciales preparados con base en diferentes cepas de la bacteria (Thuricide, Bactimos y Bactospeine), contra una inoculación tardía de urediniosporas de roya del café. Thuricide proporcionó un efecto sistémico en concentraciones de 5 a 20 mg/ml; la protección llegó al 90% y se mantuvo durante un mínimo de 5 semanas. Se determinó la resistencia inducida, por la reducción en el número promedio de lesiones en hojas tratadas, cuando se hizo comparación con hojas no tratadas. Una reducción en el tamaño de la lesión, así como en el tiempo de esporulación también fue observada en los tratamientos (25).

Experimentos de campo llevados a cabo en el Brasil durante tres años consecutivos con la aplicación de Thuricide, *B. subtilis* o *Saccharomyces cerevisiae* sobre plantas de café mayores de 2 años, han mostrado la posibilidad de usar estos métodos alternos contra el patógeno en el futuro (22).

Extractos del hiperparásito *V. lecanii* disminuyen la tasa de germinación de urediniosporas de roya del café, prolongan la aparición de los períodos de incubación y de latencia del hongo, reducen el grado de infección y la tasa de producción de urediniosporas de roya. El efecto persistió a través del tiempo (18).

Durante el proceso de inducción de resistencia contra enfermedades, las plantas sintetizan compuestos de distintas características como la calosa, la celulosa, las proteínas, la suberina, gomas, silicona, fenoles y quitinasas (2, 5, 6, 23, 30). Numerosos estudios han mostrado que se presenta un incremento en la producción de compuestos fenólicos, muchos de los cuales pueden estar envueltos en la acumulación de fitoalexinas y/o compuestos similares a ligninas, los cuales integran las papilas y paredes celulares. Este incremento en la acumulación de compuestos fenólicos contribuye a las características fluorescentes frecuentemente asociadas con las interacciones resistentes (2, 12, 20).

La inhibición de la penetración de muchas royas ha sido asociada directamente con la lignificación de la pared celular directamente bajo el apresorio (11). Otro tipo de respuesta observado en las plantas como reacción a la presencia de un microorganismo es la hipersensibilidad. La formación de manchas necróticas está acompañada por un incremento en compuestos fenólicos y flavonoides (13).

Dentro de las sustancias depositadas por células de la planta en respuesta a la infección en plantas de *C. arabica* var. Colombia se encuentran compuestos similares a las ligninas<sup>1</sup>. Compuestos del tipo fitoalexinas también han sido encontrados en interacciones incompatibles roya-café (24) así como polímeros del tipo calosa (3).

<sup>1</sup> GAITÁN, A. Comunicación personal. 1990



En el presente trabajo fue estudiado el efecto protector de *B. thuringiensis* contra la roya del cafeto *H. vastatrix*, utilizando aislamientos puros o formulaciones comerciales de la bacteria en hojas de *C. arabica* var. Caturra, el control de la enfermedad efectuado al aplicar simultáneamente una suspensión de *B. thuringiensis* y *V. lecanii* y el posible papel que juega en la resistencia la síntesis de compuestos autofluorescentes por parte de células del mesófilo de la hoja de café.

## MATERIALES Y METODOS

**Plantas y microorganismos inductores.** Las urediniosporas de roya del café utilizadas en este experimento fueron recolectadas a partir de lesiones de plantas de la variedad Caturra inoculadas en invernadero con la raza XVII de *H. vastatrix* ( $v_1 v_2 v_3$ ), utilizando para las inoculaciones una concentración de  $7,5 \times 10^3$  urediniosporas/ml.

Para el experimento en invernadero fueron utilizadas plantas de *C. arabica* var. Caturra de seis meses de edad, sembradas en bolsas plásticas con capacidad de 2 Kg de una mezcla de suelo y pulpa en proporción 3:1.

Las cepas de *B. thuringiensis* utilizadas fueron CEN-104, CEN-105, CEN-106, CEN-107, CEN-108 y CEN-109 aisladas a partir de muestras de suelo y de desechos animales de la zona cafetera colombiana, el producto comercial M-ONE *B. thuringiensis* San Diego (Mycogen Co., San Diego, California), el producto comercial DIPEL *B. t. kurstaki* (Sandoz, Basilea, Suiza), un aislamiento de *B. t. kurstaki* (Btk) del CIBC de Inglaterra y una cepa liofilizada de la bacteria obtenida del CIMIC-Uniandes (Bogotá, Colombia).

Las cepas inductoras fueron sembradas en Agar Nutritivo e incubadas a 30°C durante 96h.

Después de este tiempo fueron realizados lavados de la bacteria y la suspensión final fue llevada a una concentración de  $3 \times 10^8$  ufc/ml. en agua destilada estéril, excepto para los tratamientos en los cuales fue señalada una concentración diferente.

La cepa de *V. lecanii* CEN 104 fue aislada a partir de lesiones de roya parasitadas por el hongo y cultivada en PDA (18). Fue incubada durante 15 días a una temperatura promedio de 25°C y la suspensión final fue llevada a una concentración de  $1,5 \times 10^6$  conidias/ml en agua destilada estéril.

**Efecto de *B. thuringiensis* sobre la germinación de las urediniosporas de roya.** Para este ensayo fue utilizada la metodología desarrollada por Da Silva y Martins (27) para determinar la capacidad germinativa de urediniosporas de roya del café en medio Agar Agua. Fueron inoculados en cajas de petri con medio Agar-Agua al 1,5%, cada uno de los diferentes aislamientos de *B. thuringiensis* con una concentración de  $3 \times 10^8$  ufc/ml., por el método de siembra masiva. Una hora después de la siembra de la bacteria fueron depositadas 5 alícuotas de 10  $\mu$ l de una suspensión de urediniosporas de roya de una concentración de  $5 \times 10^4$  urediniosporas/ml.

Las cajas petri fueron colocadas en oscuridad a una temperatura de 25°C y fueron realizadas lecturas de germinación de las urediniosporas 6 horas después, tomando como urediniospora germinada aquella que presentaba un tubo germinativo mayor que dos veces el diámetro de la misma. Fueron contados 5 campos al microscopio de cada una de las 5 alícuotas de roya depositadas.

**Efecto de *B. thuringiensis* sobre el desarrollo de lesiones de roya en discos de hojas.** Para este experimento fue utilizada la metodología desarrollada por Leguizamón (17), para la inoculación de discos de hojas de café con urediniosporas de *H. vastatrix*.

Fueron cortados rodetes de hojas de 2 cm. de diámetro y sumergidos en una suspensión de células de la cepa Btk-Inglaterra de diferente concentración de acuerdo al tratamiento, durante 5 minutos. Después fue efectuada la inoculación de los discos de hojas con gotas de 10 µl de una suspensión de urediniosporas de roya, inoculación que fue llevada a cabo a diferentes tiempos de acuerdo al tratamiento. Fueron inoculados un total de 10 discos de hojas por tratamiento y se realizaron 3 repeticiones por tratamiento.

Los diferentes tratamientos de la bacteria fueron:  $3 \times 10^8$  ufc/ml,  $\frac{1}{2} 3 \times 10^8$  ufc/ml y  $\frac{1}{4} 3 \times 10^8$  ufc/ml. Cuatro días después, fue efectuada la aplicación de la suspensión de urediniosporas de roya. De igual forma fue llevado a cabo un tratamiento con aplicación de la bacteria a una concentración de  $3 \times 10^8$  ufc/ml y aplicación de una suspensión de urediniosporas de roya ocho días después. Los discos de hojas fueron colocados en cámara húmeda a una temperatura promedio de 25°C, 10 horas de luz y 14 horas de oscuridad por día. Las lecturas del desarrollo de las lesiones de roya fueron realizadas durante 40 días, después de la inoculación con roya.

**Bioensayos de umbráculo.** Para los experimentos realizados en umbráculo con techo de guadua y plástico (50% de sombra), fue utilizado un diseño completamente al azar tomando como unidad experimental la hoja, diez plantas por tratamiento, e inoculación de cada uno de los tratamientos en los segundos pares de hojas de cada plántula. La severidad de la enfermedad fue medida por medio de la escala de Eskes (7) para hojas con lesiones esporuladas y fueron realizadas tres repeticiones por tratamiento.

Plantas de *C. arabica* var. Caturra fueron inoculadas con la cepa Btk-Inglaterra en el envés de los segundos pares de hojas, con una aspersora manual en una concentración de  $3 \times 10^8$  ufc/ml. Las urediniosporas de roya fueron inoculadas posteriormente, con los intervalos

de tiempo señalados para cada experimento en una concentración de  $7,5 \times 10^3$  urediniosporas/ml. Fueron realizados entonces los siguientes experimentos:

- 1. Medición del tiempo de permanencia del efecto inductor.** En este experimento fue asperjada la bacteria sobre las plántulas de café, inoculando posteriormente por aspersión una suspensión de urediniosporas de roya con intervalos de 4, 8 y 16 días después de la aplicación de la bacteria. Las plantas fueron llevadas a condiciones de umbráculo (50% de sombra) a una temperatura promedio de 21°C.
- 2. Efecto de la aplicación de *B. thuringiensis* crecida en pulpa de café, sobre las lesiones de roya.** En este experimento fue sembrada la cepa Btk-Inglaterra sobre un medio con pulpa de café preparado de la siguiente forma: pulpa de café 10% (P/V), NaCl 1% Peptona 1% y agua destilada 88%.

La bacteria fue inoculada por el envés de los segundos pares de hojas de plántulas de café var Caturra, con una aspersora manual. Fueron efectuados los siguientes tratamientos: Btk + pulpa de café, Btk + agua destilada, inoculación del medio de pulpa de café y un testigo en el cual fue aplicada agua destilada. Ocho días después fue asperjada por el envés de las hojas de una suspensión de roya con una concentración de  $7,5 \times 10^3$  urediniosporas/ml. Las plantas fueron llevadas a condiciones de umbráculo (50% de sombra) a una temperatura promedio de 21°C.

- 3. Efecto de la concentración de la bacteria sobre el desarrollo de lesiones de roya.** En este experimento fue aplicada la bacteria en concentraciones de  $3 \times 10^8$  ufc/ml,  $\frac{1}{2} 3 \times 10^8$  ufc/ml,  $\frac{1}{3} 3 \times 10^8$  ufc/ml y fue realizado un tratamiento inoculando el producto DIPEL en una concentración de 10 g/l. Ocho días después fueron inoculadas las urediniosporas



de roya por aspersión dirigidas al envés de las hojas. Las plantas fueron llevadas a condiciones de umbráculo (50% de sombra) a una temperatura promedio de 21°C.

- 4. Efecto de la aplicación simultánea de *B. t. k.* y *V. lecanii* sobre el desarrollo de lesiones de roya.** En este experimento fue asperjado el envés de las hojas con una suspensión de la cepa Btk, del hongo *V. lecanii* y una mezcla de una suspensión de los dos microorganismos. Ocho días después, las plantas fueron inoculadas por aspersión con una suspensión de urediniosporas de roya.

Las plantas fueron llevadas a un cuarto húmedo (Humedad a saturación) y se mantuvieron allí por 48 horas y posteriormente, en condiciones de umbráculo (50% de sombra) y a una temperatura promedio de 21°C.

**Seguimiento histológico de las lesiones.** Se tomaron muestras de hojas a partir de plantas tratadas con la bacteria y plantas testigo sin tratar, y fueron realizados cortes al criótomo con un espesor de 30 µm; algunos cortes fueron observados directamente al microscopio de fluorescencia para determinar la producción de compuestos autofluorescentes por parte de células de la hoja y otros compuestos fueron marcados con el compuesto dietanol mediante el siguiente procedimiento: fijación en solución de lactofenol-etanol en proporción 1:2 a una temperatura de 100°C en estufa, inmersión de los cortes en solución de cloroformo-metanol durante 1 hora, inmersión en solución de buffer Tris pH 8,5 durante 30 minutos y coloración con una solución de dietanol al 0,1% durante 5 minutos. Los cortes fueron montados en una solución de glicerol al 50% y observados al microscopio de fluorescencia (15, 29).

Con algunos de estos cortes fue realizado el ensayo con el reactivo de Wiesner (Floroglucinol-HCl), para detectar la presencia de guaiacil-ligninas (19).

## RESULTADOS Y DISCUSION

**Inhibición de la germinación de las urediniosporas.** Todos los aislamientos presentaron alto grado de inhibición de la germinación de las urediniosporas de roya y no hubo diferencias entre las cepas probadas (Tabla 1). El pH de las diferentes suspensiones bacterianas aplicadas estuvo entre 6,2 y 6,7 que se encuentra dentro del rango óptimo para la germinación de las urediniosporas de roya, lo cual indicó que el efecto inhibitorio fue debido totalmente a la acción de la bacteria directamente ó de alguno de sus productos metabólicos. El efecto inhibitorio pudo ser causado por alguna de las distintas toxinas producidas por la bacteria, ya que algunas de estas son tóxicas a organismos diferentes de insectos, que es el grupo para el cual ha sido ampliamente probada la acción tóxica de la bacteria (1).

Algunos compuestos inhibidores de la germinación de urediniosporas de roya de café han sido purificados e identificados a partir de las urediniosporas mismas del patógeno (10), pero no a partir de otros microorganismos como el hiperparásito de royas *V. hemileiae* (28). Dos de las cepas nativas aisladas en el laboratorio fueron las que mayor efecto inhibitorio tuvieron sobre la germinación de las urediniosporas, por tanto, podría vislumbrarse la posibilidad de desarrollar un producto biológico para el control de la roya con cepas nativas de la bacteria, aunque habría que estudiar el grado de control de la enfermedad en plantas en invernadero y campo con estos aislamientos.

**Efecto de *Bacillus thuringiensis* sobre el desarrollo de lesiones de roya.** En este ensayo fue observado el efecto detrimental de la aplicación de la bacteria sobre el desarrollo de lesiones de roya en discos de hojas individuales (Tabla 2). El mejor tratamiento resultó ser la aplicación de la bacteria, ocho días antes de la inoculación de la roya en su mayor concentración. La inhibición del desarrollo de las lesiones de roya pudo

TABLA 1. Efecto inhibitor de aislamientos de *Bacillus thuringiensis* sobre la germinación de urediniosporas de roya del cafeto.

AISLAMIENTO	UREDINIOSPORAS NO GERMINADAS	UREDINIOSPORAS GERMINADAS	% INHIBICION
CENICAFE 104	67	2	97,18
CENICAFE 105	70	20	77,77
CENICAFE 106	89	6	93,68
CENICAFE 107	68	16	80,95
CENICAFE 108	66	19	77,64
CENICAFE 109	72	16	81,81
M-ONE	54	6	90,00
Liofilizado-CIMIC	53	6	89,83
<i>B. t. kurstaki</i>	61	13	82,43
H <sub>2</sub> O destilada	42	86	32,81

\* Promedio de 5 campos, 5 lecturas por campo en total.

TABLA 2. Efecto de *Bacillus thuringiensis* sobre la roya del cafeto *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. en discos de hojas de *Coffea arabica* var. Caturra.

TRATAMIENTO	TOTAL DISCOS	DISCOS DE HOJAS CON ROYA	% INFECCION/ROYA
Tratamiento inductor <sup>1</sup> <i>B.t.</i> 3x10 <sup>8</sup> ufc/ml	30	19	63,0
Tratamiento inductor <sup>1</sup> <i>B.t.</i> ½ 3x10 <sup>8</sup> ufc/ml	29	15	52,0
Tratamiento inductor <sup>1</sup> <i>B.t.</i> ¼ 3x10 <sup>8</sup> ufc/ml	30	19	63,0
Tratamiento inductor <sup>2</sup> <i>B.t.</i> 3x10 <sup>8</sup> ufc/ml	29	11	38,0
H <sub>2</sub> O destilada	30	26	87,0

1. Intervalo de aplicación- 4 días.

2. Intervalo de aplicación- 8 días.

deberse a la acción combinada de varios efectos por parte de la suspensión bacteriana tales como: competencia por espacio, interferencia física en la adhesión y penetración de las urediniosporas e inhibición de la germinación de las mismas.

No fueron observados síntomas de resistencia en los discos de hojas que fueron tratados previamente con la bacteria; el desarrollo de las lesiones fue normal para los discos de hojas testigo y los tratados. Todas las lesiones producidas en los discos, llegaron hasta la etapa de esporulación o un índice de 7 en la escala de Leguizamón. En los tratados con la bacteria se evidenció retardo en la aparición del período de latencia, en los pocos discos en los cuales fue registrada la infección.

**Bioensayos en umbráculo.** Los resultados que se presentan en cada caso, corresponden al promedio de la calificación de cada tratamiento, de acuerdo a la escala de Eskes, de 0 a 9, para medir la severidad de la enfermedad en hojas (7).

**1. Tiempo de permanencia del efecto inductor.** El tiempo de permanencia del efecto inductor en la planta fue al menos de 16 días después de la aplicación de la suspensión bacteriana y tuvo un máximo de acción a los 8 días (Tabla 3). Este resultado coincide con lo obtenido anteriormente por Roveratti (25), quién encontró que el efecto inductor de la bacteria en la planta permanece por lo menos durante 36 días.

Este resultado sugiere que la aplicación de la bacteria en el campo para el control de la enfermedad podría ser óptima realizando aplicaciones con intervalos de unos 35 días. Si a esto se añaden otros efectos de la bacteria sobre la roya como son la inhibición de la germinación de las urediniosporas, el decremento en la producción de urediniosporas en las lesiones y el bajo poder germinativo de

**TABLA 3. Tiempo de permanencia del efecto inductor de *Bacillus thuringiensis* en hojas de *Coffea arabica*, variedad Caturra.**

Tratamiento	Índice infección			
	N	$\bar{x}$ /hoja*	$\sigma^2$	C.V
4 días	30	1,683 <sup>ab</sup>	1,2484	31,5293
8 días	30	1,420 <sup>a</sup>	1,2994	68,4890
16 días	30	2,633 <sup>b</sup>	2,0185	53,4864
H <sub>2</sub> O destilada	30	6,783 <sup>c</sup>	1,3829	21,1681

Tratamientos con la misma letra no difieren significativamente  $p = 0,05$ .

\* Escala de calificación de Eskes (0 a 9) 0= Sin infección. 9= 76% del área foliar con lesiones.

las urediniosporas producidas, el efecto en el tiempo sobre el desarrollo de la enfermedad puede ser aún más drástico.

En este ensayo no fue observado un efecto sistémico en la planta con los tratamientos de la bacteria, a diferencia de lo observado por Roveratti, *et. al.* (25). Esto podría deberse a que en este trabajo fueron usadas suspensiones de la bacteria de menor concentración que las usadas por estos investigadores en Brasil, así como diferentes aislamientos de la bacteria y diferente variedad de café. Esto indica que puede haber una correlación directa entre la variedad de café, la concentración y naturaleza del microorganismo inductor y las condiciones ambientales (temperatura y humedad) presentes, en el grado de respuesta de la planta a inoculaciones con microorganismos inductores.

**2. Efecto de la aplicación de la bacteria incrementada en pulpa de café, sobre las lesiones de roya.** En este ensayo fue observada una reducción drástica en el porcentaje de infección de la enfermedad en las plantas tratadas con la bacteria sembrada en pulpa de café o suspendida en agua destilada estéril (Tabla 4). La pulpa de café aplicada al envés



**TABLA 4. Efecto de *Bacillus thuringiensis* en extracto de pulpa de café sobre el desarrollo de las lesiones de roya del café.**

Tratamiento	N	Grado infección		C.V
		$\bar{x}$ /hoja*	$\delta^2$	
B.t.k. (Pulpa)	30	1,400 <sup>a1/</sup>	1,2484	89,1748
B.t.k. (H <sub>2</sub> O dest)	30	1,967 <sup>a</sup>	1,2994	66,0725
Extracto de pulpa	30	3,133 <sup>b</sup>	2,0185	93,1658
H <sub>2</sub> O destilada	30	6,783 <sup>c</sup>	1,3829	21,1681

<sup>1/</sup> Promedios seguidos con la misma letra no difieren significativamente,  $\alpha = 0,05$ .

\* Escala de calificación de Eskes de 0 a 9 donde 0= Sin infección y 9= 76% del área foliar con lesiones.

de hojas de café, tiene por sí sola un efecto sobre el desarrollo de lesiones de roya. Esto puede deberse a varios factores: el pH ácido de la suspensión que puede inhibir la germinación de las urediniosporas de roya, que son muy sensibles a esta condición, las fracciones sólidas de la suspensión que quedan sobre la superficie de la hoja y pueden interferir en la adhesión y penetración de las urediniosporas en la hoja ó algún (os) metabolito(s) de la suspensión que puede(n) ser o inhibitorio(s) de la germinación de las urediniosporas ó inductor(es) de algún mecanismo de resistencia en la planta.

**3. Efecto de la concentración de la bacteria sobre el desarrollo de las lesiones de roya del café.** En este ensayo fue observado como la aplicación de la bacteria incluso en concentraciones tan bajas como  $\frac{1}{4}$  de la concentración normal aplicada ( $3 \times 10^8$  ufc/ml), que es una concentración con la cual se han obtenido buenos porcentajes de control en plántulas en invernadero, sigue presentando un buen control de la enfermedad (Tabla 5). Esto tendría un efecto directo en la reducción de costos al realizar aplicaciones de la bacteria, si se comprueba la misma tendencia en plantas en campo.

**TABLA 5. Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de *Bacillus thuringiensis* sobre el desarrollo de las lesiones de roya del café.**

Tratamiento	N	Grado infección		C.V
		$\bar{x}$ /hoja*	$\delta^2$	
$3 \times 10^8$ Btk	30	1,420 <sup>b1/</sup>	0,9184	15,768
$\frac{1}{2} 3 \times 10^8$	30	2,300 <sup>b</sup>	0,9660	29,078
$\frac{1}{4} 3 \times 10^8$	30	2,313 <sup>b</sup>	1,1737	33,672
Dipel	30	0,100 <sup>a</sup>	0,0324	2,897
H <sub>2</sub> O destilada	30	6,783 <sup>c</sup>	1,7159	11,785

<sup>1/</sup> Tratamientos con la misma letra no difieren significativamente,  $\alpha = 0,05$ .

\* Escala de calificación de Eskes (0 a 9) 0= Sin infección. 9= 76% del área foliar con lesiones.

La aplicación del producto DIPEL a una concentración de 10g/l, presentó un control muy eficiente de la enfermedad en plántulas en el invernadero. Este producto puede ser una alternativa para el control de la enfermedad en campo, y en Brasil ya se han obtenido algunos resultados promisorios que pueden llevar incluso al uso de formulaciones de la bacteria por parte de los caficultores (3). También hay que añadir que en la actualidad se encuentran en experimentación por parte de diferentes casas comerciales, productos formulados con cepas más potentes de la bacteria o con bacterias recombinantes que pueden incluso expresar diversos tipos de ó-endotoxinas, los cuales podrían dar un control mayor de la enfermedad (8).

**4. Efecto de la aplicación simultánea de Btk y *V. lecanii* sobre las lesiones de roya del café.** Fue observada una reducción en el grado de infección de la roya en las plántulas tratadas pero en un menor grado que el obtenido en los tres ensayos anteriores en umbráculo (Tabla 6). Esto pudo deberse a que



**TABLA 6.** Efecto de la aplicación simultánea de *Bacillus thuringiensis* y *Verticillium lecanii* sobre el desarrollo de las lesiones de roya en plántulas de *Coffea arabica* var Caturra.

Tratamiento	N	Grado infección		C.V
		$\bar{x}$ /hoja*	$\sigma^2$	
Btk	30	5,567 <sup>1/1</sup>	0,9184	40,412
<i>V. lecanii</i>	30	5,567*	0,9660	73,739
<i>B.t.k.</i> + <i>V.l.</i>	30	5,533*	1,1737	61,261
Testigo	30	7,000 <sup>b</sup>	1,7159	11,785

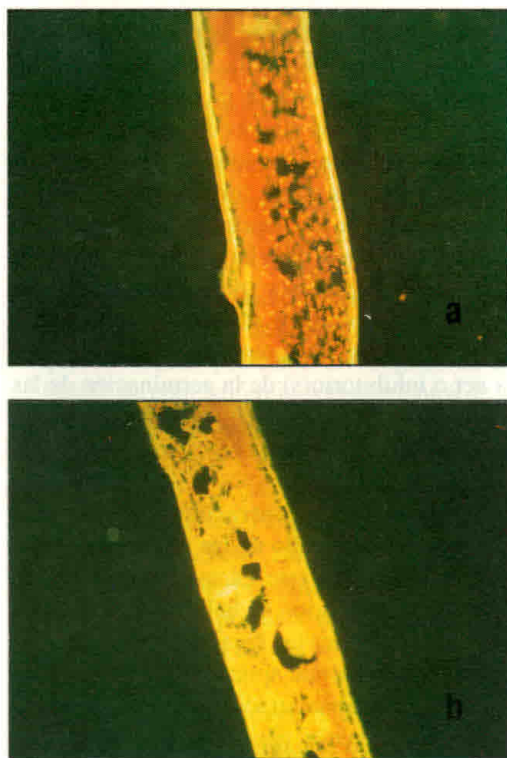
<sup>1/1</sup> Tratamientos con la misma letra no difieren significativamente,  $\alpha = 0,05$ .

\* Escala de calificación de Eskes (0 a 9) 0= Sin infección. 9= 76% del área foliar con lesiones.

en este ensayo la temperatura a la cual fueron mantenidas las plantas de café en el cuarto húmedo durante las 48 horas posteriores a la inoculación de los dos microorganismos, fue mucho menor que en las condiciones de umbráculo a donde fueron llevadas las plantas inmediatamente después de realizados los tratamientos en los ensayos anteriores. Bell (4) indica la existencia de una relación directa entre la temperatura y el grado de resistencia observado en las plantas inducidas.

Los valores obtenidos para los tres tratamientos en donde fueron aplicados los microorganismos en forma individual o en forma conjunta fueron muy similares, lo cual hace presumir en principio que no se registró acción sinérgica entre los dos, sino que por el contrario, fue observado un efecto competitivo al aplicarlos simultáneamente. Resulta recomendable por tanto realizar aplicación de los dos microorganismos en tiempos diferentes dentro de un manejo integrado de la enfermedad, asperjando *B. thuringiensis* en forma preventiva y aplicando *V. lecanii* en forma curativa, en donde ha mostrado tener un efecto mayor de control sobre la enfermedad (18).

**Seguimiento histológico e histoquímico.** Las células del mesófilo de hojas de café tratadas con la bacteria sintetizan compuestos autofluorescentes y desarrollan una coloración amarilla muy intensa al microscopio de fluorescencia, coloración que no fue detectada en hojas de plantas no tratadas (Figura 1). Estos compuestos pueden ser del tipo fenólico, comúnmente implicados en reacciones de resistencia de las plantas superiores al ataque de patógenos (2, 14). Aunque en café existen algunas dudas sobre la naturaleza de los compuestos implicados en las reacciones de resistencia (21), algunos trabajos han mostrado la síntesis de



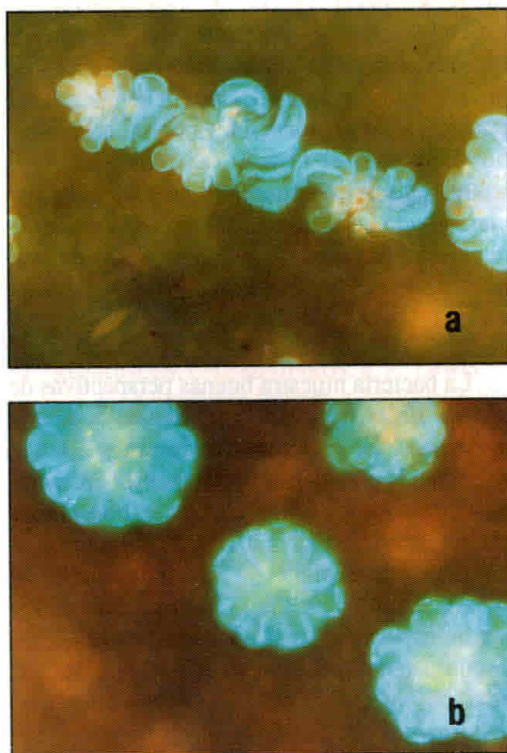
**Figura 1. a.** Corte transversal de hojas de *Coffea arabica*, tratadas con una suspensión de *Bacillus thuringiensis*. Obsérvese la aparición de fluorescencia de color amarillo por la síntesis de compuestos autofluorescentes en células del mesófilo. **b.** Hojas de *Coffea arabica* no tratadas. Obsérvese la aparición normal de fluorescencia amarilla en tejido epidérmico pero no en células del mesófilo.

compuestos como calosa y polifenoles en respuesta a la inoculación de microorganismos inductores de resistencia (3); también han sido observados en la síntesis de polifenoles en plantas de café resistentes a *Ceratocystis fimbriata* (Ell. Halst.) Hunt. (31).

Se llevaron a cabo algunos experimentos para tratar de determinar la naturaleza específica de los compuestos implicados en la resistencia como el ensayo de Wiesner para la detección de guaiacil-ligninas (19) y marcación con cloruro férrico para detección de polifenoles (9) pero, ninguno de estos ensayos resultó positivo. En algunos estudios de resistencia inducida en plantas de café han identificado la síntesis de calosa en hojas tratadas (3). Esto puede indicar que los mecanismos de resistencia incompleta que desarrollan las plantas de café a la roya pueden diferir de algún modo con los mecanismos de resistencia vertical, ya que ha sido posible identificar la síntesis de lignina como una reacción de resistencia de plantas de café var. Colombia al ser inoculadas con urediniosporas de roya, en donde fue observada una reacción incompatible.

Para interpretar estos resultados, es necesario aclarar que existen diferentes tipos de compuestos similares a ligninas, constitutivos en la planta o inducidos en respuesta a la presencia de microorganismos patógenos y no patógenos, y que presentan distinta estructura molecular, por tanto, son detectados mediante diferentes ensayos histoquímicos (19).

Utilizando la tinción de las lesiones con dietanol fue posible observar urediniosoros completos en las hojas no tratadas, en tanto que los urediniosoros producidos en las hojas tratadas fueron en todos los casos incompletos y en muchos casos, el proceso fue inhibido totalmente sin producción de urediniosporas (Figura 2). Esto puede indicar que el desarrollo del hongo es inhibido en las células del mesófilo en donde ocurre la síntesis de compuestos del tipo



**Figura 2.** a. Lesiones en hojas de *Coffea arabica* tratadas con una suspensión de *Bacillus thuringiensis*. Obsérvese la producción de urediniosoros incompletos de *Hemileia vastatrix*. b. Lesiones en hojas de *Coffea arabica* no tratadas. Obsérvese la producción de urediniosoros completos de *Hemileia vastatrix*.

fenólico, como una respuesta inducida por la inoculación de la bacteria y por tanto el proceso de esporulación no ocurre. Algunos estudios han sido realizados para determinar el punto exacto del proceso infectivo en el cual se representa la inhibición en estudios de resistencia inducida, que sugieren en algunos casos, la inhibición de la penetración a células del mesófilo y en otros casos la inhibición en la producción de células madres de haustorios en el tejido infectado (4). En los cortes realizados fue posible observar la disminución en la producción de células madres de haustorios en las hojas tratadas, aunque fue difícil establecer cuantitativamente el grado de inhibición.



Experimentos preliminares han mostrado además que las urediniosporas producidas en hojas tratadas con la bacteria, tienen un menor porcentaje de germinación y por tanto, son menos infectivas al realizar aplicación de estas sobre hojas de café susceptibles. Esto indica un claro efecto en el tiempo sobre el desarrollo de la enfermedad incluso en generaciones de roya posteriores al tiempo de inoculación de la bacteria.

La bacteria muestra buenas perspectivas de control de la roya del café, debido a que se presentan varios efectos al realizar su aplicación sobre hojas de café susceptibles a la enfermedad. Dentro de los diferentes efectos observados están; inducción de síntesis de sustancias de resistencia en la planta de café, baja adhesión a la hoja e inhibición de la germinación de las urediniosporas de roya, posiblemente un efecto de competencia por espacio en la superficie de la hoja de café, disminución en el número de urediniosporas que se producen en los urediniosoros y en los porcentajes de germinación, por lo cual su efecto podría ser observado durante varias epidemias de la enfermedad. Estos resultados deben ser confirmados con experimentos en campo.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Dra. Patricia Vélez y los Señores Carlos Arturo González y Arcesio González por la colaboración recibida durante la realización del experimento.

A la Dra. Esther Cecilia Montoya por su asesoría estadística.

Al Dr. Harry Evans del CIBC de Inglaterra por la donación de un aislamiento de *B. t. kurstaki*. y al Dr. Alvaro Gaitan por la revisión crítica del manuscrito.

### LITERATURA CITADA

1. ARONSON, A. I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiological Reviews (Estados Unidos) 50(1):1-24. 1986.
2. BAKER, C. J.; O'NEILL, N. R.; TOMERLIN, J. R. Accumulation of phenolic compounds in incompatible clone/race interactions of *Medicago sativa* and *Colletotrichum trifolii*. Physiological and Molecular Plant Pathology (Inglaterra) 35(3):231-241. 1989.
3. BECKER-R., S.; MORAES, W. B. C.; QUIJANO-RICO, M. La roya del café, Conocimiento y control. Eschoborn (Alemania), Deutsche Gesellschaft Für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH, 1991. 281p.
4. BELL, A. A. Biochemical mechanisms of disease resistance. Annual Review of Plant Physiology (Inglaterra) 32:21-81. 1981.
5. CADENA, G. C.; NICHOLSON, R. L. Papilla formation and associated peroxidase activity: a non-specific response to attempted fungal penetration of maize. Physiological and Molecular Plant Pathology (Inglaterra) 31(1):51-67. 1987.
6. DEVERALL, B. J. Introduction. In: BAILEY, J. A.; MANSFIELD, J. W. Phytoalexins. Londres (Inglaterra), Blackie & Son, 1982. pp. 1-16.
7. ESKES, A. B. Assessment methods for resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.). In: ESKES, A. B. Incomplete resistance to coffee leaf rust (*H. vastatrix*). Wageningen (Holanda), Institute of Plant Breeding of the Agricultural University. 1983. p. 4-14. (Doctoral Thesis).
8. FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. Bio/technology (Estados Unidos) 10(3):271-275. 1992.
9. GAHAN, B. P. Plant Histochemistry and Citochemistry: an introduction. Londres (Inglaterra), Academic Press, 1984. 301 p.
10. GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F.; MORAES, W. B. C. Induced protection of coffee plants to *Hemileia vastatrix*. I. Partial purification of the extracellular inducer from heat-killed urediniospores of the pathogen. Fitopatologia Brasileira (Brasil) 12 (4): 377 - 385. 1987.

11. HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. *Physiological Plant Pathology* (Inglaterra) 20(1):61-71. 1982.
12. HOLLIDAY, M. J.; KEEN, N. T.; LONG, M. Cell death patterns and accumulation of fluorescent material in the hypersensitive response of soybean leaves to *Pseudomonas syringae* p. v. *glycinea*. *Physiological Plant Pathology* (Inglaterra) 18(3):279-287. 1981.
13. KIRÁLY, Z. Defenses triggered by the invader : hypersensitivity. In: HORSFALL, A.; COWLING, G. Plant disease: an advanced treatise. Londres (Inglaterra), Academic Press, 1980. V. 5. p. 201-219.
14. KOVATS, K.; BINDER, A.; HOHL, H. R. Cytology of induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Planta* (Alemania) 183(4):484-490. 1991.
15. KUCK, K. H.; TIBURZI, R.; HANSSLER, G.; REISSNER, H. J. Visualization of rust haustoria in wheat leaves by using fluorochromes. *Physiological Plant Pathology* (Estados Unidos) 19:439-441. 1981.
16. KUSHALAPA, A.; ESKES, A. *Coffea* Rust: Epidemiology, resistance, and management. Boca Raton (Estados Unidos), 1989, 345p.
17. LEGUIZAMON, C. J. Contribution à la connaissance de la résistance incomplète du caféier arábica (*Coffea arabica* L.) à la rouille orangée (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.). Montpellier (Francia). Institut de recherches du Café et du Cacao-IRCC, 1985. 123 p. (Tesis du grade de Docteur Ingénieur en Agronomie).
18. LEGUIZAMÓN, C. J.; VELEZA, P. E.; GONZALES S., A. Efectos de extractos metabólicos de *Verticillium lecanii* sobre *Hemileia vastatrix*. *Cenicafé* (Colombia) 40(2):31-39. 1989.
19. LEWIS, N. G.; YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Pathology* (Estados Unidos) 41:455-496. 1990.
20. MAYAMA, S.; SHISHIYAMA, J. Localized accumulation of fluorescent and u.v.-absorbing compounds at penetration sites in barley leaves infected with *Erysiphe graminis hordei*. *Physiological Plant Pathology* (Inglaterra) 13:347-354. 1978.
21. MAZZAFERA, P.; MAGALHAES, A. C. N. Resistencia induzida no complexo *Coffea arabica* L.-*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.: Fenóis e enzimas. *Turrialba* (Costa Rica) 39(3): 334-345. 1989.
22. MORAES, W. B. C. Prospects of the utilization of alternative control methods of tropical rusts in Brazil. *PLITS* (Brasil) 8 (2): 235-252. 1990.
23. OUCHI, S. Induction of resistance or susceptibility. *Annual Review of Phytopathology* (Estados Unidos) 21: 289-315. 1983.
24. RODRIGUES, C. J.; MEDEIROS, E. F.; LEWIS, B. G. Relationship between a phytoalexin-like response in coffee leaves (*Coffea arabica* L.) and compatibility with *Hemileia vastatrix*. *Physiological Plant Pathology* (Estados Unidos) 6: 35-41. 1975.
25. ROVERATTI, D. S.; TEIXEIRA R., A. R.; MORAES C., W. B. *Bacillus thuringiensis* - A new perspective for an induced protection to coffee leaf rust. *Journal of Phytopathology* (Alemania) 126(2): 149-159. 1989.
26. SEQUEIRA, L. Mechanisms of induced resistance in plants. *Annual Review of Microbiology* (Estados Unidos) 37: 51-79. 1983.
27. SILVÁ, R. R. DA; MARTINS, C. G. Germinação e poder infectivo dos uredosporos de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. mantidos sobre diferentes produtos vegetais e o suscetível. *Experientiae* (Brasil) 17(10): 241-264. 1974.
28. SILVEIRA, H. L.; RODRIGUES JR, C. J. Bursting of rust uredospores caused by *Verticillium hemileiae* Bour. culture filtrates. *Agronomia Lusitana* (Portugal) 33 (1-4): 391 - 396. 1971.
29. TIBURZI, R.; MARTINS, E. M. F.; MORAES, W. B. C. Visualization of *Hemileia vastatrix* structures in coffee leaves by fluorescent microscopy. *Fitopatologia Brasileira* (Brasil) 8(5): 461-466. 1983.
30. VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERKWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* (Estados Unidos) 18: 259-288. 1980.
31. ZULUAGA V., J.; VALENCIA G., A.; GONZALEZ, J. Contribución al estudio de la naturaleza de la resistencia del café a *Ceratocystis fimbriata* (Ell. Halst.) Hunt. *Cenicafé* (Colombia) 22(2): 43-70. 1971.