

# Distribución y frecuencia de la microflora asociada a uredoesporas de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br.<sup>1</sup>

Altagracia M. Vizcaíno<sup>2</sup>, Rocío del P. Rodríguez<sup>3</sup>  
y Carlos Betancourt<sup>4</sup>

## RESUMEN

Para determinar la microflora asociada a las uredoesporas de *Hemileia vastatrix*, se tomaron muestras en cafetales en los municipios de Mayagüez, San Sebastián y Las Marías. Las muestras se tomaron en las cuatro estaciones del año y se aisló e identificó la microflora asociada a las uredoesporas de la roya del café. Se aislaron seis especies de hongos y cuatro géneros de bacterias. Los hongos encontrados fueron *Verticillium lecanii*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium* spp. Los géneros de bacterias fueron *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Micrococcus* y *Bacillus*. Indistintamente de la época en la cual se tomaron las muestras, todos los microorganismos se encontraron asociados a las uredoesporas aunque con frecuencia variable. *Verticillium lecanii*, *C. cladosporioides* y *Pseudomonas* spp. fueron los microorganismos que se aislaron con mayor frecuencia.

## ABSTRACT

Distribution and frequency of the microflora associated with uredospores of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br.

For the study of the microflora associated with uredospores of *Hemileia vastatrix*, coffee plantations in the areas of Mayagüez, San Sebastián and Las Marías were sampled. Samples were taken during the four seasons of the year, and the microflora associated with uredospores of the coffee rust was isolated and identified. Six fungal species and four genera of bacteria were isolated. The fungal species were *Verticillium lecanii*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* and *Penicillium* spp. The bacteria belong to the genera *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Micrococcus* and *Bacillus*. All microorganisms were consistently found in association with the uredospores throughout the year, but their frequency varied. *Verticillium lecanii*, *C. cladosporioides* and *Pseudomonas* spp. were the most frequently isolated.

Key words: *Hemileia vastatrix*, uredospores, coffee rust

## INTRODUCCION

El crecimiento de la industria del café depende de la utilización de los avances tecnológicos para garantizar una producción estable. Entre éstos la protección del cultivo para reducir pérdidas en el rendimiento,

<sup>1</sup>Manuscrito sometido a la Junta Editorial el 14 de junio de 1995.

<sup>2</sup>Estudiante graduada, Departamento Protección de Cultivos.

<sup>3</sup>Investigadora, Departamento Protección de Cultivos.

<sup>4</sup>Catedrático, Departamento de Biología.

debido a las enfermedades y plagas, es de vital importancia. Son varios los patógenos que atacan los cafetos en germinadores, viveros y en plantaciones establecidas. La roya, causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, es una de las enfermedades más importantes del cafeto en este hemisferio y se reportó en los cafetales de Puerto Rico por primera vez en febrero de 1989 (Anónimo, 1989).

Los primeros informes sobre la roya del cafeto son del este de Africa en 1861 (Schieber, 1972). A través de los años la enfermedad se diseminó por el continente africano, el asiático y en el 1970 se reportó en Brazil (Thurston, 1984). Large (1940), considera a la roya del cafeto como una de las siete enfermedades principales del último siglo. En ausencia de prácticas de control, esta enfermedad puede ocasionar un 30% de pérdidas (Monaco, 1977) y con los años la destrucción de la empresa (Thurston, 1984).

Tradicionalmente el control de la roya ha consistido mayormente en la aplicación de fungicidas, pero en los últimos años y en respuesta a la concientización de la protección del ambiente, se han explorado otras estrategias como resistencia de variedades y el control biológico. Esta última estrategia de control de organismos patógenos se ha estudiado y utilizado más en el ambiente del suelo que en el foliar ya que, entre otras razones, en el suelo el ambiente es menos variable (Blakeman y Fokkema, 1982). Sin embargo, en el follaje también se encuentran muchos enemigos naturales y existe un alto potencial del uso de esta flora para el biocontrol de los patógenos foliares. Las condiciones ambientales físicas y biológicas influyen la microflora presente en el filoplano por lo que ésta puede variar entre localidades, estaciones del año y plantas hospederas. Generalmente, para obtener posibles agentes biocontroladores se identifican áreas donde la enfermedad no está presente o donde su intensidad es baja. Por otro lado, Pusey (1990) sugiere que la búsqueda de organismos biocontroladores debe iniciarse con la flora residente ya que es importante que el organismo potencial pueda sobrevivir exitosamente en el filoplano. Este trabajo se realizó con el propósito de identificar la microflora asociada a las uredoesporas de *H. vastatrix*, un paso inicial para futuros trabajos en el control biológico de este patógeno.

#### MATERIALES Y METODOS

Durante el año 1990 se seleccionaron plantaciones de café en tres localidades del área centro oeste de Puerto Rico; Mayagüez (50 msnm), San Sebastián (186.6 msnm) y Las Marías (280 msnm). En Mayagüez los cafetos estaban sembrados al sol, con poca vegetación en el área; en San Sebastián se encontraban bajo condiciones similares pero con al-

gunos árboles en las áreas aledañas y en Las Marías estaban intercalados con cítricos, guineos y plátanos, con una arboleda alrededor. Los cafetos tenían una distancia de siembra de  $1.5 \times 1.2$  metros. En Mayagüez y Las Marías se tomaron muestras en la variedad Caturra y en San Sebastián en la variedad Borbón.

En cada una de las localidades las muestras se tomaron a mediados de la primavera (marzo - mayo), del verano (junio - agosto), del otoño (septiembre - noviembre) y del invierno (diciembre - febrero). Se seleccionaron 30 hojas con lesiones de roya aproximadamente de 1 cm o menos de diámetro. Las uredoesporas se recolectaron pasando una espátula esterilizada por la superficie de cada lesión. Se prepararon diluciones a  $10^1$ ,  $10^2$  y  $10^3$  en agua esterilizada y de cada dilución se inocularon cinco platos de Petri conteniendo agar-agua (AA), agar-agua-ácido (AAac) y agar-nutriente (AN). Las inoculaciones se realizaron distribuyendo una alícuota de 0.5 ml de cada dilución en la superficie del medio. La temperatura de incubación fue de 21-23° C y diariamente se observaron bajo un estereoscopio para verificar el crecimiento de los microorganismos. Se utilizaron diluciones que permitieran seleccionar colonias puras y se transfirieron, de cada replicación, todas las colonias de hongos a APD y las de bacterias a ALD.

Los hongos aislados se identificaron utilizando la técnica de cámara húmeda y claves taxonómicas (Barnett y Hunter, 1987; Gerlach y Nirenberg, 1982). La identificación de éstos fue corroborada por el Instituto Internacional de Micología de Inglaterra. Los géneros de bacterias se identificaron utilizando los manuales de Schaad (1988) y Bergey (1974). La frecuencia de los microorganismos se determinó a base del porcentaje del total de las colonias aisladas.

Los datos de temperatura y precipitación se tomaron 15 y 30 días antes de tomar las muestras de hojas. Los datos de temperatura para Mayagüez se obtuvieron de la estación meteorológica del "Tropical Agriculture Research Station" (TARS), los de San Sebastián se tomaron con un higrotermógrafo localizado en el área del estudio y los de Las Marías se estimaron utilizando el método descrito por Goyal et al. (1988). La precipitación pluvial mensual se obtuvo de los datos Climatológicos de Puerto Rico e Islas Vírgenes (National Weather Service) para el rango de altura de 50 a 333.3 msnm. La temperatura entre localidades se comparó mediante la prueba de T al nivel de  $P \leq 0.01$  (Steel y Torrie, 1980).

## RESULTADOS

De los microorganismos aislados el 60% fueron hongos y el 40% bacterias indicando que existe una mayor frecuencia de flora fungosa en

asociación a las uredoesporas. La frecuencia de hongos aislados varió con la localidad, Mayagüez (31%), San Sebastián (25%) y Las Marías (44%). De igual forma sucedió con las bacterias donde el 47% se aisló de Mayagüez, el 31% de San Sebastián y el 21% de Las Marías.

Las especies de hongos identificados fueron; *Verticillium lecanii*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. oxysporum*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* y *Penicillium* spp. Con excepción de *V. lecanii*, todos los hongos mostraron crecimiento rápido y buena esporulación a los tres días de incubación en APD. El crecimiento de *V. lecanii* al final de cinco días de incubación era lento y sólo después de los 15 días se observó mayor crecimiento miceliar y abundante esporulación.

*Verticillium lecanii* y *C. cladosporioides* fueron los hongos que se aislaron con mayor frecuencia de las uredoesporas mientras que *F. oxysporum* fue el menos frecuente y *Penicillium* sp., *C. oxysporum* y *A. niger* tuvieron una frecuencia intermedia (Figura 1A). Las especies de mayor distribución fueron *V. lecanii*, *Penicillium* sp., *A. niger* y *F. oxysporum*, las cuales se encontraron asociadas a las uredoesporas en lesiones de roya en las muestras de las tres localidades. *Cladosporium cladosporioides* se aisló de las muestras de Mayagüez y de San Sebastián, mientras que *C. oxysporum* fue el de menor distribución aislándose solamente de las muestras de Las Marías (Figura 1B).

En todas las estaciones del año, la mayoría de las especies fungosas se encontraron asociadas a las uredoesporas de *H. vastatrix* (Figura 1C). *Verticillium lecanii*, el hongo que se aisló con mayor frecuencia en todas las estaciones, fue particularmente más abundante durante el invierno. Al examinar la frecuencia de las otras especies, encontramos que durante el verano la frecuencia de *C. cladosporioides*, *C. oxysporum* y *A. niger* aumentó en comparación a lo que se obtuvo en primavera. Un incremento similar se observó en otoño para *F. oxysporum*, aunque también en esta época se redujo el porcentaje de colonias de la mayoría de la flora fungosa.

Los géneros de bacterias encontrados en asociación con las uredoesporas de *H. vastatrix* fueron *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Citrobacter* y *Micrococcus*. Del total de colonias bacterianas aisladas, el 69% correspondieron al género *Pseudomonas*, el 61% a *Citrobacter*, el 11% a *Bacillus* y el 4% a *Micrococcus* (Figura 2A). *Pseudomonas* fue el género que se aisló con mayor frecuencia en las tres localidades mientras que la frecuencia de *Bacillus*, *Micrococcus* y *Citrobacter* fluctuó de acuerdo a la localidad (Figura 2B).

Durante el año todos los géneros se encontraron asociados a las uredoesporas de *H. vastatrix* (Figura 2C). *Pseudomonas* prevaleció durante todo el año y *Bacillus* fue el que se aisló con menor frecuencia.

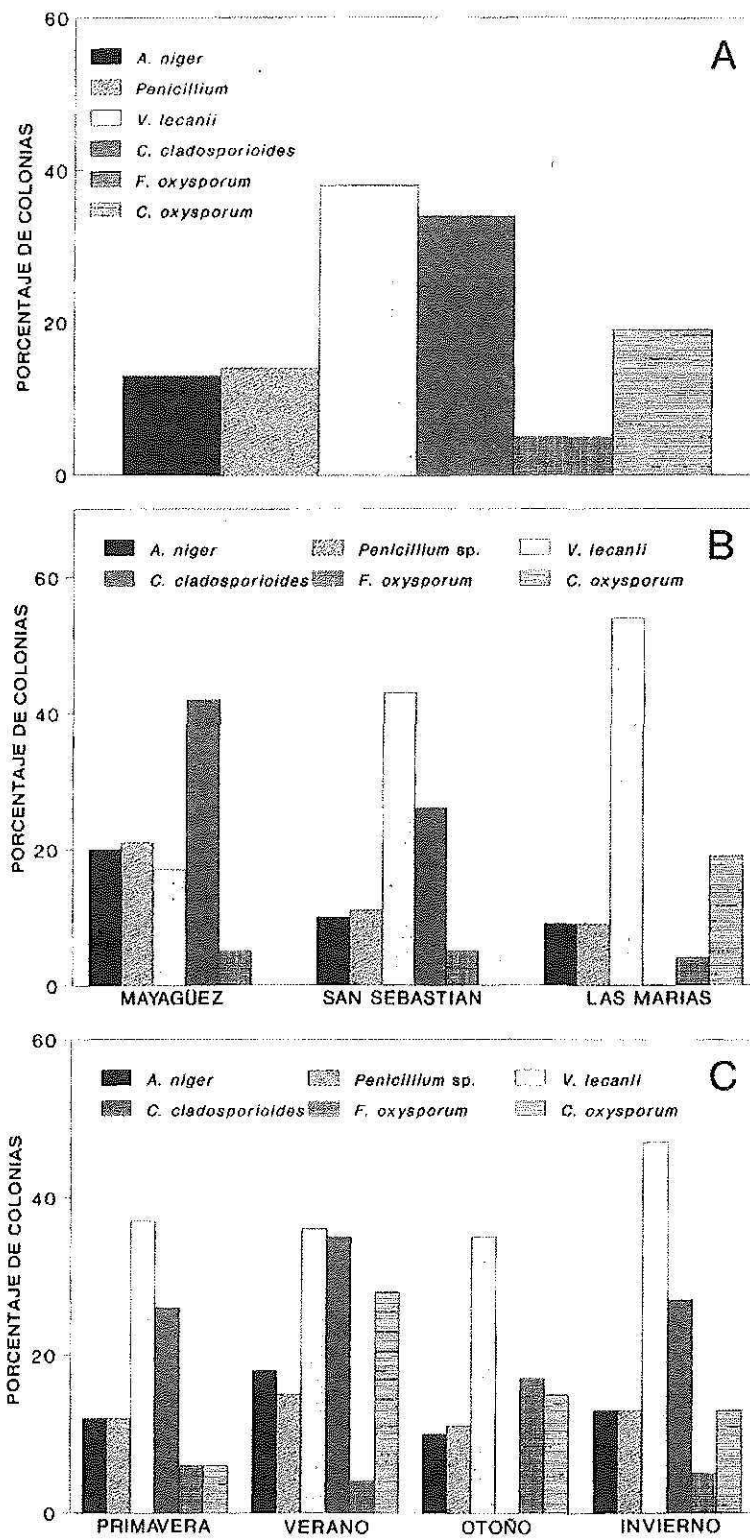


FIGURA 1. Frecuencia y distribución general de la microflora fungosa asociada a las uredoesporas de *Hemileia vastatrix* de acuerdo al porcentaje total (A), por localidad (B) y por estación (C).

Durante el verano hubo una reducción en la población aislada de *Pseudomonas* y se observó un aumento en la de los otros géneros. La población de *Bacillus* aumentó notablemente en las muestras de San Sebastián. En el otoño, con excepción de *Pseudomonas*, hubo una reducción en la frecuencia de las colonias de la mayoría de las bacterias aisladas. Para el invierno la población de *Pseudomonas* se redujo mientras que la de los otros géneros aumentó.

Los datos climatológicos reflejaron una distribución bimodal de la lluvia durante el año 1990 con picos de mayor precipitación en junio y octubre y una disminución considerable entre los meses de enero a mayo (Figura 3). Aunque las lluvias de primavera se retrasaron durante ese año, en términos generales el patrón fue similar a lo esperado, donde la época de sequía corresponde a los meses entre diciembre y abril y la lluviosa entre agosto y noviembre. Mayagüez fue la localidad con la temperatura más alta (20-32° C), mientras que en San Sebastián se registró la más baja (18-27° C) y en Las Marías fue intermedia (19-29° C). Se detectaron diferencias significativas entre localidades en la temperatura máxima obtenida en el verano, otoño e invierno; en la temperatura mínima del verano y en la temperatura promedio del verano y el otoño (Cuadro 1).

#### DISCUSION

Las fluctuaciones encontradas en la frecuencia y distribución de la microflora asociada a las uredoesporas de *H. vastatrix* sugieren la influencia de varios factores relacionados con el medioambiente, el cual afecta el desarrollo de los microorganismos en la superficie foliar. La floresta y las condiciones climáticas relacionadas con las localidades y las épocas del año son posibles factores incidentes en la dinámica poblacional de estos microorganismos.

Al examinar el efecto de localidades encontramos que fue en Mayagüez donde se obtuvo la mayor población de *C. cladosporioides*, *A. niger* y *Penicillium* spp. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Betancourt et al. (1980) quienes reportan a *C. cladosporioides*, *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *A. niger* y *Verticillium* spp. como los hongos más comunes en el área de Mayagüez, siendo *C. cladosporioides* el más frecuente de todos. La presencia de estos hongos en el aire indica que son "air-borne" por tanto las hojas del cafeto están constantemente expuestas a la inoculación. De mayor relevancia es el hecho de que esta microflora está establecida y es residente en el área, factor de gran importancia para la selección de organismos biocontroladores.

En Las Marías y San Sebastián las siembras de cafetos estaban asociadas a cítricos y plátanos con una arboleda circundante, condiciones

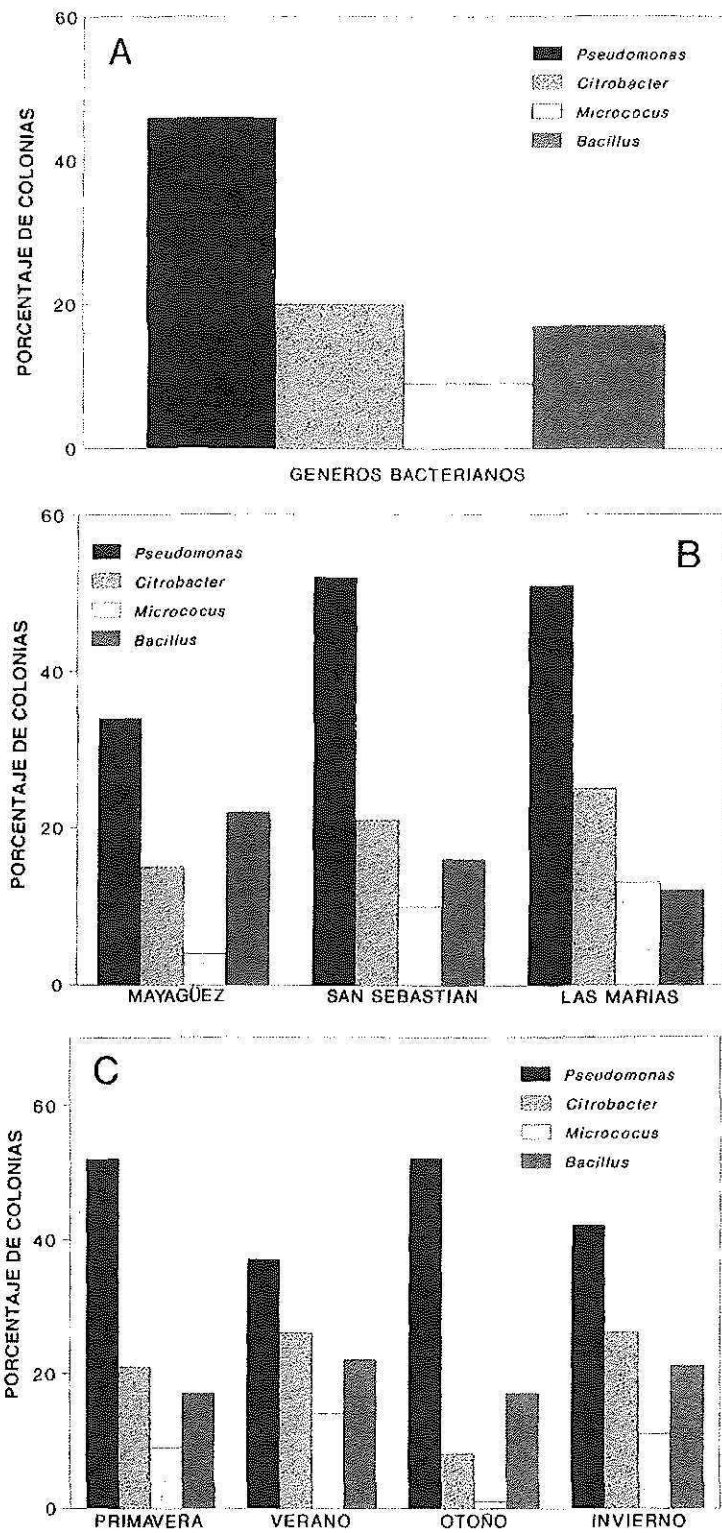


FIGURA 2. Frecuencia y distribución general de la microflora bacteriana asociada a las uredoesporas de *Hemileia vastatrix* de acuerdo al porcentaje total (A), por localidad (B) y por estación (C).

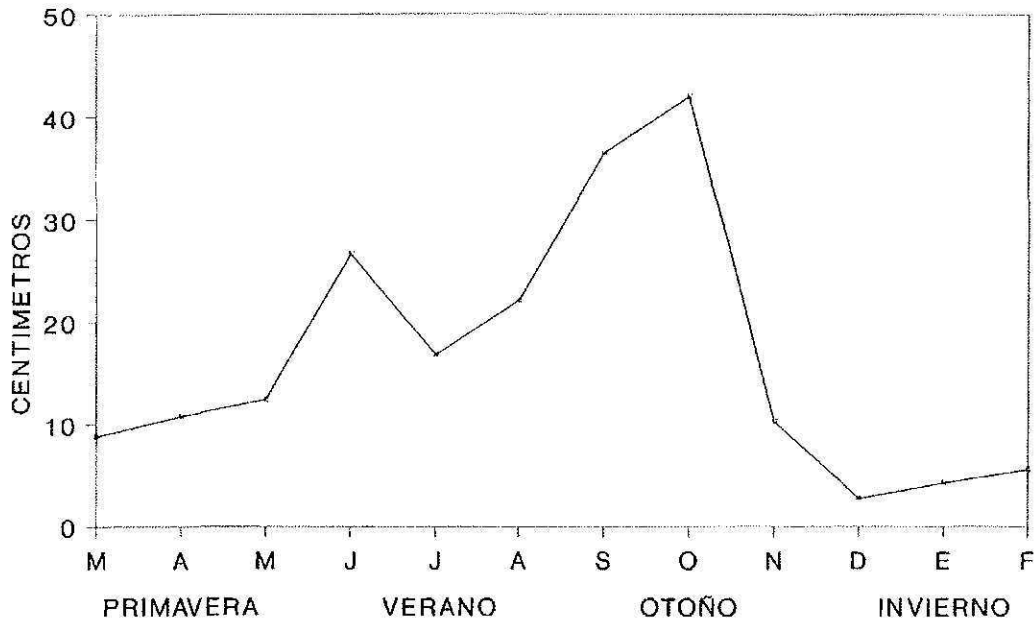


FIGURA 3. Patrón de lluvia promedio para el año 1990 tomado de estaciones meteorológicas localizadas entre 50 y 333.3 msnm.

adecuadas para el desarrollo de la microflora. Los hongos son más comunes donde los árboles son abundantes pues éstos proveen condiciones ecológicas adecuadas para el crecimiento y desarrollo de los mismos (Bridge, 1979). Estas condiciones también pueden afectar la frecuencia y distribución de la flora bacteriana.

Las variaciones en temperatura y humedad pueden alterar la microflora ya que su influencia es directa en los individuos de la población. Los hongos, por ejemplo, necesitan una capa de agua alrededor de sus células a través de la cual se difunden los nutrientes (Garraway, 1984); las bacterias por su parte la necesitan además para su movimiento. En términos generales, para su desarrollo, los hongos requieren temperaturas que fluctúan desde los 20° C hasta los 50° C (Cochrane, 1984) y las bacterias entre los 4° C y 75° C (Cappuccino y Sherman, 1987; Bergey, 1974). Sin embargo, este margen puede variar de acuerdo con las diferentes especies y la disponibilidad de los nutrientes en el ambiente (Garraway, 1984). Por ejemplo, *V. lecanii* crece a su óptimo a 21° C (Farr et al., 1989) y prevaleció más en San Sebastián y Las Marías que en Mayagüez, donde la temperatura fue significativamente más alta que en las otras dos localidades.

A pesar de las variaciones entre localidades, las mayores diferencias en los patrones de distribución de la flora se observaron entre las distintas épocas evaluadas. Este resultado indica que son las condiciones asociadas a la época del año las que ejercen mayor influencia en la di-



CUADRO 1.—Relación de las temperaturas prevaescentes en los períodos correspondientes a la recolección de uredoesporas.

Localidad	Estación			
	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
<b>A. MAXIMA</b>				
San Sebastián	29 a <sup>1</sup>	30 a <sup>1</sup>	27 a <sup>1</sup>	23 a <sup>1</sup>
Las Marías	28 a	30 a	30 a	28 a
Mayagüez	29 a	33 b	33 b	31 b
<b>B. MINIMA</b>				
San Sebastián	17 a	19 a	19 a	17 a
Las Marías	18 a	20 b	20 a	18 a
Mayagüez	19 a	21 b	21 a	17 a
<b>C. PROMEDIO</b>				
San Sebastián	23 a	25 a	23 a	20 a
Las Marías	24 a	25 a	25 ab	23 a
Mayagüez	24 a	27 b	27 b	24 a

<sup>1</sup>Para cada temperatura, los promedios con letras diferentes en una columna difieren significativamente al nivel  $P \leq 0.01$ .

námica poblacional de la flora asociada a las uredoesporas de *H. vastatrix*. De particular relevancia fue la alta frecuencia de *V. lecanii* durante el invierno, época que también se asocia con la mayor incidencia de pústulas esporulantes lo que sugiere una relación estrecha entre ambos organismos.

De las especies de hongos encontradas en asociación a *H. vastatrix* solamente a *V. lecanii* se le conoce actividad hiperparasítica, aunque este hecho no descarta el potencial de las demás como agentes biocontroladores. La determinación de la flora bacteriana fue importante ya que no existen informes de estudios similares con *H. vastatrix*. En otras relaciones parásito-hospedero se han encontrado bacterias epifíticas con potencial biocontrolador de patógenos causantes de royas. MacBride (1969) observó que *Pseudomonas* sp. reducía las infecciones de *Melampsora laricis* mientras que Doherty y Preece (1978) encontraron que *Bacillus cereus*, normalmente asociado a las pústulas de *Puccinia linii*, inhibía la germinación de las uredoesporas bajo condiciones de laboratorio.

Hay que determinar el potencial de esta microflora en el control de la roya del cafeto. Sin embargo, la alta frecuencia y distribución de *V.*

*lecanii*, *C. cladosporioides* y *Pseudomonas* spp. sugiere que estos microorganismos están adaptados a las fluctuaciones climáticas prevalescentes y aparentan ser residentes en los habitats estudiados. Esta información es importante para el diseño de estudios de campo en el control biológico de *H. vastatrix*.

#### LITERATURA CITADA

- Anónimo, 1989. Hay roya del café en Puerto Rico. *Revista del Agricultor*. 3(2):12-14.
- Barnett, H. L. and B. B. Hunter, 1987. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Fourth edition. Ed. MacMillan Publishing Co., New York, N.Y. 218 p.
- Bergey, D. H., 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Betancourt, C., R. Acevedo y J. Busquets, 1980. Reconocimiento de los hongos presentes en la atmósfera de Mayagüez, Puerto Rico. *Caribbean Journal of Science*. 15:3-4.
- Blakeman, J. P. and N. J. Fokkema, 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Ann. Rev. Phytopathol.* 20:167-192.
- Bridge, C. W., 1979. *The Ecology of Fungi*. CRC Press, Inc., Boca Ratón, Fla. 33431, 274 pp.
- Cappuccino, J. and N. Sherman, 1987. *Microbiology: A Laboratory Manual*, Second Edition. The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc. Melo Park, Cal. 458 p.
- Cochrane, V. W., 1958. *Physiology of Fungi*. Ed. by John Wiley & Sons. New York, N.Y. 5245 p.
- Doherty, M. A. and T. F. Preece, 1978. *Bacillus cereus* prevents germination of ure-dospores of *Puccinia allii* and the development of rust disease of leek, *Allium por-rum*, in controlled environments. *Physiol. Plant Pathol.* 12:123-32.
- Farr, D. F., G. F. Bills, G. P. Chamuris and A. Y. Rossman, 1989. *Fungi on Plants and Plant Products in the United States*. The American Phytopathological Society, 3340 St. Paul, Minn. 55121.
- Garraway, E., 1984. *Fungal Nutrition and Physiology*. John Wiley & Sons. New York, N.Y. 259 p.
- Gerlach, W. and H. Nirenberg, 1982. *The Genus Fusarium a Pictorial Atlas*. Kommissionsverlag Paul Parey, Berlin und Hamburg. Lindenstra 4447, D-1000 Berlin 61.
- Goyal, M. R., E. A. González and C. Chao de Báez, 1988. Temperature versus elevation relationships for Puerto Rico. *J. Agric. Univ. of P.R.* 72:449-467.
- Large, E. C., 1940. *The Advance of the Fungi*. Dover, N.Y. 488 pp.
- MacBride, R. P., 1969. A Microbiological control of *Melampsora medusae*. *Can. J. Bot.* 47:711-15.
- Monaco, L. C., 1977. Consequences of the introduction of coffee leaf rust in Brazil. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 287:57.
- Pusey, P. L., 1990. Control of pathogens on aerial plant surfaces with antagonistic microorganisms. *Biological and Cultural Tests*. 5:V-VII.
- Schaad, N. W., 1988. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. American Phytopathological Society. St. Paul, MN. 237 p.
- Schieber, E., 1972. Economic impact of coffee rust in Latin America. *Annu. Rev. Phytopathol.* 10:491-510.
- Steel, R. G. D. and J. H. Torrie, 1980. *Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach*. Second Edition. McGraw-Hill, Inc. 633 pp.
- Thurston, H. D., 1984. *Tropical Plant Diseases*. The American Phytopathological Society. St. Paul, MN. pp. 123-129.