

Nota de Investigación

USO DE DISCOS DE HOJAS DE CAFETO PARA IDENTIFICAR ORGANISMOS CON POTENCIAL DE BIOCONTROL¹

Altgracia M. Vizcaino² y Rocío del P. Rodríguez³

J. Agric. Univ. P.R. 80(1-2):81-84 (1996)

Buscando alternativas para el control de la roya del café, *Hemileia vastatrix*, se identificaron varias especies de hongos asociados a las uredosporas de este patógeno. Es necesario examinar la naturaleza de la asociación para determinar el potencial de estos organismos en el control de *H. vastatrix*. La condición obligada de este patógeno impide su cultivo artificial bajo condiciones de laboratorio por lo que esta etapa inicial en la evaluación de organismos biocontroladores requiere de una metodología en la que el tejido vivo forme parte del ensayo.

Para la evaluación de la reacción in vitro de interacciones patógeno-hospedero se han utilizado discos de hojas con mucho éxito (Bussey y Stevenson, 1991; Eskes, 1982; Rodríguez et al., 1991). Este trabajo tuvo como propósito evaluar este sistema para la identificación inicial de organismos que afecten el desarrollo de las uredosporas y de la infección de *H. vastatrix*.

Se seleccionaron hojas de apariencia sana del tercer y cuarto nudo de ramas de cafetos de la variedad Bourbón. Las hojas se lavaron en agua corriente y se secaron con papel absorbente. Se cortaron discos de 2 cm de diámetro con un perforador de corcho previamente esterilizado. Los discos se colocaron sobre laminillas esterilizadas en una cámara húmeda que consistió de platos de Petri de 15 cm de diámetro con papel de filtro humedecido. Para las inoculaciones se preparó una suspensión, en agua destilada esterilizada, de 1×10^6 esporas por mililitro de los hongos *Verticillium lecanii*, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. oxysporum*, *Penicillium* sp. y *Aspergillus niger*. Se añadieron uredosporas a razón de 1 mg/ml a cada suspensión y se agitó por medio minuto. El centro de cada disco se inoculó con 20 μ l de la suspensión mixta de uredosporas y de propágulos de la especie del hongo a examinar. Los tratamientos consistieron de las seis especies de hongos, y tres testigos representados por discos inoculados con uredosporas, discos inoculados con los hongos en evaluación y discos tratados con agua destilada esterilizada. Cada tratamiento estuvo representado por 20 discos distribuidos en cinco laminillas con cuatro discos por laminilla. Después de inoculados, se colocaron los discos bajo condiciones de obscuridad por 48 hrs al final de las cuales se mantuvieron bajo luz difusa en el laboratorio y a 24°C. Periódicamente se examinaron para detectar el desarrollo de síntomas o de lesiones.

Para determinar el efecto de estas especies en la germinación de las uredosporas y en su viabilidad se depositaron seis microgotas de 20 μ l de las combinaciones de los tratamientos en medio de cultivo agar-agua (AA) y se incubaron bajo las mismas condiciones

¹Manuscrito sometido a la junta editorial el 29 de junio de 1995.

²Estudiante Graduada, Departamento de Protección de Cultivos.

³Investigadora, Departamento de Protección de Cultivos, Recinto Universitario de Mayagüez, Apartado 5000, Mayagüez, P.R. 00681.

CUADRO 1.—Porcentaje de germinación y reducción de la germinación de uredosporas de *Hemileia vastatrix* inoculadas en suspensión mixta con conidias de varias especies de hongos.

Especies fungosas	% germinación	% reducción ¹
<i>Verticillium lecanii</i>	40	50
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	57	29
<i>Cladosporium oxysporum</i>	60	25
<i>Fusarium oxysporum</i>	70	13
<i>Aspergillus niger</i>	75	6
<i>Penicillium</i> sp.	72	10
Testigo ²	80	—

¹Testigo-Tratamiento × 100

Testigo

²Uredosporas suspendidas en agua.

que la de los discos inoculados. La germinación de las uredosporas se examinó bajo el microscopio al final de las 48 hrs.

En general, el porcentaje de germinación de las uredosporas en asociación con los hongos fue menor que el de aquéllas en agua (Cuadro 1). *Verticillium lecanii* fue el hongo que presentó mayor efecto supresor, reduciendo en un 50% la germinación de las uredosporas. *Cladosporium cladosporioides* y *C. oxysporum* fueron también efectivos, inhibiendo la germinación en un 29 y 25%, respectivamente. En los tratamientos con *F. oxysporum*, *A. niger* y *Penicillium* sp. ocurrió la menor reducción. Observaciones posteriores demostraron que *V. lecanii* fue muy efectivo en colonizar las uredosporas de *H. vastatrix* ya que a los seis días su micelio había cubierto por completo todas las uredosporas.

En los discos se observó, 75 días después de la inoculación, que aquellos con las suspensiones mixtas no manifestaron la clorosis típica de la infección inicial de la roya. Tampoco se observaron lesiones en los discos testigos inoculados con las especies de los hongos en evaluación indicando que éstos no son patogénicos a las hojas del café. Solamente los discos testigos inoculados con uredosporas manifestaron clorosis (Figura 1). Se observó que los hongos evaluados pueden sobrevivir sobre la hoja del café, evidenciado particularmente en las inoculaciones con *V. lecanii*, *C. cladosporioides* y *C. oxysporum* donde al final de la prueba, los discos inoculados mostraban claramente el crecimiento del micelio sobre la superficie.

Nuestros resultados comprueban que el método de discos de hojas es un sistema adecuado para examinar la acción biocontroladora de especies biológicas. Este hecho es de particular importancia en trabajos con cafetos donde se requiere de gran espacio para el desarrollo de las plantas. En adición, nuestros resultados indican que existe un potencial en esta flora para el control biológico de la roya del café. De las especies evaluadas *V. lecanii*, *C. cladosporioides* y *C. oxysporum* son las más promisorias ya que mostraron mayor actividad en la inhibición de la germinación de las uredosporas y tienen la capacidad para sobrevivir sobre la superficie de la hoja.

Entre las especies fungosas citadas como hiperparásitos de *H. vastatrix* están *V. lecanii*, *V. leptobactrum*, *V. psalioetae*, *C. hemileiae* y *Paranectria hemileiae* (Eskes, 1989; García et al., 1965). En condiciones de humedad alta estos hongos ocurren naturalmente y de todos ellos, *V. lecanii* es el hiperparásito más común de *H. vastatrix*. El mismo ha sido

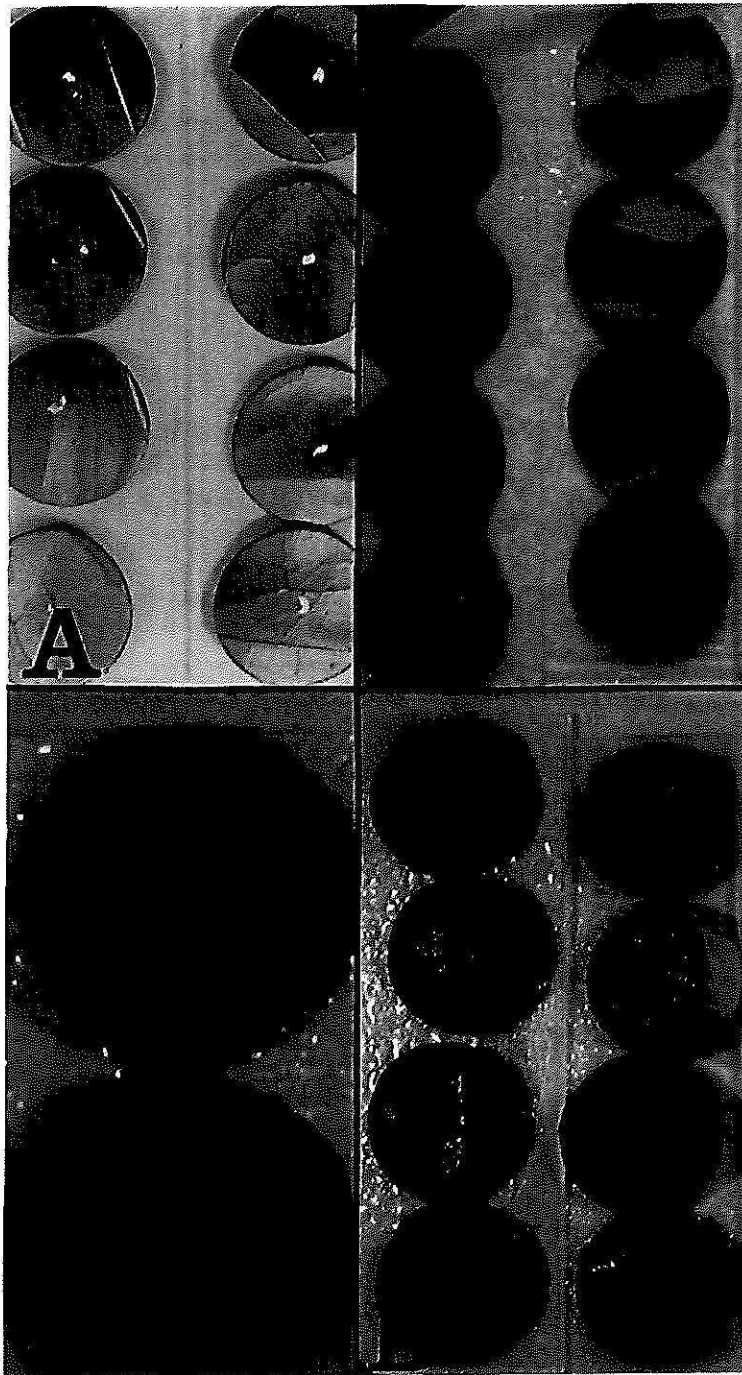


FIGURA 1. Discos de hojas de café var. Bourbon inoculados con uredosporas de *Hemileia vastatrix* solas y en combinación con las especies de hongos evaluados, 75 días después de inoculados.

A. Discos inoculados con suspensión de uredosporas y conidias de *Verticillium lecanii* mostrando el crecimiento micelial en el área inoculada.

B. Discos inoculados con suspensión de uredosporas y conidias de *Cladosporium cladosporioides* mostrando el crecimiento micelial en el área inoculada.

C. Discos testigos inoculados con uredosporas suspendidas en agua.

D. Discos testigos tratados con agua solamente.

reportado como parásito de insectos (Hall, 1980) y de otros hongos que inducen roya (Blakeman y Fokkema, 1982) y su acción hiperparasítica ha sido determinada bajo condiciones de invernadero (Spencer, 1980). Son pocos los estudios que se han llevado a cabo para examinar la acción de *V. lecanii* en el campo. Se considera que una limitación de este hongo es la necesidad de humedad alta para su desarrollo, requerimiento que afecta su sobrevivencia bajo condiciones naturales (Eskes, 1989). Sin embargo, esta micoflora tiene potencial para el control biológico de *H. vastatrix*, sobretudo en áreas cafetaleras donde las condiciones de humedad son altas y bajo las condiciones prevalescentes en los viveros de cafetos.

LITERATURA CITADA

- Blakeman, J. P. and N. J. Fokkema, 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Ann. Rev. Phytopathol.* 20:167-192.
- Bussey, M. J. and W. R. Stevenson, 1991. A leaf disk assay for detecting resistance to early blight caused by *Alternaria solani* in juvenile potato plants. *Plant Disease* 75:385-390.
- Eskes, A. B., 1982. The use of leaf disk inoculations in assessing resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). *Neth. J. Pl. Path.* 88:127-141.
- Eskes, A. B., 1989. Natural Enemies and Biological Control. In: Coffee Rust: Epidemiology, Resistance and Management. A. C. Kushalappa y A. B. Eskes. Eds. CRC Press, Boca Raton, Fla. 354 p.
- García, H., J. A. Leal and J. R. Villeneuve, 1965. Lysis of uredospore germ tubes of rust by species of *Verticillium*. *Phytopathology* 55:40-42.
- Hall, R. A., 1980. Laboratory infection of insects by *Verticillium lecanii* strains isolated from phytopathogenic fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 74:445-446.
- Rodríguez, R. P., W. González, O. Bosques y L. Sánchez, 1991. Evaluación de híbridos de café para resistencia a *Hemileia vastatrix*. Memorias Reunión Anual SOPCA, pág. 36.
- Spencer, D. M., 1980. Parasitism of carnation rust (*Uromyces dianthi*) by *Verticillium lecanii*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 74:191-194.