

EVALUACION DE DOS AISLAMIENTOS DE *Verticillium* sp. COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO DE LA ROYA (*H. vastatrix*) DEL CAFETO (*Coffea arabica* L.), EN CONDICIONES DE INVERNADERO*

Arnulfo Monzón**
Elkin Bustamante***

ABSTRACT

The effect of *Verticillium* sp. as hyperparasite of *H. vastatrix* and the effect on the germination of *H. vastatrix* uredospores were studied. Hyperparasitic activity of different fungus isolations and concentrations applied to rust spots showed that the incidence level increases during the first 10 days, attaining values from 50 to 80%. This indicates an efficient performance of the fungus as a hyperparasite. The highest incidence level was observed with the isolation from "El Coyolar", Matagalpa at concentrations of 105 and 2.5*105 spores/ml. After 10 days the hyperparasite's incidence tended to become stable. The effect of *Verticillium* sp. on the spore germination was determined by placing the spores in an agar-water medium at 2%. Germination was significantly lower in the presence of *Verticillium* sp. *Verticillium* sp. demonstrated important qualities as a control agent of *H. vastatrix*, based on its ability to colonize established spots and its effect on pathogen spore germination.

INTRODUCCION

A pesar de la importancia del cultivo del café en la actividad económica y social de Nicaragua, la producción cafetalera enfrenta grandes problemas por los altos costos de producción y los bajos precios que se pagan al productor. Estos problemas se agudizan debido al efecto que sufre la producción por la incidencia de plagas y enfermedades. Entre los problemas fitosanitarios, la roya del café (*Hemileia vastatrix*), ocupa un lugar de importancia en la caficultura nacional. La principal forma de control la constituyen los fungicidas.

Carrión (1988), afirma que *H. vastatrix* tiene enemigos naturales capaces de afectar su población, tal es el caso de *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas, el cual se desarrolla sobre las uredosporas impidiendo su dispersión y afectando su viabilidad. Esto motivó la realización de este trabajo, cuyos objetivos fueron: evaluar la actividad hiperparasítica de *Verticillium* sp. sobre pústulas de roya y conocer el efecto de este hongo sobre la germinación de las uredosporas de *H. vastatrix*.

Recibido: 18/12/92. Aprobado: 05/07/93.

*Basado en la tesis de Mag.Sc. del primer autor. CATIE. Programa de Posgrado. Turrialba. Costa Rica.

**Universidad Nacional Agraria. Escuela de Sanidad Vegetal. Apdo. 453 Managua, Nicaragua.

***CATIE. Area de Fitoprotección. 7170 Turrialba, Costa Rica.

RESUMEN

Se estudió el efecto del hongo *Verticillium* sp. como hiperparásito de *H. vastatrix* y su efecto sobre la germinación de uredosporas de *H. vastatrix*. Se evaluó su actividad hiperparasítica aplicando dos aislamientos y dos concentraciones del hongo sobre pústulas de roya. El nivel de incidencia aumentó en los primeros 10 días hasta alcanzar valores de 50 hasta 80%. Esto indica que el hongo se comporta con eficacia como hiperparásito. Se observó el mayor grado de incidencia en el aislamiento procedente de El Coyolar, Matagalpa, en concentraciones de 105 y 2.5*105 esporas/ml. La incidencia del hiperparásito tiende a estabilizarse después de 10 días. Se evaluó el efecto de *Verticillium* sp. sobre la germinación de uredosporas, sometiéndolas a la acción del hiperparásito, en medio agar-agua al 2%, encontrando que la germinación es significativamente menor en presencia de *Verticillium* sp. se encontró que *Verticillium* sp. usado como agente de control de *H. vastatrix*, posee propiedades importantes basadas en su capacidad de colonizar pústulas establecidas, y el efecto que presenta sobre la germinación de uredosporas del patógeno.

METODOLOGIA

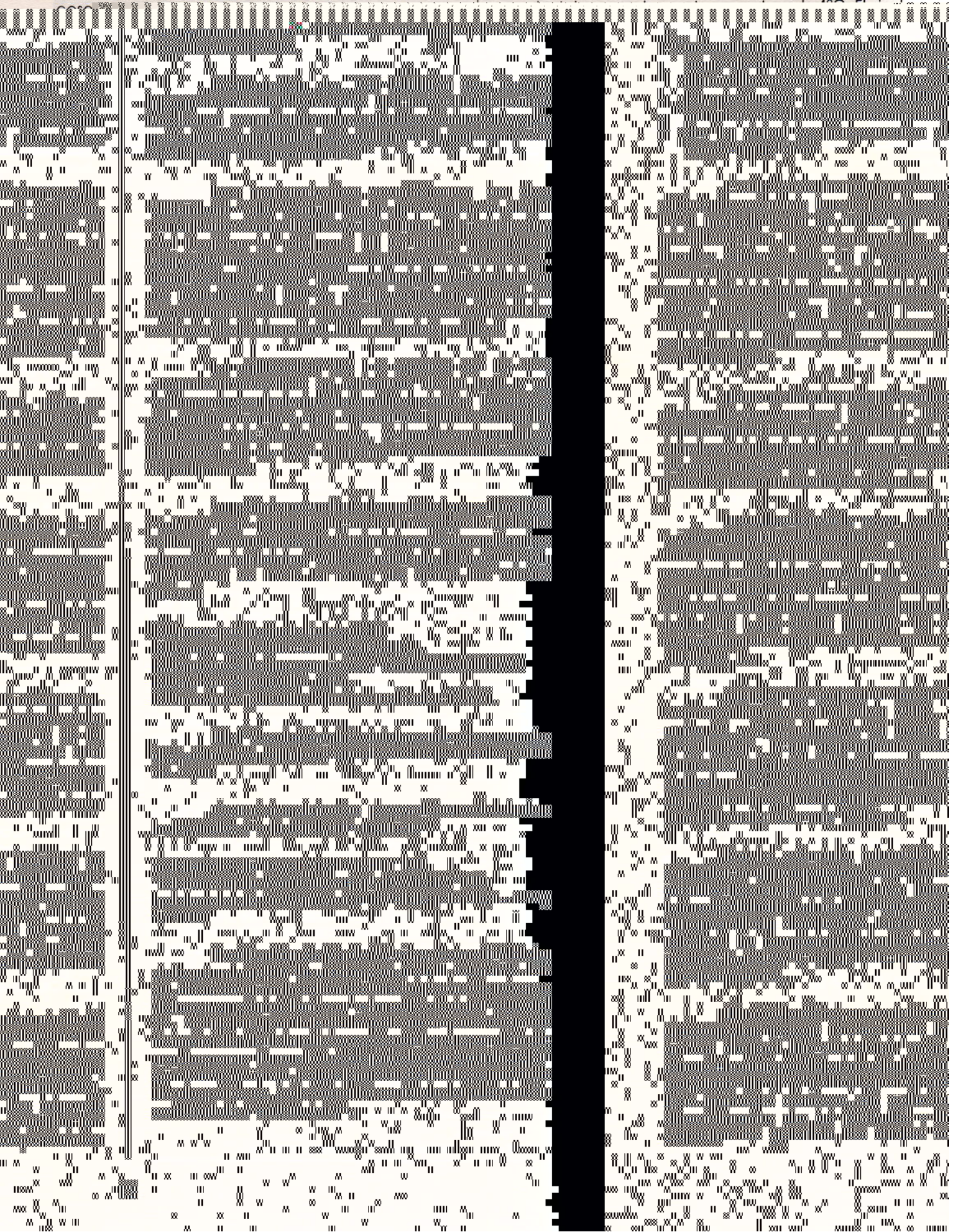
El trabajo se llevó a cabo en el Centro Experimental del Café, en San Ramón, Matagalpa, y en los laboratorios de la Escuela de Sanidad Vegetal de la Universidad Nacional Agraria, Nicaragua durante los meses de julio a octubre 1992 y constó de dos etapas: evaluación de *Verticillium* como hiperparásito de *H. vastatrix*, y evaluación del efecto de *Verticillium* sobre la germinación de las uredosporas de *H. vastatrix*.

Aislamiento y producción de *Verticillium* sp., para ser utilizado en experimentos de invernadero. El hongo se aisló de muestras frescas de roya hiperparasitadas, provenientes de El Coyolar, Matagalpa y el Crucero, Managua, a partir de cafetos variedad Caturra. El aislamiento se realizó 35 días antes de establecer el experimento; posteriormente el hongo se cultivó en placas de Petri con el medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar) y se mantuvo a temperaturas entre 23 y 25°C. Cuando las colonias del hongo estaban bien desarrolladas (15 días), fue transferido a un medio líquido contenido en erlenmeyers de 250 ml. El soporte lo constituía: Afrecho (25 g), levadura de cerveza (10 g), CaCl₂ (0.25 g), KH₂PO₄ (13.60 g), NaOH (2.32 g), agua destilada (1 litro).

El hongo colonizó completamente la superficie del soporte a los 15 días. Entonces se procedió a cultivarlo en un medio sólido que consistía en sorgo precocido, a una proporción de 30 ml de inóculo por 100 g de sorgo, en erlenmeyers de 500 ml.

El hongo se estableció plenamente al mes de sembrado en el medio sólido y estuvo listo para su

tubos de ensayo sumergidos hasta 1/3 del tubo, en un medio de ácido sulfúrico al 32.6% (v/v). El recipiente



Una vez depositadas las esporas de ambos hongos en el medio, los platos Petri se colocaban en incubadora a temperatura de 21°C. Las lecturas de germinación de las uredosporas de roya se hacían 16 horas después, observando cinco campos microscópicos en cada una de las cinco gotas de las suspensiones colocadas en el medio.

Análisis de los datos. Dentro del experimento establecido para evaluar el hiperparasitismo de *Verticillium sp.* sobre las pústulas de roya, se realizó análisis de varianza mediante contrastes ortogonales para la incidencia de roya y de *Verticillium*.

Se estimó el parámetro área debajo de la curva de progreso para cada tratamiento, para roya y *Verticillium sp.*, el cual fue sometido a análisis de varianza mediante contrastes ortogonales.

La variable porcentaje de germinación de uredosporas de roya en presencia y/o en ausencia de *Verticillium sp.* se analizó mediante una prueba de t de Student, con el fin de evaluar el efecto de *Verticillium sp.* sobre la germinación de las royas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Evaluación de *Verticillium sp.* como hiperparásito de *H. vastatrix*. El análisis de varianza mediante la técnica de contrastes ortogonales para las variables incidencia de roya (NHR/NHT)*100, e incidencia de *Verticillium* (NHRV/NHR)*100, demostró que para ambas variables no hubo diferencias significativas entre los tratamientos en estudio. Sin embargo, el análisis de varianza para el parámetro área debajo de la curva, demostró que no hay diferencias entre los tratamientos para la variable incidencia de roya, pero sí para incidencia de *Verticillium sp.* Es decir, que la roya se comportó del mismo modo para todos los tratamientos. Aunque para los dos aislamientos y las dos concentraciones, la tendencia de la roya fue descendente a partir del primer momento de muestreo. No así para el tratamiento testigo, el cual presentó tendencia ascendente, aunque los valores de incidencia no fueron los mayores (Fig. 1).

Durante el experimento los valores de incidencia menores se observaron en ambos aislamientos en la concentración 105 esporas/ml. En cambio el aislamiento procedente de El Coyolar en la concentración 2.5×10^5 , presenta la mayor incidencia de la enfermedad.

Al analizar el área debajo de la curva para la incidencia de *Verticillium sp.*, los dos aislamientos difirieron significativamente ($P=0.03$), además todos los tratamientos difieren significativamente del testigo ($P=0.0001$). Sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones dentro de cada aislamiento (Cuadro 1).

Entre los valores promedios de área debajo de la curva de incidencia de *Verticillium sp.* para cada tratamiento, se observó que ambas concentraciones del aislamiento procedente de El Coyolar, acumulan los mayores valores (Cuadro 2).

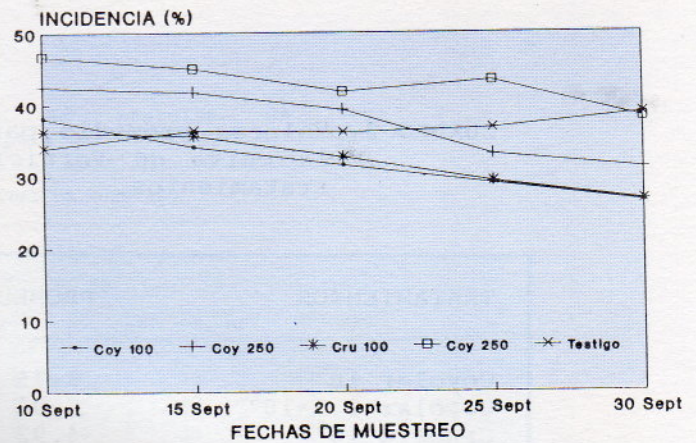


Fig. 1. Incidencia de la roya del cafeto sometida a la actividad hiperparasítica de *Verticillium sp.*, en condiciones de invernadero.

CUADRO 1. Resultados de análisis de varianza para el parámetro área debajo de la curva de incidencia de *Verticillium sp.*

F.V	GL	S de C	C M	Valor F	Valor P
Coyolar vs Crucero	1	32.85	32.85	4.79	0.003
Coyolar, Crucero vs Testigo	1	336.83	336.83	49.14	0.0001
Coyolar 10^5 vs Coyolar 2.5×10^5	1	21.53	21.53	3.14	0.08
Crucero 10^5 vs Crucero 2.5×10^5	1	1.74	1.74	0.25	0.61
Error	45	308.45	6.85		
Total	49	701.4			

$R^2 = 0.56$ C.V. = 50

Cuando se analizó incidencia de roya como NHRV/NHR, encontramos alto nivel de hiperparasitismo para los aislamientos y concentraciones de *Verticillium sp.*. Durante los primeros 10 días se observó el incremento de la incidencia, hasta alcanzar valores desde 50% hasta 80% durante el tercer muestreo. Pasado éste período la incidencia del hongo tiende a decaer.

El comportamiento del hiperparasitismo para los diferentes tratamientos, se muestra en la Fig. 2, donde además se observa que la incidencia de *Verticillium sp.* en el tratamiento testigo es apenas de 0.1% en el último muestreo.

Los mayores números de pústulas hiperparasitadas, aparecen a los 15 y 20 días después de la aplicación de *Verticillium*. En general el número promedio de pústulas fue bajo, sobre todo al final del estudio, lo cual se debe a que las hojas más afectadas por la roya tienden a caer de la planta. Por otro lado, la incidencia de *Verticillium* que aparece al final del muestreo, se debe probablemente a contaminación de los demás tratamientos, y no a efecto del ambiente (Cuadro 3).

Cuando se calculó incidencia de *Verticillium* como NPV/NP, los mayores valores siempre se observaron para el aislamiento de El Coyolar, en la

CUADRO 2. Valores promedio para el parámetro área debajo de la curva de *Verticillium* sp. para los diferentes tratamientos.

TRATAMIENTOS	PROMEDIOS	DESVIACION ESTANDAR
Coyolar 10^5	6.75	2.68
Coyolar $2.5 \cdot 10^5$	5.06	2.85
Crucero 10^5	4.92	2.67
Crucero $2.5 \cdot 10^5$	3.66	1.5
Testigo	0.02	0.06

concentración 10^5 esporas/ml. Entre los tratamientos, el aislamiento procedente de El Crucero a concentración de $2.5 \cdot 10^5$ presentó menores valores de área debajo de la curva de progreso, además la incidencia para éste tratamiento, comenzó a decaer a partir del tercer muestreo. Para todos los tratamientos, la tendencia siempre fue ascendente, contrario a cuando analizamos incidencia como NHRV/NHR, donde la incidencia tiende a decaer para todos los tratamientos a partir del tercer muestreo (Fig. 3).

Este comportamiento puede deberse a que el número de pústulas con *Verticillium* en las hojas hiperparasitadas aumenta, en cambio el número total de pústulas disminuye en la medida en que las hojas más afectadas con roya caen de la planta.

El análisis de varianza para incidencia de *Verticillium* sp. a nivel de pústula arrojó resultados similares a los de nivel de planta.

Los valores altos de incidencia, tanto a nivel de hoja como en pústula, reflejan la eficiencia del hiperparásito para establecerse sobre las pústulas de roya. Esta capacidad de *Verticillium* para hiperparasitar las pústulas es una propiedad importante, dado que el efecto de *Verticillium* sp.

sobre la enfermedad se basa principalmente en la reducción del inóculo para los ciclos epidemiológicos subsiguientes.

Los resultados de este experimento coinciden con Vélez (1989), quien al aplicar cultivo licuado (micelio y conidias) de *V. lecanii* sobre lesiones establecidas de *H. vastatrix*, observó cubrimiento e invasión de la pústula por el micelio blanco del hongo con la subsecuente pérdida de ésta. El hongo origina una depresión central en la pústula, la cual se acentúa con el tiempo.

El hecho de encontrar diferencias entre los tratamientos cuando se analiza el parámetro área debajo de la curva, y no al analizar incidencia para la misma variable, señala que el parámetro área debajo de la curva indica mejor el desarrollo de la epidemia de la enfermedad, lo mismo que el desarrollo del hiperparasitismo de *Verticillium* sobre la roya.

Shaner y Finney (1977), Hernández (1984 y 1986), citados por Hernández y Montoya (1987), plantean que además de la tasa de infección, el área debajo de la curva de progreso de la enfermedad es un parámetro generalmente usado en epidemiología comparativa.

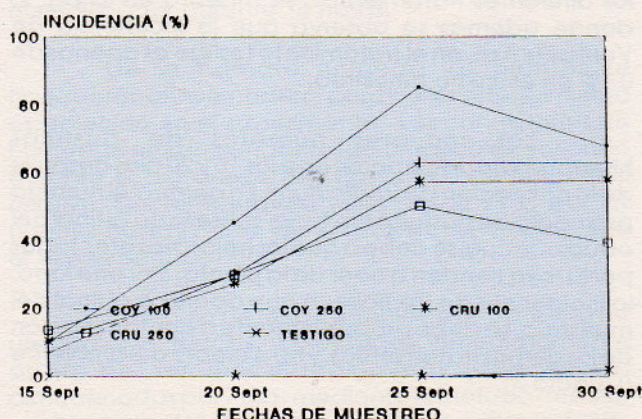


Fig. 2. Incidencia de *Verticillium* sp. sobre pústulas de roya del café en condiciones de invernadero.

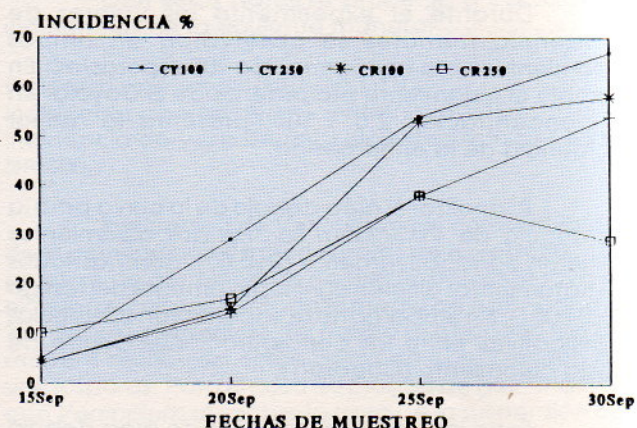


Fig. 3. Incidencia de *Verticillium* sp. sobre roya, a nivel de pústula en condiciones de invernadero.

CUADRO 3. Número promedios/planta de pústulas de roya y pústulas hiperparasitadas para los diferentes tratamientos.

TRATAMIENTOS	FECHAS DE MUESTREO									
	SEPTIEMBRE									
	10		15		20		25		30	
	NP	NPV	NP	NPV	NP	NPV	NP	NPV	NP	NPV
Coyolar 10 ⁵	19	0	21	1	21	6	13	7	12	8
Coyolar 2.5*10 ⁵	34	0	28	1	22	3	16	6	13	7
Crucero 10 ⁵	25	0	24	1	20	3	15	8	12	7
Crucero 2.5*10 ⁵	23	0	20	2	18	3	16	6	14	4
Testigo	11	0	12	0	11	0	11	0	11	0.1

NP = Número promedio de pústulas de roya.
NPV= Número promedio de pústulas hiperparasitadas.

A éste respecto Hernández y Montoya (1987), al evaluar el desarrollo de la epidemia de la roya del café a diferentes altitudes, plantean que la tasa de infección es un parámetro comunmente usado por los investigadores en el análisis cuantitativo de epidemias, sin embargo encuentra limitaciones cuando la cantidad inicial de inóculo difiere significativamente entre tratamientos. En tal caso se procede a calcular el parámetro área debajo de la curva de progreso de la enfermedad.

Efecto de *Verticillium sp.* sobre la germinación de uredosporas de *H. vastatrix*. La comparación de medias para el porcentaje de germinación de uredosporas realizada a través de la prueba t de Student, demuestra que el porcentaje de germinación es significativamente menor ($\text{prob} > t = 0.0001$) cuando se aplica *Verticillium sp.* sobre las uredosporas de la roya (Fig. 4).

El porcentaje promedio de germinación fue de 15% al aplicar *Verticillium sp.* y 75% cuando no se aplicó. Por tanto se puede afirmar que *Verticillium sp.* inhibe la germinación de uredosporas de roya, ya que las esporas afectadas no desarrollaron tubos germinativos.

A éste respecto otros autores han evaluado el efecto de *Verticillium sp.* sobre la germinación de uredosporas de *H. vastatrix*. Leguizamón y Vélez (1988), observaron que el crecimiento micelial de 15 días del hiperparásito de la roya del café (*Verticillium lecanii*) en cultivo líquido de papa-dextrosa, centrifugado y filtrado a través de una membrana estéril, afecta la germinación de uredosporas de *H. vastatrix*, sus períodos de incubación y latencia y la tasa de infección.

Esques et al. (1987) observaron que filtrados de maceración del micelio y esporas de *V. lecanii* y *V. leptobactrum* inhibieron parcialmente la germinación de las uredosporas de *H. vastatrix*.

Una especie de *Verticillium* inhibió el crecimiento de esporas de *H. vastatrix*, por medio de secreciones extracelulares en medio de agua.

Esporas de *H. vastatrix* fueron suspendidas en agua destilada e incubadas con un inóculo de *Verticillium sp.* El hiperparásito se desarrolló muy bien sobre las esporas de la roya durante los dos primeros días, después de dos semanas se encontraron pocas esporas de *H. vastatrix* capaces de observar al colorante azul de lactofenol. En algunos casos parece que las paredes de las uredosporas no fueron afectadas (Leal y Villanueva 1962).

Lim y Nik (1983), reportan que el micoparásito *V. psalliotae* se desarrolló bien entre las rugosidades de la superficie de las uredosporas de roya, además creció dentro de las uredosporas vivas de roya, y las esporas infectadas eventualmente perdieron su citoplasma, exceptuando cuerpos grasos, y se volvieron no viables. Además se observó que no hubo penetración de tubos germinales de *H. vastatrix* o de micelio.

Vélez (1989) observó que crecimiento micelial de *V. lecanii* cultivado en medio de Papa-Dextrosa-Agar afectan la lesión y la germinación de uredosporas de *H. vastatrix*.

Como se ha observado de acuerdo con estos resultados la actividad de *Verticillium sp.* sobre la roya del café radica en su efecto como inhibidor

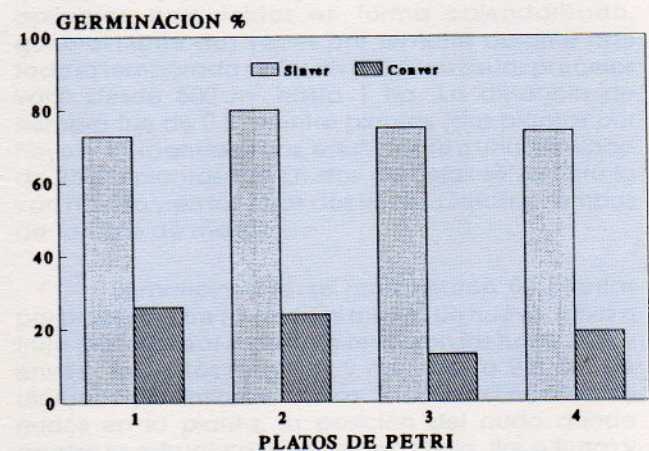


Fig. 4. Efecto de *Verticillium sp.* sobre la germinación de uredosporas de *H. vastatrix*.

de la germinación de las uredosporas, y en el poder que tiene de hiperparasitar pústulas de roya establecidas.

Contrario a lo observado en el campo, donde la incidencia del hiperparásito fue estable en el tiempo, en invernadero la incidencia del hiperparásito aumentó durante los primeros 10 días. Esto se explica, por las limitaciones ambientales que se presentaron durante el estudio. En cambio en el invernadero se presentaron menos factores limitantes para el desarrollo del hiperparásito.

La actividad hiperparasítica de *Verticillium sp.* sobre la roya del café, resulta en una reducción de inóculo para los ciclos posteriores. Es decir, que una alta incidencia de *Verticillium sp.* en un ciclo, causa una menor disponibilidad de inóculo de roya para el ciclo subsiguiente. Esto se debe a la capacidad que tiene *Verticillium sp.* para inhibir la germinación de las esporas de la roya, y afectar su viabilidad al causar la ruptura y pérdida del citoplasma de las esporas.

CONCLUSIONES

Se observó un hiperparasitismo efectivo, al aplicar *Verticillium sp.* en condiciones de invernadero sobre pústulas esporulantes de roya. En algunos casos la incidencia alcanzó hasta 80%.

Verticillium sp. afectó la germinación de uredosporas de roya en condiciones de laboratorio, inhibiendo en un 80% el desarrollo de tubos germinativos.

Verticillium sp. se puede obtener en el campo y se puede producir artificialmente, lo cual facilitaría estudios posteriores de campo.

RECOMENDACIONES

- Evaluar diferentes concentraciones de *Verticillium sp.* para seleccionarlos de mejor comportamiento como hiperparásitos, con mayores niveles de enfermedad que los encontrados en el presente experimento.
- La búsqueda de cepas de *Verticillium sp.* con alto valor como agente de control de la roya del café, debe basarse en las buenas propiedades del hongo, por su alta capacidad hiperparasítica, adaptabilidad y ambiente, así como el valioso efecto que éste tiene sobre la germinación de las uredosporas.

BIBLIOGRAFIA

- CARRION, G. 1988. Estudios sobre Control Biológico de la roya del café por *Verticillium lecanii* en México. *Micología Neotropical Aplicada* 1:79-86.
- ESKES, A.B.; MENDES, M.D.L.; ROBBS, C.F.; Gams, W. (EMBRAPA/CNPDA, CEP 13820-Jaguariuna, SP). 1987. Studies on the hiperparasitism of *Hemileia vastatrix* by *Verticillium spp.* In Congreso Paulista de Fitopatología, 10ª, Piracicaba S.P. febrero 1987. Resúmenes. Piracicaba, Grupo Paulista de Fitopatología.
- HERNANDEZ T., T. y MONTOYA, R. 1987. Epidemiología Cuantitativa y Su Aplicación al Análisis de Algunas Enfermedades de Cultivos Tropicales. Lima, Perú. Escuela de sanidad vegetal, IICA.
- LEAL, J.A.; VILLANUEVA, J.R. 1962. Actividad fungilítica de especies de *Verticillium*. *Science*. 136(5317):715-716.
- LEGUZAMON C., J.E.; VELEZ A., P.E. 1988. Efecto de extractos de *Verticillium lecanii* sobre la roya del café *Hemileia vastatrix* Berk y Br. In Congreso ASCOLFI 9º, Pasto, Colombia, Junio 22-24. 1988. Resúmenes p. 68 esp.
- LIM, T.K. y NIK, W.Z. 1983. Mycoparasitism of the coffee rust pathogen (*Hemileia vastatrix*, by *Verticillium psalliotae* in Malaysia. *Pertanika*, Malasia 6(2):23-25.
- VELEZ, P.E. 1988. Estudio macro y microscópico del efecto de *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas sobre *Hemileia vastatrix* Berk y Br., agente causal de la roya del café. In X congreso ASCOLFI; V Reunión ALF; XXX Reunión Anual APS-CD. Cali Colombia, 10-14 Jul. 1989.