

Hongos hiperparásitos de la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome) prevalentes en plantaciones de café en Guatemala: nota gráfica ilustrativa

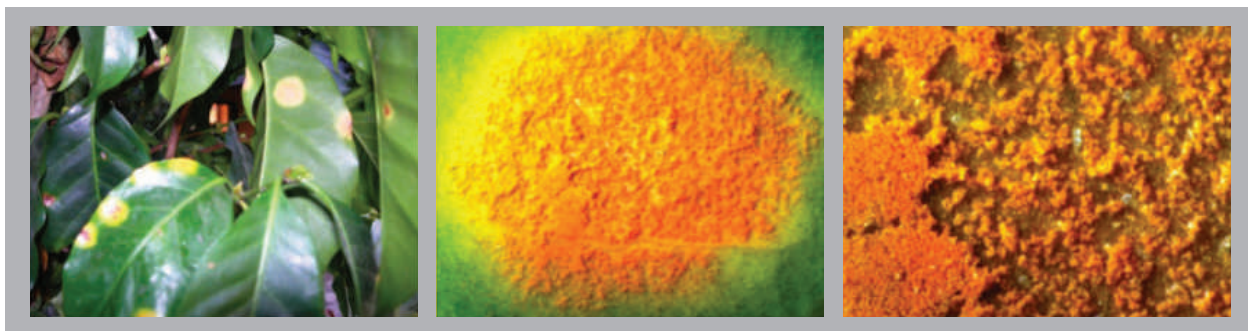
Carlos Rolz¹ & Rolando Cifuentes²

¹ Centro de Estudios en Bioingeniería, ² Centro de Estudios Agrícolas y Alimentarios, Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala

Las variedades de café empleadas en su mayoría en la caficultura nacional son susceptibles en diverso grado a la infección por roya, lo que ha provocado una extensa distribución de la roya en todas las zonas cafetaleras del país (Avelino et al. 2015). La Asociación Nacional del Café (ANACAFÉ)¹ ha lanzado un programa amplio en el que se incluye el combate con fungicidas foliares de contacto y sistémicos, la introducción en las plantaciones de variedades resistentes, y una ayuda financiera, capacitación y asesoría técnica para los caficultores. Sin embargo, por un lado, es una utopía pensar en la erradicación, y por el otro, la falta de recursos financieros y el bajo precio del café en el mercado internacional, han limitado las acciones correctivas y las plantaciones de café continúan mostrando alto riesgo de infección. La publicación reciente de ANACAFÉ¹ describe el actual sistema nacional de monitoreo y vigilancia de la Roya y detalla el grado de severidad de la epidemia.

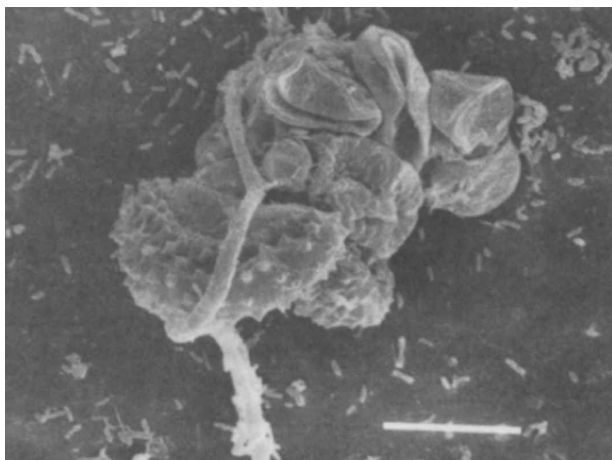
La infección por roya ocurre en la cara inferior de las hojas, desarrollándose como pequeños círculos amarillo-anaranjados

de 1-2 mm, los cuales luego crecen transformando su color a un anaranjado intenso y adquiriendo una apariencia superficial pulverulenta, Gráfica 1. El proceso de la infección consiste en la penetración de la espora a través de la estoma, colonización, esporulación y disseminación de las esporas (Kushalappa y Eskes, 1989). Cada uredocuerpo o estructura del hongo en donde se gestan las esporas en la lesión, produce de 4 a 6 cosechas de esporas en un periodo de 5 meses, estimándose que cada lesión puede producir de 300 a 400,000 uredosporas (McCain & Hennen, 1984). La enfermedad por lo general no mata la planta, sin embargo la afecta profundamente ya que ocurre una defoliación prematura de las hojas infectadas. Como consecuencia de lo anterior, existe una reducción del crecimiento vegetativo normal que, a la larga, con otros efectos de estrés, disminuyen la productividad de la cosecha (Waller, 1985) y el rendimiento puede disminuir entre el 35 al 40 %, aunque en casos severos puede llegar al 60 % (Gouveia et al, 2005).



Gráfica 1. La infección de la hoja

¹ Sistema Nacional de Monitoreo y Vigilancia de la Roya, Boletín Especial del Centro de Investigaciones de Café (Cedicafé), Abril 2015.



Gráfica 2. Abrazo mortal del hiperparásito (de Arriola et al, 1998)

La existencia de hongos hiperparásitos a la roya del café se ha demostrado en el laboratorio (Carrión, 1988; Carrión y Ruiz-Belin, 1988; Leguizamón et al, 1989; Eskes et al, 1991; Alarcón y Carrión, 1994; Vélez y Rosillo, 1995; Rivas et al, 1996; Carrión et al 1999). Todos los estudios anteriores se refieren al hiperparásito *Lecanicillium lecanii* (antes denominado *Verticillium lecanii*). Sin embargo se han aislado otros hiperparásitos. En Guatemala, de Arriola et al. (1998) aislaron de lesiones de *Hemileia* en el campo los hongos siguientes: *Aphanocladium meliolae*, *Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium leptobactrum*, y *Verticillium sp.* En Xalapa, Veracruz, Carrión y Rico-Gray (2002) aislaron de lesiones de *Hemileia* en el campo los hongos siguientes: *Acremonium byssoides*, *Calcarisporium arbuscula*, *C. ovalisporum*, *Sporothrix guttuliformis*, *Fusarium pallidorosum*. Recientemente James et al (2016) en muestras de hojas infectadas en México y Puerto Rico encontraron una gran diversidad de hongos asociados con las lesiones. El hongo con mayor frecuencia fue *Gomerella cingulata*. Sin embargo también identificaron hiperparásitos conocidos: *Lecanicillium fusisporum*, *Lecanicillium sp.*, *Simplicillium lanosoniveum*. Estos trabajos han despertado interés por entender de una mejor manera el rol ecológico y el mecanismo de acción de estos hongos presentes en los cafetales.

Se ha demostrado en el laboratorio en ensayos *in vitro* el hiperparasitismo anteriormente mencionado. La Gráfica 2 (de Arriola et al, 1998) ilustra en la observación con microscopía electrónica el *abrazo mortal* del hiperparásito al uredocuerpo de *Hemileia*. Las hifas del hiperparásito perforan la pared celular de la roya, posiblemente por acción enzimática, y penetran. Una vez esto ocurre, el hiperparásito se nutre del contenido orgánico del hongo penetrado. En la ilustración se observa cómo han colapsado los cuerpos de la urospora.

Se ha aislado bacterias endofíticas, es decir presentes en la superficie de las hojas del café, que han mostrado una actividad biológica de control sobre *H. vastatrix* y los resultados en campo han sido prometedores (Shiomi et al, 2006; Haddad et al, 2009; Silva et al, 2012). Estudios recientes han identificado una diversidad de hongos presentes en las hojas pero los investigadores no han demostrado que los mismos tengan una acción biológica contra la roya. Vega et al. (2010) identificaron las especies siguientes como las más abundantes en hojas de cafetos en plantaciones de Hawái, México, Puerto Rico y Colombia: *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, y *Xylariaceae*. Saucedo-García et al. (2014) encontraron predominante en hojas de cafetos de México a: *Colletotrichum gloeosporioides* y *Glomerella cingulata* y *Xilaria spp.*

Recientemente llevamos a cabo un proyecto experimental para aislar y caracterizar, en forma preliminar, a hongos hiperparásitos en plantaciones de café. En esta comunicación presentamos en forma gráfica una selección de los resultados obtenidos y expresamos opinión sobre los mismos.

Se realizaron viajes de recolección a diferentes zonas productoras de café los cuales permitieron observar por un lado, la extensión de la infección de roya en el país, y por el otro, la elevada frecuencia de posibles hongos hiperparásitos, Gráfica 3. Por lo tanto fue posible obtener muestras de las hojas con la presencia de ambos hongos, conservarlas en bolsa de plástico y trasladarlas al laboratorio.² En total se registraron 252 muestras provenientes de seis departamentos cafetaleros, Atitlán, San Marcos, Huehuetenango, Quiché, Alta Verapaz y Chiquimula. Se aislaron³ 41 cepas de posibles hongos hiperparásitos, los cuales se dividieron en dos grupos de acuerdo a su morfología de crecimiento en superficie. Los hongos de uno de los grupos mostraron un crecimiento filamentosos de color blanco. En el otro el micelio adquirió tonalidades oscuras predominando el verde en diferentes matices, Gráfica 4. Es probable que en el primer grupo predomine el *Lecanicillium lecanii*; mientras que en el segundo grupo sean diferentes especies de *Trichoderma*. De las muestras de Alta Verapaz se logró la mayor cantidad de aislados.

Aislados seleccionados fueron crecidos en el laboratorio en frascos agitados en un medio optimizado,⁴ Gráfica 5.

Se realizaron pruebas *in vitro* en cajas de Petri conteniendo agar PDA con el objeto de ilustrar la actividad biológica del aislado sobre la roya. Se procedió en la siguiente manera: Se colocó el micelio del hongo hiperparásito en perlititas o pequeñas esferas de alginato de sodio. Para esto se tomaron 5 mL de la suspensión del hongo crecido en el frasco agitado y se agregaron a una solución de alginato de sodio al 1.5 %. Por aparte se prepararon 20 mL de una solución de cloruro de calcio al 1.5 %. Por medio de una jeringa de 5 mL se adicionaron gotas de la suspensión del hongo en alginato de sodio a la solución de cloruro de calcio

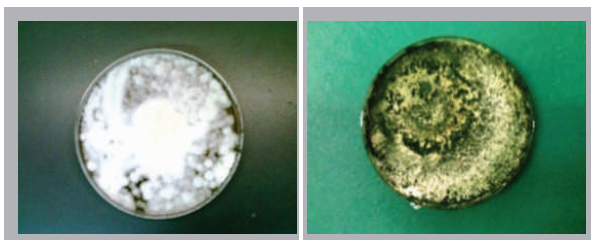
² Los viajes de recolección fueron realizados por el MSc. Emerson Herrera

³ El aislamiento lo llevó a cabo el técnico Sra. Ofelia Paniagua

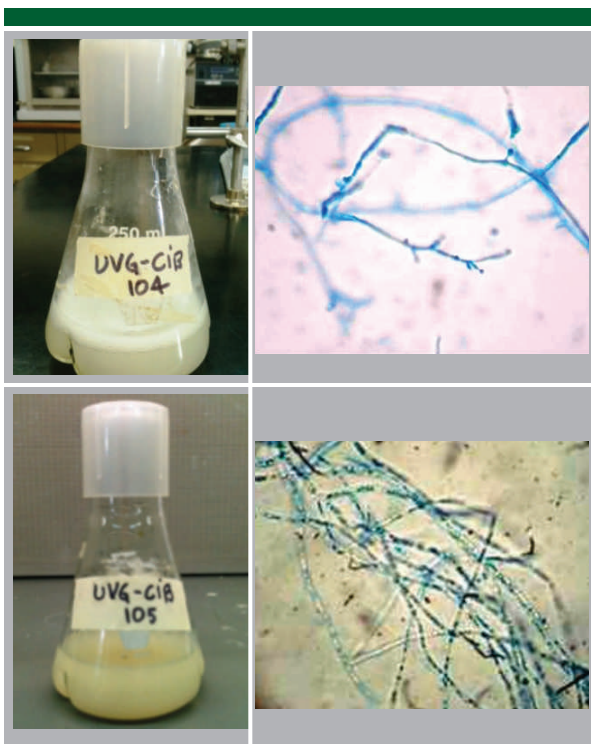
⁴ El crecimiento en frascos agitados fue llevado a cabo por el MSc. Roberto de León y el técnico Sr. Carlos Arias



Gráfica 3. Presencia de hiperparásitos en hojas de café infectadas por roya (Fotos tomadas por el MSc. Emerson Herrera)



Gráfica 4. Crecimiento de hiperparásitos de los dos grupos en superficie de agar (Fotos tomadas por el técnico Sra. Ofelia Paniagua)

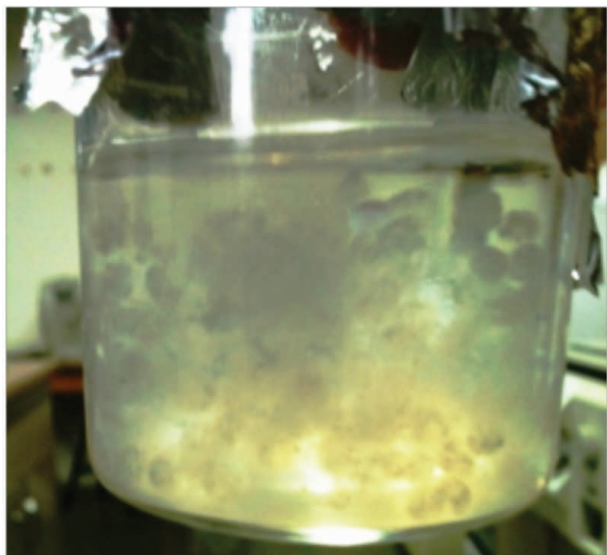


Gráfica 5. Apreciación del crecimiento del micelio de dos hongos hiperparásitos en frasco agitado y observación microscópica del micelio. Aislado del grupo de micelio blanco (UVG-CIB 104). Aislado del grupo de micelio con color verde oscuro (UVG-CIB 105)

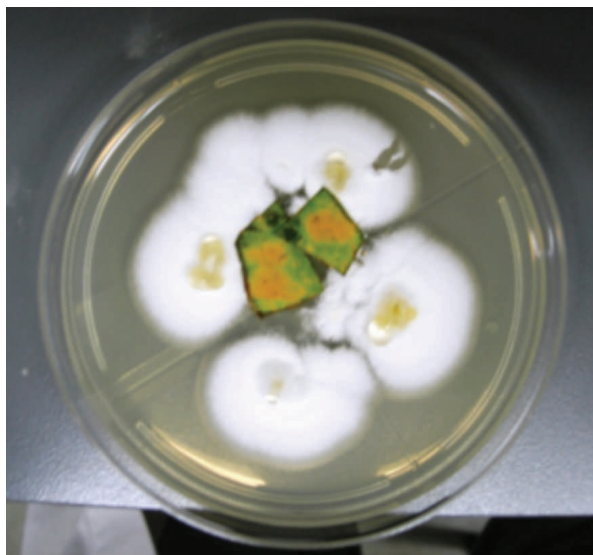
en un recipiente de vidrio colocado sobre una mesa giratoria (*Roto Mix Type 50800 Barnsted Thermolyne*). Al terminar se guardó el recipiente con las perlititas a 10 °C por 24 h, Gráfica 6. Luego se separó el líquido y las perlititas se lavaron tres veces con agua destilada. Se adicionaron perlititas cargadas con el hongo hiperparásito sobre la superficie de PDA en la caja de Petri formando un círculo cerca del centro de la caja. Las cajas se sellaron y se dejaron a temperatura ambiente hasta que el hiperparásito salió de las perlititas y empezó a crecer sobre el PDA. Por aparte se obtuvo una hoja de café con infección de roya. Con tijeras estériles se cortó alrededor de la pústula. Se manipuló con una pinza estéril y con un hisopo mojado en etanol al 70 % se frotó la parte posterior de la hoja con el objeto de minimizar la población microbiana natural existente en la hoja. El segmento de la hoja se colocó en el centro de la superficie de PDA, Gráfica 7. Se dejaron las cajas de Petri selladas a temperatura ambiente hasta que el hongo hiperparásito creciera en la hoja de café y sobre la pústula de roya. Luego las lesiones se observaron con un estereoscopio (*Premiere*), Gráfica 8.

Todos los aislados ensayados mostraron una invasión agresiva de la pústula de roya y las observaciones estereoscópicas confirmaron crecimiento sobre las esporas de la roya. Sin embargo hubo algunas diferencias entre los aislados en su forma de invadir la roya, lo que sugiere diversos posibles mecanismos de parasitismo.

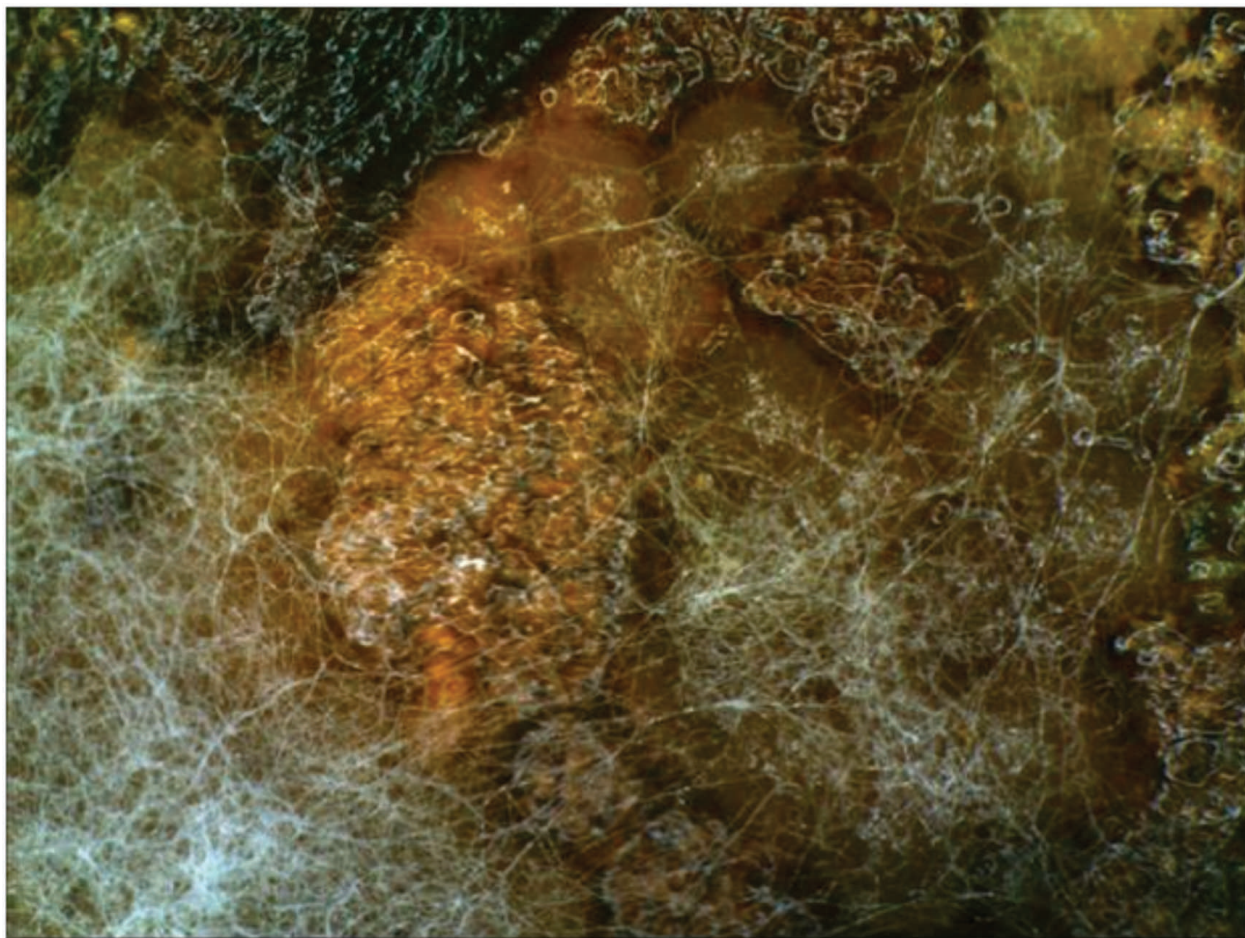
Desde el punto de vista científico es necesario llevar a cabo la caracterización molecular que permitan identificar por género a los 41 aislados. Por otro lado en la parte práctica es conveniente realizar pruebas en invernadero de efectividad *in vivo*.



Gráfica 6. Perlitas conteniendo el micelio del hongo hiperparásito en suspensión en la solución de cloruro de calcio.



Gráfica 7. Caja de Petri con agar mostrando en el centro los segmentos de la hoja de café infectados por roya, rodeados de cuatro núcleos de perlitas de alginato de donde creció el hongo hiperparásito como un micelio blanco.



Gráfica 8. Acercamiento de la superficie de la pústula de roya sobre la hoja que muestra el crecimiento del micelio blanco alrededor y sobre la roya.

Agradecimiento

Deseamos agradecer el apoyo prestado de personeros de la Federación de Cooperativas de Café de Guatemala, FEDECOCAGUA para concretar el plan de visitas a las plantaciones de café. La realización de este trabajo ha sido posible gracias al apoyo financiero parcial dentro del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología -FONACYT- del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología -CONCYT- administrado por la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología -SENACYT- proyecto FODECYT 031-2013 "Búsqueda, aislamiento y evaluación in vitro de hongos hiperparásitos a la roya del café *Hemileia vastatrix* Ber & Br."

Bibliografía

- Alarcón R., Carrión G. (1994) *Uso de Verticillium lecanii en cafetales como control biológico de la roya del café* Fitopatología (Perú) **29**: 82-85.
- Avelino J., Cristancho M., Georgiou S., Imbach P., Aguilar L., Bomemann G., Läderach P., Anzueto F., Hruska A.J., Morales C. (2015) *The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008-2013): impacts, plausible causes and proposed solutions* Food Security **7** (2): 303-321
- Carrión G. (1988) *Estudio sobre el control biológico de la roya del café mediante Verticillium lecanii* Micología Neotropical Aplicada **1**: 79-86.
- Carrión G., Ruiz-Belin F. (1988) *Inoculación en el laboratorio de Verticillium lecanii sobre la roya del café (Hemileia vastatrix)* Revista Mexicana de Micología **4**: 317-321.
- Carrión G., Romero A., Rico-Gray V. (1999) *Use of Verticillium lecanii as biocontrol agent against bean rust (Uromyces appendiculatus)* Fitopatología **34**: 214-219.
- Carrión G., Rico-Gray V. (2002) *Mycoparasites on the coffee rust in Mexico* Fungal Diversity, Chaing Mai **11**: 49-60.
- de Arriola M.C., Chet I., Rolz C. (1998) *Hongos que atacan la roya del café: un breve comentario* Revista de la Universidad del Valle de Guatemala, Numero 8, 2-4.
- Eskes A., Mendes M., Robbs C. (1991) *Laboratory and field studies on parasitism of Hemileia vastatrix with Verticillium lecanii and V. leptobactrum* Café Cacao Thé **35**, 275-282.
- Gouveia M.M.C., Ribeiro A., Varzea V.M.P., Rodriguez Jr C.J. (2005) *Genetic diversity in Hemileia vastatrix based on RAPD markers* Mycologia **97**: 396-404.
- Haddad, F., Maffia L.A., Mizubuti E.S.G., Teixeira H. (2009) *Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil* Biological Control **49**: 114-119.
- James T.Y., Marino J.A., Perfecto I., Vandermeer J. (2016) *Identification of putative coffee rust mycoparasites using single molecule DNA 2 sequencing of infected pustules* Appl. Environ. Microbiol. **82**: 631-639.
- Kushalappa A.C., Eskes A.B. (1989) *Advances in coffee rust research* Ann. Rev. Phytopathol. **27**: 503-531.
- Leguizamón J., Vélez P., Gonzalez A. (1989) *Efecto de extractos metabólicos de Verticillium lecanii sobre Hemileia vastatrix* Cenicafe **40** (2):31-39.
- McCain J.W., Hennen J.F. (1984) *Development of the uredinial thallus and sorus in the orange coffee rust fungus, Hemileia vastatrix* Phytopathol. **74**: 714-721.
- Rivas S., Leguizamón J., Ponce C. (1996) *Estudio histológico, anatómico y morfológico de Verticillium lecanii y Talaromyces wortmannii con Hemileia vastatrix* Cenicafe **47** (1): 16-31.

- Saucedo-García A., Anaya A.L., Espinosa-García F.J. González M.C. (2014) *Diversity and Communities of Foliar Endophytic Fungi from Different Agroecosystems of Coffea arabica L. in Two Regions of Veracruz, Mexico* PLoS ONE **9** (6): e98454.
- Shiomi H.F., Silva H.S.A., de Melo I.S., Nunes F.V., Bettiol W. (2006) *Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust* Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.) **63** (1): 32-39.
- Silva H.S.A., Tozzi J.P.L., Terrasan C.R.F., Bettiol W. (2012) *Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust* Biological Control **63**: 62-67.
- Vélez P., Rosillo A.G. (1995) *Evaluación del antagonismo del hongo Verticillium lecanii, sobre Hemileia vastatrix, en condiciones de invernadero y de campo* Cenicafe **46** (1): 45-55.
- Vega F.E., Simpkins A., Aime M.C., Posada F., Peterson S.W., Rehner S.A., Infante F., Castillo A., Arnold A.E. (2010) *Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawaii, Mexico and Puerto Rico* Fungal Ecology **3** (3): 122-138.
- Waller J.M. (1985) *Control of coffee diseases* In: Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage, Clifford M.N., Wilson K.C. (eds) Chapter 9, pp.219-229. AVI Publishing.