

HONGOS QUE ATACAN LA ROYA DEL CAFE: UN BREVE COMENTARIO*

María del Carmen de Arriola**, Ilan Chet*** y Carlos Rölz
Instituto de Investigaciones

INTRODUCCION

Los hongos son el grupo de microorganismos más numeroso en el planeta, estimándose en forma conservadora que existen 1.5 millones de especies, de las cuales únicamente se conocen menos de 100,000 (Hawksworth, 1991). Aunque los hongos más conocidos son macroscópicos, como los champiñones comestibles, la mayoría son organismos microscópicos que se reproducen por medio de esporas. Al germinar, las esporas dan origen a diminutos filamentos llamados hifas, que en conjunto se conocen como micelio, una etapa de crecimiento previa a la formación de nuevas esporas. Todos los hongos carecen de clorofila y por lo tanto no pueden fotosintetizar su propio alimento. Esto implica que deben obtener sus nutrientes del sustrato en que crecen, sea de manera saprófita sobre materia orgánica muerta, o parasítica sobre otros seres vivos. De las especies de hongos conocidas, apenas unas 50 son parásitos en humanos, pero más de 8,000 atacan y causan enfermedades en plantas (Agrios, 1988), lo cual explica su importancia agrícola. Con relativamente poca frecuencia se encuentran hongos hiperparásitos, es decir que atacan agresivamente a otro hongo, y constituyen un agente de control biológico del hongo parásito. En este estudio se presentan experimentos realizados con varios hongos hiperparásitos sobre la roya del café, y se analiza su potencial como agentes de control biológico.

La enfermedad

La roya del café inducida por el hongo *Hemileia vastatrix* es una de las enfermedades específicas de las diferentes variedades de la planta de café (*Coffea arabica*; Rubiaceae) (Waller, 1985), siendo considerada por algunos investigadores como una de las enfermedades más serias de este cultivo (Wellman, 1972; Thurston, 1984; Agrios, 1988). Se considera que se originó asociada al café silvestre en Etiopía, siendo reportada su presencia en café

cultivado en Sri Lanka en 1869. Fue detectada en el continente americano en 1970 en plantaciones en Brazil (Kushalappa & Eskes, 1989). Desde entonces se ha extendido al resto de países latinoamericanos productores de café, detectándose en Guatemala en diciembre de 1980 (Schieber & Zentmyer, 1984). La infección ocurre en la cara inferior de las hojas, desarrollándose primero 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. El proceso de la infección consiste en la penetración de la spora a través de la estoma, colonización, esporulación y diseminación 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 período de 5 meses, estimándose que cada lesión puede producir de 300 a 400,000 uredosporas (McCain & Hennen, 1984). La enfermedad 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 stress, disminuyen la productividad de la cosecha (Waller, 1985).

El control de la enfermedad

El control químico consiste en aspersiones de fungicidas durante la estación de lluvias. Fungicidas de registro comercial a base de cobre se emplean preferentemente en dosis de 3-5 kg/ha, en intervalos de 4-6 semanas (Fulton, 1984; Waller, 1985). También

*El presente trabajo fue realizado en los años 80 como un proyecto entre The Hebrew University of Jerusalem y el Instituto Centro Americano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI) dentro del Programa Cooperativo Development Research (CDR) de la USAID. Los resultados completos de la investigación han quedado inéditos, principalmente por los problemas de dirección y política centroamericanas en materia de ciencia y tecnología que fueron la causa principal del cierre reciente de la institución regional centroamericana. Este breve informe persigue, aunque sea en forma parcial, corregir esta grave deficiencia. El material microbiológico recolectado durante el desarrollo del proyecto (incluyendo bacterias de la superficie de las hojas que mostraron también una actividad hiperparásita contra la roya), y aquel que se aisló y purificó (incluyendo cultivos puros de los cuatro hiperparásitos), se ha perdido.

** Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

*** Faculty of Agriculture, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot

se han combinado con este tratamiento algunos fungicidas sistémicos (Javed, 1984) entre los que sobresale el *triadimefon* aplicado una o dos veces por cosecha (Fulton, 1984). Con esta metodología se mantiene un nivel bajo de infección en el rango de un 15-20 % del control (sin tratamiento químico). Se ha informado que el empleo continuado de este programa de control ha sido causa de algunos efectos adversos, por ejemplo, apariciones bruscas y masivas del minador de hoja (*Leucoptera coffeella*; Insecta; Lepidoptera) y la acumulación de cobre en los suelos de las plantaciones cuyos efectos a largo plazo se desconocen (Fulton, 1984). Asimismo, a juicio de los autores, no existe documentación al respecto de una acumulación de cobre residual en subproductos del café como la pulpa, que de existir provocaría una contaminación de aguas superficiales.

También se encuentran programas activos de desarrollo de variedades resistentes a las diferentes razas del hongo (Rodrigues, 1984). La atención se ha concentrado en la selección de poblaciones de variedades híbridas de café interespecíficas, como el Catimor e Icatú, desarrollados en Colombia y Brazil (Kushalappa y Eskes, 1984). Existen también actividades de investigación básica para entender la interacción entre el hongo y la planta previo y durante la infección, con el objetivo de buscar los compuestos químicos de defensa natural que puedan existir (Morales, 1984).

Los enemigos naturales más importantes de la roya hasta ahora reportados son todos hongos hiperparásitos como *Verticillium lecanii* (antes conocido como *V. hemileiae*), *V. leptobactrum*, *V. psalliotae*, *Cladosporium hemileiae* y *Paranectria hemileiae* (Kushalappa & Eskes, 1989). De hecho, bajo las condiciones adecuadas de humedad es muy común encontrar *V. lecanii* en las muestras de roya.

El objetivo de este trabajo es informar del aislamiento de cuatro hongos hiperparásitos de la roya del café prevalentes en Guatemala y de su efectividad en reducir la infección de roya en experimentos controlados a nivel de invernadero.

METODOLOGIA

La recolección de muestras se hizo con la asesoría de la Comisión de Roya que funcionó en el país durante los años 80. Se escogieron 22 fincas situadas en diferentes ecosistemas y altitudes sobre el nivel del mar en donde no se estuviese aplicando tratamiento alguno para controlar la roya y que tuvieran focos de infección asegurados. Las muestras recolectadas consistieron en hojas con infección reciente y con infección tardía, según apreciación vi-

sual de los puntos de infección. Se recolectaron también hojas con roya en las cuales algunas lesiones mostraban cierto grado de hiperparasitismo (invasión generalmente de color blanco grisáceo). Finalmente, se recolectaron hojas sin ninguna lesión aparente.

Se seleccionaron al azar hojas con infección reciente y se obtuvieron esporas directamente de las lesiones. Las esporas se guardaron en tubos de vidrio con rosca almacenados a 10°C, y su viabilidad se confirmó con ensayos de infección de hojas de café *in vitro*. Los ensayos de infección se llevaron a cabo de la manera siguiente: la cara inferior de las hojas (provenientes del segundo y tercer par de hojas de la planta) se inoculó con 4-8 gotas de una suspensión de esporas con una concentración aproximada de 0.7 mg peso seco/ml. Nueve o diez hojas infectadas se colocaron en cajas circulares de plástico, sobre un fondo de espuma de poliuretano de aproximadamente 0.5 cm de espesor. Las cajas con las hojas se cubrieron con polietileno asegurado con una banda de hule y se almacenaron a temperatura ambiente. Cada día se abrían las cajas y se humedecían bajo una fina aspersión de agua destilada. La metodología se perfeccionó de manera de lograr infección en más del 99% de las aplicaciones. De las lesiones se recuperaron esporas para los ensayos posteriores. Dicha metodología no se llevó a cabo en forma estéril, ni tampoco se pretendió separar a la roya en sus diferentes razas. Sin embargo, permitió un constante suministro de uredosporas para la experimentación.

En aquellas hojas en donde un hiperparasitismo era obvio se obtuvieron muestras del micelio o estructura filamentosamente fácilmente visible, prevalente en las lesiones. Estas fueron transferidas a cajas de Petri con PDA (medio de cultivo) e incubadas a 30°C. Las cajas que mostraron a la vista crecimiento de un micelio homogéneo se volvieron a sembrar. Dicho procedimiento se repitió varias veces, con el objeto de buscar un aislado puro, aunque el mismo no lo garantiza.

Hojas sin lesión aparente fueron cortadas en pequeños pedazos y suspendidas en agua estéril en frascos erlenmeyer conteniendo esferas de vidrio estériles. La suspensión se agitó por una hora a temperatura ambiente. Se dejaron sedimentar y del líquido sobrenadante se tomaron muestras, las cuales diluidas apropiadamente se sembraron en cajas de Petri conteniendo medios apropiados (MRB y TSM) para el crecimiento de hongos (Elad et al., 1981). Las cajas con un micelio crecido homogéneo fueron traspasadas como anteriormente se indicó.

Los aislados fúngicos se crecieron a temperatura ambiente en medio sólido, empleando TSM en porciones inclinadas adentro de un frasco de vidrio de 1 l. Las esporas producidas en la superficie

fueron recogidas con 40 ml de agua destilada y la suspensión resultante fue utilizada en los ensayos de hiperparasitismo descritos a continuación.

Las hojas previamente infectadas *in vitro* mostrando lesiones de roya tanto iniciales como desarrolladas, recibieron en su cara inferior suficiente suspensión de esporas de los hiperparásitos, de manera que mojaran las lesiones. Hojas sin ninguna lesión aparente también recibieron la suspensión de esporas de los hiperparásitos. Un lote de éstas últimas sirvió de control. El estado de las hojas y de las lesiones de roya en las hojas, se revisaron diariamente por un período de 3-4 semanas. Esta metodología permitió observar el comportamiento de un número apreciable de aislados de hongos hiperparásitos sobre la roya, cuantificando directamente alguno de los tres efectos siguientes: a) la inhibición del inicio de la infección en la hoja, b) la inhibición de la esporulación de la roya en una lesión en pleno desarrollo y c) un ataque agresivo en lesiones totalmente desarrolladas.

Se seleccionaron aquellos aislados que mostraron alguna actividad positiva, según los criterios anteriores, de manera que pudieran posteriormente identificarse, y su actividad fue comprobada en el ensayo de invernadero siguiente.

La cara inferior del segundo y tercer par de hojas de plantas de café jóvenes, proporcionadas por la Comisión de Roya, se inocularon con 4-8 gotas de una suspensión de uredosporas con una concentración aproximada de 0.7 mg peso seco/ml. Las hojas inoculadas se humedecieron con una fina aspersión de agua. Luego, las plantas se almacenaron por 48 horas en un cuarto sin luz, mantenido a 22-23°C con 85-90% de humedad relativa. Posteriormente, fueron transferidas a un invernadero e irrigadas diariamente por 2-3 horas.

La metodología se perfeccionó y se logró una infección en más del 94 % de las aplicaciones. Luego de un período aproximado de 50 a 60 días, cuando las lesiones de roya estaban desarrolladas, se aplicaron por aspersión directa suspensiones de esporas de los hiperparásitos seleccionados e identificados. Las plantas fueron evaluadas cada semana por un período de cuatro semanas. La observación visual estimó la cantidad de lesiones en las hojas, expresándose el resultado como porcentaje del inicial, es decir, a tiempo cero.

RESULTADOS

Ningún aislado de los 308 hongos filamentosos anteriores previno la infección por roya de una manera significativa. Esta conclusión se obtuvo directamente de resultados de los ensayos en donde

hojas tratadas previamente con cada uno de los 308 aislados se infectaron con esporas de roya y se observó el desarrollo de la enfermedad. Al comparar el grado de infección de roya con hojas que no habían sido tratadas con ninguno de los 308 hongos filamentosos, no hubo diferencias significativas. Es decir, ninguno de los hongos filamentosos provocó algún tipo de reacción química o bioquímica en la hoja, que luego la volviera más resistente cuando se pusiera en contacto con la roya.

Del total, sólo cuatro hongos morfológicamente distintos mostraron actividad sobre las lesiones de roya desarrolladas. Los cuatro hongos fueron identificados como *Aphanocladium meliolar*, *Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium leptobactrum* y *Verticillium* sp. Las identificaciones fueron hechas por Dr. William Gams, Central Bureau voor Schimmelcultuur, Barn, Holanda.

La actividad de los cuatro aislados para reducir la cantidad de lesiones en las hojas se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Cantidad de lesiones en las hojas, en el tiempo especificado, estimadas por una observación visual (resultados expresados como % de la cantidad de lesiones cuantificadas al inicio del experimento).

Hiperparásito	1a. semana	2a. semana	3a. semana	4a. semana
Control	100	93	78	71
<i>A. meliolar</i>	100	51	24	21
<i>P. lilacinus</i>	100	51	31	23
<i>V. leptobactrum</i>	95	100	48	16
<i>Verticillium</i> sp.	100	93	53	73

La reducción de la infección mostrada por tres de los hongos hiperparásitos fue diferente estadísticamente a la reducción observada en las plantas control, de acuerdo con un análisis de variancia de todos los datos y la aplicación del test de Tukey. Este resultado analítico se observa directamente en el cuadro. Los tres hiperparásitos que redujeron el grado de infección hasta cifras de un 16-23% del grado de infección original fueron *A. meliolar*, *P. lilacinus* y *V. leptobactrum*. El patrón con el tiempo de los dos primeros hongos es muy similar y diferente al mostrado por *V. leptobactrum*. En el control, sin embargo, hubo un descenso causado por razones desconocidas, cuya magnitud es similar a la reducción observada en las plantas inoculadas con *Verticillium* sp.

La acción de los hiperparásitos se observó empleando SEM (microscopía electrónica de registro). En las Figuras 1 y 2 se ilustra parte del virtual ataque que las hifas o filamentos individuales de *A. meliloe* y de *V. leptobactrum* ejercen sobre el uredocuerpo de la roya presente en una estoma de la hoja de café.

DISCUSION

Los experimentos descritos han probado la existencia de un control biológico de la roya de café en Guatemala a través de la acción de hongos

hiperparásitos. Por vez primera se informa de dos hiperparásitos de *H. vastatrix*: los hongos filamentosos *A. meliloe* y *P. lilacinus*. Puede ser que el comportamiento de los hiperparásitos en las plantaciones se muestren diferentes a los encontrados en los experimentos en invernadero, aunque en datos preliminares (pruebas sin réplicas) de ensayos efectuados en la zona de Patulul, se comprobó la eficacia de los cuatro hiperparásitos aislados para reducir las lesiones de roya. El promedio de reducción fue de 32% de valor original de infección por *H. vastatrix*.

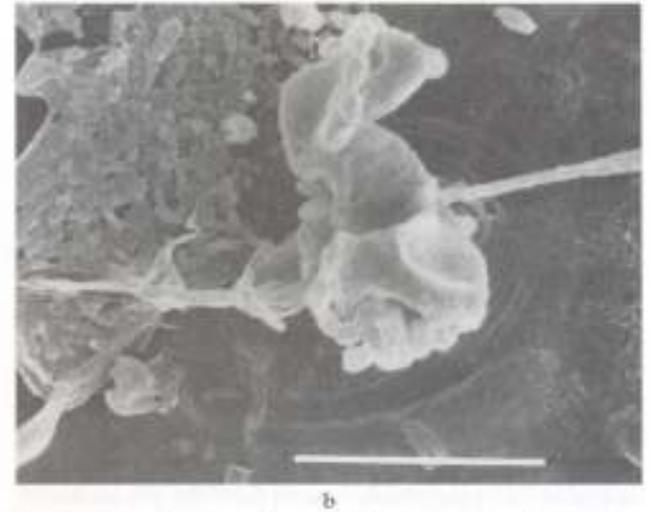


Figura 1. El "abrazo mortal" de *A. meliloe* al uredocuerpo de *H. vastatrix* localizado en la estoma de una hoja de café. a. El uredocuerpo ha colapsado, se observan todavía uredosporas en la superficie. Las hifas del hiperparásito se muestran vigorosas y parecen introducirse en el uredocuerpo. b. El colapso del uredocuerpo es completo, a la izquierda se observan abundantes esporas del hiperparásito, e hifas ramificadas que llegan hasta el uredocuerpo. Escala de la barra=20µm

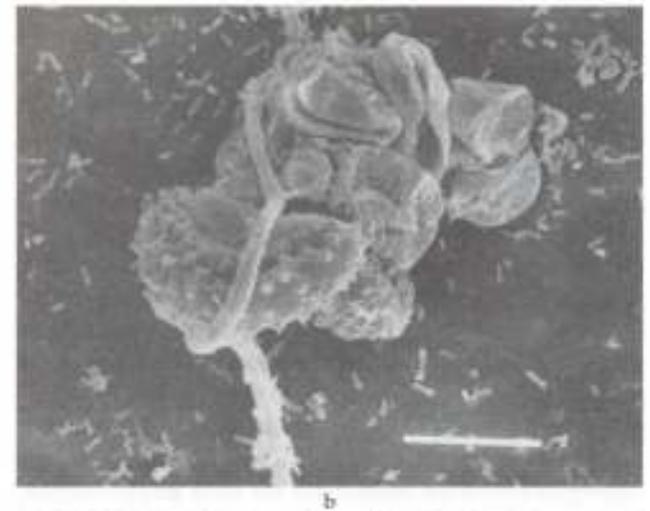
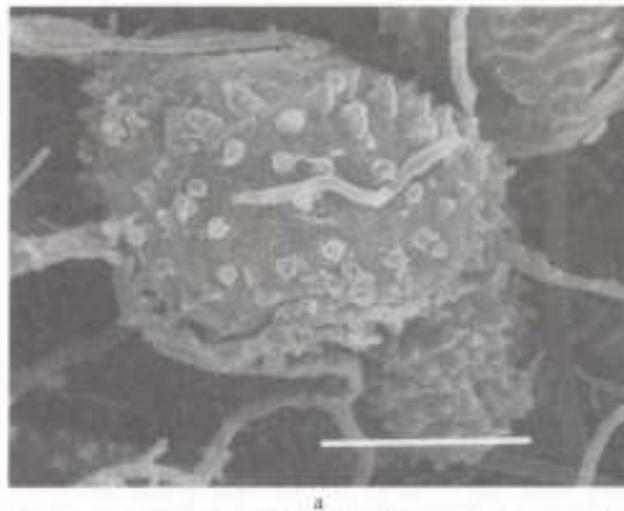


Figura 2. El "abrazo mortal" de *V. leptobactrum* al uredocuerpo de *H. vastatrix* localizado en la estoma de una hoja de café. a. Se muestra el inicio del colapso del uredocuerpo, el cual contiene en su superficie apreciables uredosporas. Las hifas del hiperparásito se acomodan en varios puntos de la superficie del uredocuerpo, al parecer, penetrándolo. b. El colapso del uredocuerpo es completo. Escala de la barra=20µm

No es de extrañar que se hayan encontrado hiperparásitos de la roya en Guatemala. De hecho, el fenómeno del hiperparasitismo está generalizado en muchos ecosistemas, ocurriendo tanto en las hojas y los tallos (Andrews, 1992) como en las raíces (Adams, 1990) de las plantas. El hiperparasitismo puede explicarse a través de una batería de mecanismos entre los que están: a) competencia por nutrientes esenciales, b) producción de antibióticos, c) producción de enzimas que destruyen la pared celular y d) inducción de resistencia en la planta (Baker, 1989; Goldman et al., 1994). Es posible que en un caso dado todos estos mecanismos estén presentes. En el ataque de la roya por los cuatro hiperparásitos aislados no se conoce con certeza cuáles de ellos estuvieron activos. Los resultados preliminares para comprobar la producción de enzimas que destruyen la pared celular por las cuatro cepas no fueron concluyentes. Sin embargo, podría ser el mecanismo prevalente, no sólo por lo observado a través del SEM que lo sugiere, sino porque se conoce desde hace bastante tiempo que cepas de *Verticillium* son productoras activas de este tipo de enzimas (Acha et al. 1965).

¿Cuán realista es pensar que en Guatemala pudiera controlarse la roya sólo con los hiperparásitos naturales? Para contestar esta pregunta es necesario investigar el comportamiento de los mismos bajo toda la diversidad de condiciones que se encuentran en la zona productora de café. ¿Sería factible rociar un cultivo esporulado de un hiperparásito en los cafetales? Por supuesto que es factible, sin embargo se visualizan dos problemas que necesitan de investigaciones futuras. El primero se refiere a la estabilidad del inóculo y el segundo a su preparación física más adecuada. La estabilidad depende tanto del almacenamiento de las esporas producidas como de las condiciones de cultivo en que fueron obtenidas, como ha sido demostrado por Jackson y Schisler (1992) en el caso de *Colletotrichum truncatum*, y por Agosin et al. (1997) para el caso de *Trichoderma harzianum*. Una de las preparaciones físicas que ha demostrado potencial es la incorporación de las esporas en matrices sólidas de almidón sometidas a una extrusión y posteriormente secadas en un lecho fluido (Daigle et al., 1997). Sin embargo, este tipo de preparado es más apropiado para controlar fitopatógenos en las raíces. Una sugerencia interesante (Bhatnagar, 1997) la cual es aplicable en el caso del café, es la mezcla de la suspensión de esporas con los fungicidas de cobre comúnmente empleados, para efectuar la aspersión conjunta. Debe investigarse si la eficacia de los hiperparásitos se mantiene en esta preparación, incluyendo también en la mezcla los fungicidas sistémicos.

LITERATURA CITADA

- Acha, G. I., J. A. Leal and J. R. Villanueva. 1965. Lysis of rust uredospores germ-tube by species of *Verticillium*. *Phytopathol.* 55: 40-42.
- Adams, P. B. 1990. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Ann. Rev. Phytopathol.* 28: 59-72.
- Agosin, E., D. Volpe, G. Muñoz, R. San Martín and A. Crawford. 1997. Effect of culture conditions on spore shelf-life of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *World J. Microbiol. & Biotechnol.* 13: 225-232.
- Agrios, G. N. 1988. *Plant pathology*. pp. 466-468 Academic Press. 803 p.
- Andrews, J. H. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Ann. Rev. Phytopathol.* 30: 603-635.
- Baker, R. 1989. Improved *Trichoderma* spp. for promoting crop productivity. *Trends in Biotechnol.* 7: 34-36.
- Bhatnagar, H. 1997. Integrated use of biocontrol agents with fungicides to control wilt incidence in pigeon-pea. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 564-566.
- Daigle, D. J., W. I. Connick, C. D. Boyette, M. P. Lovisa, K. S. Williams and M. Watson. 1997. Twin-screw extrusion of Pesta-encapsulated biocontrol agents. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13: 671-676.
- Elad, Y., I. Chet and H. Heris. 1981. A selective medium for improving the quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasit.* 9: 59-67.
- Goldman, G. H., C. Hayes and G. E. Harman. 1994. Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *Trends in Biotechnol.* 12: 478-482.
- Fulton, R. H. 1984. Chemical control of coffee leaf rust in Central America. In: *Coffee rust in the Americas*, R.H. Fulton (ed). pp.75-83. The American Phytopathological Society, St.Paul, Minn. Symposium Book No.2. 120 p.
- Hawksworth, D.L. 1991. Biological diversity in fungi, bacteria and viruses. *Mycological Res.* 95: 641-655.
- Jackson, M. A. and D. A. Schisler. 1992. The composition and attributes of *Colletotrichum truncatum* spores are altered by nutritional environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2260-2265.
- Javed, Z. U. R. 1984. Leaf rust in Africa and what it means to American programs. In: *Coffee rust in the Americas*, R.H. Fulton (ed). pp.15-34. The American Phytopathological Society, St.Paul, Minn. Symposium Book No.2. 120 p.
- Kushalappa, A. C. and A. B. Eskes. 1989. Advances in coffee rust research. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27: 503-531.
- McCain, J. W. and J. E. Hensen. 1984. Development of the uredinal thallus and sorus in the orange coffee rust fungus, *Hemileia vastatrix*. *Phytopathol.* 74: 714-721.
- Morales, W. B. C. 1984. Host-parasite interactions in the coffee-*Hemileia vastatrix* system. In: *Coffee rust in the Americas*, R.H. Fulton (ed). pp.59-74. The American Phytopathological Society, St.Paul, Minn. Symposium Book No.2. 120 p.
- Rodrigues, C. J. 1984. Coffee rust races and resistance. In: *Coffee rust in the Americas*, R.H. Fulton (ed). pp.41-58. The American Phytopathological Society, St.Paul, Minn. Symposium Book No.2. 120 p.
- Schieber, E. and G. A. Zentmyer. 1984. Distribution and spread of coffee rust in Latin America. In: *Coffee rust in the Americas*, R.H. Fulton (ed). pp.1-14. The American Phytopathological Society, St.Paul, Minn. Symposium Book No.2. 120 p.
- Thurston, H. D. 1984. *Tropical plant diseases*. pp. 120-129 The American Phytopathological Society, St.Paul, Minn. 420 p.
- Waller, J. M. 1985. Control of coffee diseases. In: *Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage*. M.N. Clifford and K.C. Willson (eds). Chapter 9, pp.219-229. AVI Publishing. 530 p.
- Wellman, F. L. 1972. *Tropical american plant disease*. pp. 491-495 The Scarecrow Press Inc., Metuchen, N.J. 989 p.