

ESTUDIO HISTOLÓGICO, ANATÓMICO Y MORFOLÓGICO DE *Verticillium lecanii* y *Talaromyces wortmannii* con *Hemileia vastatrix*

Sandra Rivas-Zúñiga*, Jairo Leguizamón-Caycedo**, César Ponce-Dávila***

RESUMEN

RIVAS Z., S.C.; LEGUIZAMON C., J.E.; PONCE D., C.A. Estudio histológico, anatómico y morfológico de *Verticillium lecanii* y *Talaromyces wortmannii* con *Hemileia vastatrix*. Cenicafé. 47(1): 16-31. 1996

Mediante observaciones morfológicas y ultraestructurales fue estudiado el estado más susceptible de *Hemileia vastatrix* Berk. y Br., al ataque de *Verticillium lecanii* y *Talaromyces wortmannii*. Se utilizó microscopía electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET) en tratamientos con inoculaciones de los antagonistas en tres tiempos: simultáneamente, 10 y 24 horas después de aplicado *H. vastatrix* al follaje. Las muestras inoculadas con *Hemileia vastatrix* y el antagonista, no presentaron colonización de los tejidos foliares del susceptible (MET); en el tratamiento diez horas después se observó micelio de *H. vastatrix* dentro del mesófilo; el tejido en hojas inoculadas 24 horas después fue colonizado totalmente por *H. vastatrix* intra e intercelularmente, tanto en el parénquima esponjoso como en el de empalizada. No se observó colonización en los haces vasculares. *V. lecanii* penetró la pared de las urediniosporas de *H. vastatrix* (MEB), causando pérdida de espinas y cambios en tamaño y forma. *T. wortmannii* rodeó las urediniosporas maduras y apresorios de *H. vastatrix* rompiendo sus paredes (MEB). La acción de *T. wortmannii* y *V. lecanii* fue evidente sobre urediniosporas maduras, estado más susceptible al parasitismo, con posterior acción parasitaria sobre el apresorio en el caso de *T. wortmannii*.

Palabras claves: Café, *Hemileia vastatrix*, *Verticillium lecanii*, *Talaromyces wortmannii*, roya del cafeto, control biológico, microscopía electrónica.

ABSTRACT

The most susceptible developmental stage of *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. to attack by *Verticillium lecanii* and *Talaromyces wortmannii* was studied morphologically and structurally by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). The treatments were inoculations with antagonist at three times: simultaneously, 10 and 24 hours after application on the leaves with pathogenic isolates. Susceptible tissue colonization (TEM) was absent in the simultaneous inoculation treatment pathogen - antagonist; mycelium of *H. vastatrix* inside the mesophyll was observed in the 10 hours treatment; for the 24 hour treatment the foliar tissue was completely colonized by pathogen both inter and intracellularly, in the spongy parenchime and palisade. Colonization in the vascular bundles was not observed. *V. lecanii* penetrated the urediniospore walls of *H. vastatrix* (SEM) causing spines losses and changes in size and form. *T. wortmannii* surrounded maturing urediniospores and apleria of *H. vastatrix* breaking their walls (SEM). The action of *T. wortmannii* and *V. lecanii* is exerted on mature urediniospores. This is the most susceptible stage to parasitism and to subsequent parasitic action on the apleria by *T. wortmannii*.

Keywords: Coffe, *H. vastatrix*, *V. lecanii*, *T. wortmannii*, biological control, electron microscopy.

* Lic. en Biología. Universidad del Cauca.

** Investigador Principal I. Fitopatología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé, Chinchiná, Caldas, Colombia.

*** Profesor de la Universidad del Cauca, Popayán, Cauca, Colombia.

El hongo *Hemileia vastatrix* Berk. y Br., agente causante de la roya del cafeto pertenece al orden uredinales, uno de los más conocidos hasta el momento, con más de 5000 especies, muchas de ellas de gran importancia económica y con patógenos reconocidos en más de 200 familias de plantas vasculares (2). Las royas son parásitos biotrofos obligados con una estricta especialización por el hospedante. La roya del cafeto es una de las enfermedades más importantes de este cultivo en el mundo, donde son utilizadas comercialmente variedades susceptibles de *Coffea arabica*.

Varios métodos han sido utilizados para el combate de esta enfermedad, entre ellos sobresalen la resistencia genética y el control químico.

La resistencia es un fenómeno general en las plantas (27); su naturaleza puede ser deducida de diferentes orígenes (30). Para el control por resistencia genética en Colombia hasta el presente han sido sembradas cerca de 400.000 hectáreas, con la variedad Colombia, variedad resistente desarrollada en Cenicafé.

Para el control químico de la roya del cafeto han sido empleados con éxito fungicidas sistémicos y protectores; estos químicos inhiben la germinación, crecimiento, multiplicación del patógeno o tienen un efecto letal en él (1). El alto costo de la mano de obra, equipos, fungicidas y el deterioro del ambiente han venido limitando su uso.

En los últimos años ha cobrado un considerable interés científico el estudio de hiperparásitos o microorganismos antagonistas de patógenos de plantas, con el propósito de emplearlos en programas de manejo integrado de enfermedades (1). En el caso particular de la roya del cafeto este método de control aún no ha sido lo suficientemente desarrollado para ser recomendado en campo.

El estudio del micoparasitismo como método de control biológico de enfermedades de plantas ha llamado la atención a numerosos autores (3, 5, 26). Algunos de estos estudios han sido con diferentes especies de royas (7) con las cuales han sido realizadas observaciones de tipo ultraestructural (4). Rosillo (29) encontró que aislamientos de *Verticillium lecanii* y *Tolaromyces wortmannii* presentaron los porcentajes de inhibición más altos en pruebas de antagonismos con extractos metabólicos sobre la germinación de urediniosporas de *H. vastatrix*. Estos extractos causaron en las urediniosporas pérdidas de espinas y de la capacidad de tinción con azul de lactofenol, desintegración y en las que germinaron hubo deformación del tubo germinativo (29, 33). *V. lecanii* ha sido registrado en áreas tropicales y subtropicales, parasitando insectos, royas y mohos de plantas, macrohongos y también vive sobre suelo en forma saprofítica, sobre alimentos o sobre materiales de plantas (13, 10). El hongo *V. lecanii* ataca insectos, ácaros y hongos fitopatógenos de la clase Basidiomycetes que causan las royas en las plantas. En insectos ha sido encontrado afectando especímenes de los órdenes Homóptera, Coleóptera y Lepidóptera (6).

Leguizamón *et al* (19) observaron que el micelio y conidias de 15 días del hiperparásito *V. lecanii*, afectaron la germinación de urediniosporas de *H. vastatrix*, sus períodos de incubación y latencia y la tasa de infección. El cultivo licuado y el extracto metabólico del mismo antagonista afectó la evolución de las lesiones y la germinación de urediniosporas de *H. vastatrix* (8, 9, 33). El efecto fue determinado por la inhibición total de la germinación y algunos cambios morfológicos en las urediniosporas. Las hojas asperjadas con *V. lecanii* mostraron al micelio del hongo formando redes alrededor de las urediniosporas de roya, en el sitio de penetración al estoma (8, 9, 33).

T. wortmannii es considerado como buen controlador puesto que crece rápidamente, pro-

duce gran cantidad de conidias que se dispersan fácilmente y en laboratorio e invernadero causan inhibición en alto porcentaje (29).

Se observó también esporulación de *V. lecanii* en urediniosporas de *H. vastatrix*, mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) y de barrido (MEB) en la asociación de *H. vastatrix* con *V. lecanii*. El estado final de la infección causa una degeneración progresiva de las urediniosporas con el consecuente colapso de toda su estructura (20).

La presente investigación tuvo por finalidad determinar el momento apropiado en el cual los antagonistas *V. lecanii* y *T. wortmannii* deben ser inoculados y conocer cual estado del desarrollo de *H. vastatrix* es más susceptible al ataque. Además, para observar su efecto sobre el desarrollo del hongo y conocer mediante observaciones histológicas el efecto de los dos hiperparásitos sobre los tejidos de la hoja, observando los cambios en la forma y estructura de las urediniosporas del hongo. Estas observaciones permitieron estudiar alternativas de control biológico, en especial el hiperparásito *T. wortmannii* el cual hasta el momento no había sido registrado en la literatura.

MATERIALES Y METODOS

Localización. El presente trabajo se realizó en el Centro Nacional de Investigaciones de Café. Cenicafé, localizado a 5°00' Norte, 75°36' Oeste, con una temperatura media de 21,5°C, una precipitación anual de 2125,2 mm y una altitud de 1310 msnm (1).

La observación y evaluación de los tejidos, así como la toma de placas fotográficas en MET y MEB fueron llevadas a cabo en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad del Cauca y de la Universidad de Antioquia, respectivamente.

Material vegetal. Estuvo constituido por hojas individuales seleccionadas del segundo par superior de plántulas de *Coffea arabica* L. variedad Caturra de 4 meses de edad, sembradas en bolsas de polietileno llenas con suelo y pulpa de café descompuesta en proporción en volumen de 3:1. Las plántulas permanecieron en vivero y no recibieron aplicación de ningún fungicida.

Preparación de cámaras húmedas. En cajas de plástico transparente desinfestadas fueron colocadas esponjas sintéticas previamente esterilizadas en el fondo de la caja, las cuales fueron remojadas en agua destilada estéril formando en la superficie de la esponja una ligera capa de agua (18).

Inóculo. Para prepararlo se recolectaron urediniosporas de roya *H. vastatrix* Berk. y Br. raza XVII ($v_1 v_2 v_3$) de hojas de plantas de café var. Caturra, previamente inoculadas en el laboratorio, mediante raspado directo de las lesiones con cápsulas de gelatina. Las urediniosporas fueron depositadas en un vaso de precipitado con 50 ml de agua destilada y suspendidas mediante agitación en ultrasonido durante 30 segundos. El volumen de agua fue ajustado a 100 ml para conseguir la concentración de 75×10^3 urediniosporas de roya por mililitro de agua y la suspensión se mantuvo en agitación magnética continua, durante el proceso de inoculación con el fin de homogeneizarla (18).

Inoculación por gota. Se colocaron hojas desprendidas de las ramas dentro de cámaras húmedas con la haz en contacto con la esponja y posteriormente se inocularon con una micropipeta, depositando 8 gotas individuales de 5 microlitros de la suspensión en el envés de la hoja, en cada espacio intervenal a lado y lado de la hoja. Luego las hojas permanecieron en cámara de crecimiento a una temperatura promedio de 23°C, humedad a saturación y ausencia de luz durante 24 horas. Posteriormente fueron dejadas en penumbra durante 12 horas a

temperatura ambiente y finalmente en el laboratorio a 23°C y fotoperíodo de 12 horas luz (18).

Producción aséptica de roya. Cuando las hojas presentaron grado 3, según la escala de infección definida por Leguizamón (18), la cual describe el desarrollo de la lesión a través del tiempo, se desinfectaron limpiándolas con un algodón humedecido con agua jabonosa (teepol), y se lavaron con agua destilada. Luego fueron colocadas en cámara de flujo laminar en un vaso de precipitado estéril que contenía hipoclorito de sodio y dispersante (tween 80 art. 822187 Merck) durante 10 minutos y lavadas durante tres veces consecutivas con agua destilada estéril. Por último fueron depositadas en cajas de petri que contenían en el fondo papel filtro humedecido con agua destilada estéril.

Estas permanecieron en cámara de crecimiento a 23°C, con alternancia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, hasta cuando hubo esporulación. Después de obtenido el inóculo puro se inocularon las hojas desinfectadas. La inoculación y la desinfección de hojas fue realizada según el método descrito (18).

Obtención del cultivo licuado de *V. lecanii* y *T. wortmannii*. Las cepas de *V. lecanii* (Cenicafé 157) y *T. wortmannii* (Cenicafé 151), fueron cultivadas en medio sabouraud (SDA) y papa-dextrosa-agar (PDA), respectivamente. Posteriormente fueron transferidas a 100 ml de caldo sabouraud (CS) y caldo papa-dextrosa (CPD) contenido en vasos de precipitado de 250 ml. El cultivo se dejó por un período de 12 a 15 días, con alternancia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a 22°C, y posteriormente se obtuvo asépticamente el cultivo licuado (micelio y conidias) de los hongos (19).

Las hojas se inocularon con roya y con el cultivo licuado de los antagonistas. La inoculación del cultivo licuado de *V. lecanii* y *T. wortmannii* se realizó simultáneamente (tratamien-

to 1), a las diez horas (tratamiento 2), y a las 24 horas de haber inoculado con roya (tratamiento 3), esto con el fin de evaluar germinación y esporulación en las lesiones (la concentración del cultivo fue de 1×10^6 conidias/ml). Las hojas fueron mantenidas inicialmente en cámara húmeda saturada durante 24 horas en condiciones de temperatura y humedad relativa óptimas para el desarrollo de la roya (19).

OBSERVACIÓN MICROSCOPICA. Se emplearon técnicas de microscopía óptica y electrónica con el fin de dar cumplimiento a los objetivos propuestos en el experimento. Estas permitieron observar las rutas de penetración y modos de acción de los antagonistas sobre la roya, así como efecto de los antagonistas sobre los tejidos de la hoja; además se estudió la histología, morfología y anatomía de *H. vastatrix* y de los dos antagonistas.

Microscopía óptica de trasluz (MOT). Se procesaron muestras de hojas inoculadas con roya y asperjadas con cultivo licuado de *V. lecanii* o *T. wortmannii*, según el procedimiento de inclusión en resina "spurr" utilizado para el estudio de tejidos en hojas jóvenes (Tabla 1). En este material fueron realizados cortes semifinos de un espesor entre 0,5µm - 1µm al ultramicrotomo LKB, los cuales fueron teñidos con azul de toluidina y observados a través del microscopio de luz Axiophot. (ZEISS D-7082).

Microscopía electrónica. La ultraestructura y morfología tanto de *H. vastatrix* como de sus antagonistas *V. lecanii* y *T. wortmannii* fue estudiada mediante las técnicas que a continuación se describen:

Microscopía electrónica de Transmisión (MET). Una vez seleccionado el tejido en microscopía óptica se observaron subpirámides para obtener cortes ultrafinos en el ultramicrotomo de un espesor entre 200 a 600 Å; estos cortes fueron teñidos con citrato de plomo y observa-

TABLA 1. Procedimiento "SPURR" para la observación de la ultraestructura de *H. vastatrix*, *V. lecanii* y *T. wortmannii*.

PROCESO	TRATAMIENTO	TIEMPO
FIJACION	Karnoswky	12 horas
LAVADO	Cacodilato buffer	15 minutos
POSTFIJACIÓN	Tetraóxido de Osmio 1%	1 hora
LAVADO	Cacodilato buffer	15 minutos
DESHIDRATACION	Etanol 25-90%	1 hora
	Etanol 100%	15 minutos
	Acetona	30 minutos
IMBIBICION	Resina-acetona	3 horas
	Resina 100%	1 hora
POLIMERIZACIÓN	Resina	48 horas

dos al microscopio electrónico de transmisión de la Universidad del Cauca. (JEOL 1200 EX).

RESULTADOS Y DISCUSION

Microscopía electrónica de barrido (MEB). (Tabla 2) Mediante glutaraldehído al 3% con fosfato buffer 0.1M (Solución Sörensen) a PH=7,2 y a 4°C fueron fijados uredos pústulas de roya inoculados con *V. lecanii* y *T. wortmannii*. Las muestras fijadas se lavaron con fosfato buffer (0,1M), postfijadas en OsO₄, deshidratadas en series ascendentes de alcohol y se secadas bajo CO₂ líquido en unsecador de punto crítico. Las muestras secas fueron cubiertas con oro y observadas al microscopio electrónico de barrido de la Universidad de Antioquia (HITACHI S-510) (20).

Microscopía óptica de trasluz. El tejido foliar del café no fue colonizado por *H. vastatrix* cuando fueron aplicados los tratamientos *V. lecanii* y *T. wortmannii* en forma simultánea con *H. vastatrix* (Figuras 1 y 2). En los tratamientos en los cuales se aplicó el antagonista 10 horas después de haber sido inoculadas las hojas con roya, se observó el patógeno colonizando las células alrededor de la cámara subestomática, y en células del parénquima esponjoso y de empalizada (Figuras 3 y 4). Se encontró además una mayor colonización en los tejidos tratados con *V. lecanii* que en aquellos tratados con *T. wortmannii*.

TABLA 2. Procedimiento para observar la morfología de *H. vastatrix*, *V. lecanii* Y *T. wortmannii*.

PROCESO	TRATAMIENTO	TIEMPO
FIJACION	Glutaraldehído 3%	16 h
LAVADO	Fosfato buffer 0,1M	30 min.
FIJACION	Tetraóxido de osmio 1%	1 h
LAVADO	Fosfato buffer	15 min.
DESHIDRATAACION	Etanol	17 h 40 min.
SECADO	Acetato de amilo	20 min.
CUBRIMIENTO	Oro	4 min.

En las muestras de los tratamientos inoculados 24 horas después de haber sido aplicado el patógeno se observó una total colonización de las células del mesófilo e hifas de *H. vastatrix* dentro y fuera de las ellas, así como también cambios en la posición de los cloroplastos, estos, de la forma centrífuga a la centrípeta (Figuras 5 y 6). Los tejidos vasculares no fueron colonizados (Figura 10).

Matsouka y Vanetti (9) observaron en plantas de café resistentes y susceptibles que hubo

colonización intercelular de *H. vastatrix* alcanzando el tejido de empalizada y que los tejidos vasculares no fueron colonizados. Solamente en la reacción susceptible el ciclo infeccioso fue completo y se presentó la formación de uredinios esporulantes en los estomas.

En los tratamientos 2 y 3 (10 y 24 horas) se observó que el ciclo de infección de *H. vastatrix* ocurrió completamente con presencia de urediniosporas (Figura 7), y formación de haustorios (Figuras 8 y 9). Estas estructuras han

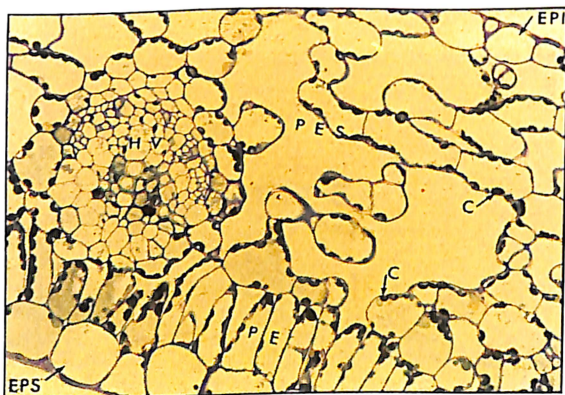


Figura 1. Corte transversal de tejido foliar sano de *Coffea arabica* var. Caturra. No presenta colonización después de la inoculación simultánea de *Hemileia vastatrix* y *Verticillium lecanii*. Epidermis superior (EPS). Epidermis inferior (EPI). Parénquima esponjoso (PES). Parénquima de empalizada (PE). Haz vascular (HV). Cloroplastos (C) en posición centrífuga (40X).

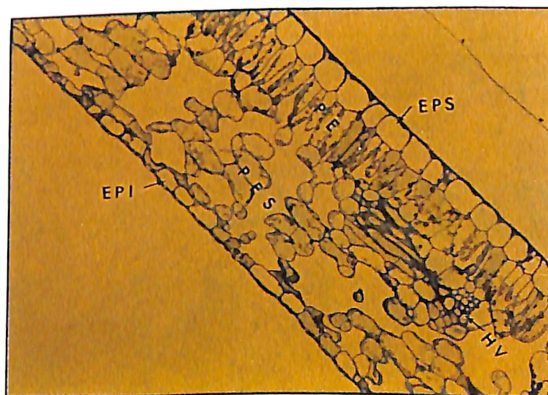


Figura 2. Corte transversal de tejido foliar sano de *Coffea arabica* var. Caturra después de la inoculación simultánea de *Hemileia vastatrix* y *Talaromyces wortmannii*. Obsérvese que el tejido no presenta daño histológico y no hay presencia de estructuras fúngicas. Parénquima esponjoso (PES). Parénquima de empalizada (PE). Epidermis superior (EPS). Epidermis inferior (EPI). Haz vascular (HV). (20X)

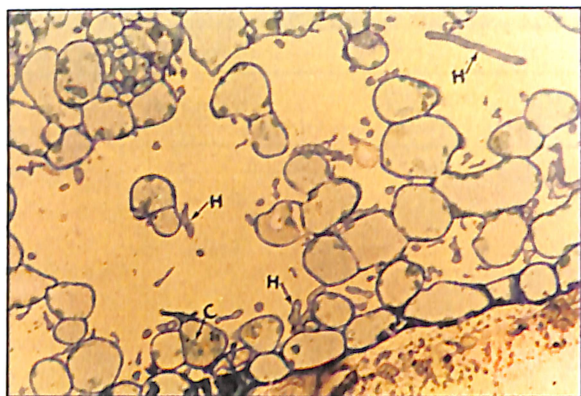


Figura 3. Corte transversal de tejido foliar de *Coffea arabica* var. Caturra inoculación con *Verticillium lecanii*, 10 horas después de haber sido inoculado el tejido con *Hemileia vastatrix*. Obsérvese las hifas (H) de *H. vastatrix* en el parénquima esponjoso (PES), así como también la desorganización a nivel de cloroplastos (C). (40X).

sido estudiadas por Rijo y Sargent (26), quienes describen un haustorio originario de la célula madre, como aquella célula que se diferencia de otras porque sus hifas presentan una pared celular mucho más gruesa y su cuerpo tiene forma de campana. Bushnell (1972) citado por Rodrigues (28), describió un haustorio como un órgano especializado, el cual se forma dentro de la célula hospedante viviente, como una ramificación de una hifa o tallo extracelular (o intracelular), que finaliza su ciclo de vida en la

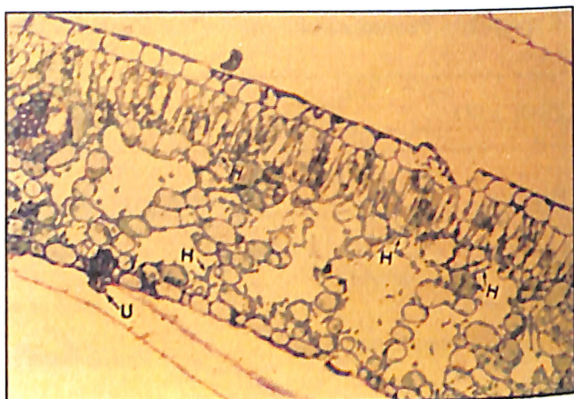


Figura 5. Corte transversal de tejido foliar de *Coffea arabica* var. Caturra. Inoculación con *Verticillium lecanii*, 24h después de haber inoculado con *Hemileia vastatrix*. Se observa colonización del tejido foliar por parte del patógeno *Hemileia vastatrix*. Hifas (H). Uredinio (U). (20X)

célula hospedante y tiene un papel en el intercambio de sustancias entre el hospedante y el hongo.

Las muestras de inoculaciones de *V. lecanii* y *T. wortmannii* sobre hojas sanas de *C. arabica*, se observaron al microscopio óptico de luz, notándose que el tejido foliar no fue afectado (Figura 11). Este trabajo reconfirma lo registrado por Vélez (33), Oliveira (24) y Leal *et al.* (17) quienes aplicaron cultivo licuado de *V. lecanii*

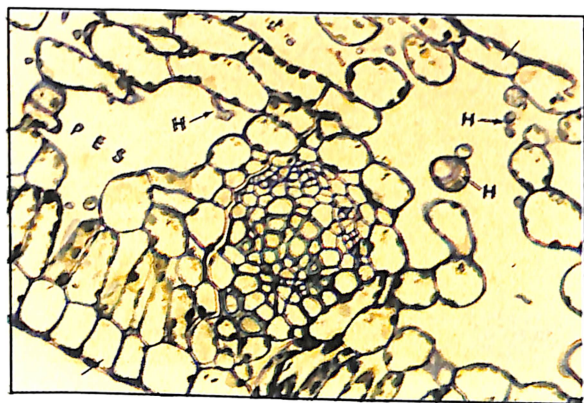


Figura 4. Corte transversal de tejido foliar de *Coffea arabica* var. Caturra. Inoculación con *Talaromyces wortmannii*, 10 horas después de haber sido inoculado el tejido con *Hemileia vastatrix*. Obsérvese las hifas (H) de *Hemileia vastatrix* localizadas inter e intracelularmente en el parénquima esponjoso (PES). (40X)

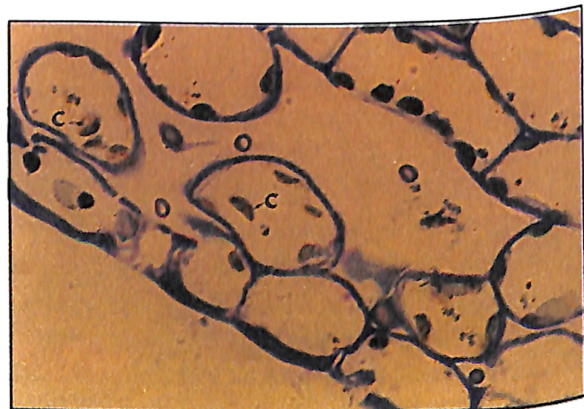


Figura 6. Corte transversal de hojas de *Coffea arabica* L. var. Caturra. inoculadas con *Talaromyces wortmannii*, 24h después de haber inoculado con *Hemileia vastatrix*. Obsérvese la disposición de los cloroplastos (C) en forma irregular (100X).

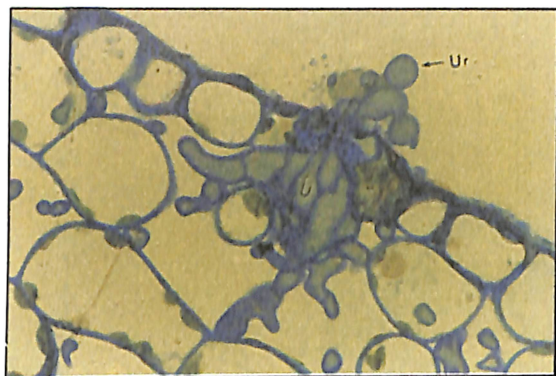


Figura 7. Detalle de uredinio (U) de *Hemileia vastatrix*; urediniosporas (Ur). Corte transversal de tejido foliar de *Coffea arabica* var. Caturra (100X).

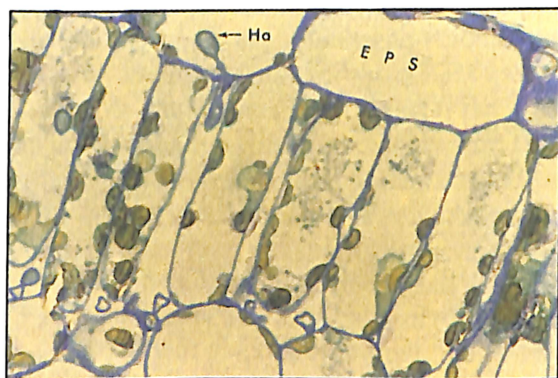


Figura 8. Haustorio (Ha) de *Hemileia vastatrix* en célula de epidermis superior (EPS). Corte transversal de tejido foliar de *Coffea arabica* var. Caturra (100X).

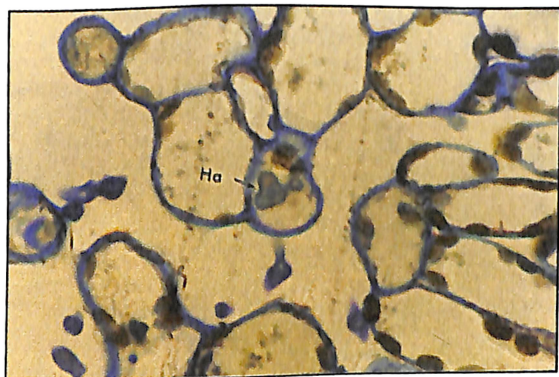


Figura 9. Haustorio (Ha) de *Hemileia vastatrix* en célula del parénquima esponjoso. Corte transversal de tejido foliar de *Coffea arabica* var. Caturra (100X).

sobre hojas de *C. arabica* inoculadas con *H. vastatrix* y no observaron cambios en su anatomía foliar. Los hongos *V. lecanii* y *T. wortmannii* tienen la capacidad de proliferar sólo en las áreas de la hoja que albergan lesiones de roya. Este comportamiento sugiere que los hiperparásitos utilizaron como sustrato el micelio y las urediniosporas de roya (Figuras 12 y 13).

Las hojas sanas asperjadas con el cultivo de *V. lecanii* no mostraron ningún cambio aparente en su morfología en relación con el testigo. Macroscópicamente se apreciaron vestigios del cultivo licuado del hongo que no proliferaron ni

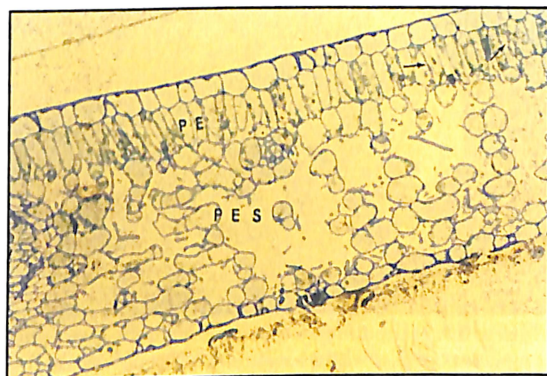


Figura 10. Corte transversal de tejido foliar de *Coffea arabica* var. Caturra. Se observa colonización intercelular de *Hemileia vastatrix* en los tejidos del parénquima de empalizada (PE); tejido vascular no fue afectado (V). Parénquima esponjoso (PES). (20X)

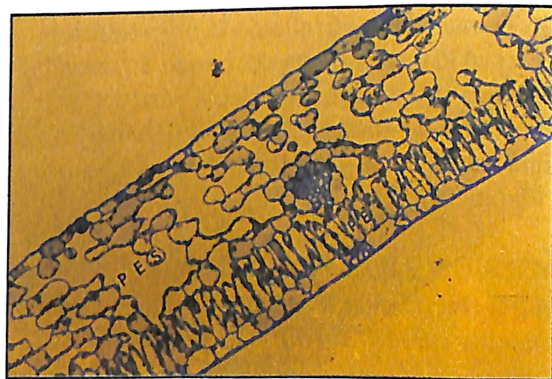


Figura 11. Corte transversal de tejido foliar de *Coffea arabica* var. Caturra inoculada con *Verticillium lecanii*. Nótese que el tejido no presenta ningún daño. Parénquima esponjoso (PES). Parénquima de empalizada (PE). (20X)



Figura 12. Urediniosporas de *Hemileia vastatrix* colonizadas por *Verticillium lecanii*.



Figura 13. Urediniosporas de *Hemileia vastatrix* colonizadas por *Talaromyces wortmannii*, numeradas como 2, 5, 7 y 9.

afectaron la morfología de la hoja en condiciones de humedad (23).

Durante el desarrollo de la investigación se observó la fase perfecta del hongo *T. wortmannii* así como su fase imperfecta perteneciente a *Penicillium kloeckeri* (IMI 360420) cuya fiálide característica presenta abundante conidiación (Figura 14).

MICROSCOPIA ELECTRONICA. Microscopía electrónica de transmisión. Se observó micelio de *H. vastatrix* en los espacios intercelulares y en las células de los parénquimas de empalizada y esponjoso, de los cortes transversales de las hojas correspondientes a los tratamientos 2 y 3 (10 y 24 horas) de aplicado el hiperparásito (Figuras 15 y 16). Este resultado

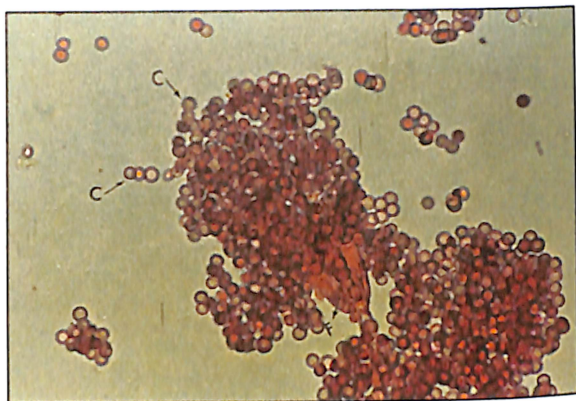


Figura 14. Fiálides de *Penicillium kloeckeri* anamorfo de *Talaromyces wortmannii*. Nótese la abundante conidiación característica del género. Conidia (C). Fiálide (F). Conidióforo (Cn). (40X).

fue también observado por Spencer y Atkey (32) en MET en cortes transversales de hojas de trigo infectadas con *Penicillium recondita*. Las observaciones de la ultraestructura foliar en hojas sanas de café no evidenciaron desarreglos ultraestructurales en los cloroplastos (Figura 17a). Se observaron cloroplastos en proceso de degeneración (desintegración de las membranas celulares y de los tilacoides) por efecto del parasitismo de *H. vastatrix*; también fueron observados en los tratamientos 2 y 3 (Figura 17b). Estos resultados también fueron registrados por Rijo

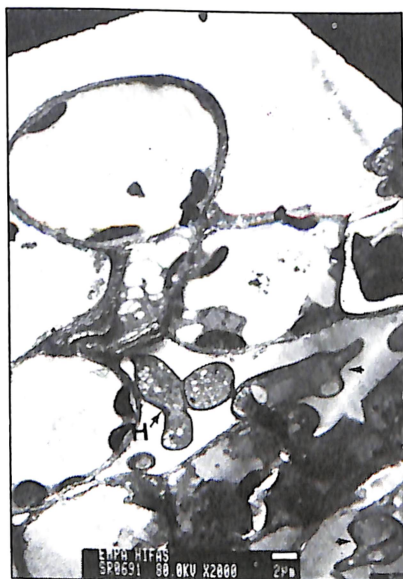


Figura 15. Microfotografía del corte transversal de tejido foliar de *Coffea arabica* var. Caturra. MET. Penetración de hifas (H) de *Hemileia vastatrix* en los tejidos del parénquima de empalizada. (2000X)



Figura 16. Corte transversal de tejido foliar de *Coffea arabica* var. Caturra. MET. Hifas (H) de *Hemileia vastatrix* colonizando parénquima esponjoso (PES). (300 0X)

y Sargent (26). Heat realizó un trabajo sobre la ultraestructura de la roya del frijol y observó que la invasión del hongo en la célula hospedante presentaba desorganización de las membranas del tonoplasto, plasmalema, núcleo, mitocondria, microcuerpos y retículo endoplásmico. Este autor describe que la desintegración de la grana del cloroplasto actúa de manera tardía en comparación con los otros organelos presentes en la célula.

La pared de las hifas de *H. vastatrix* presenta tres capas: interna, media y externa (Figura 18) y algunas hifas presentaron ruptura de sus paredes, esto debido a la acción de los antagonistas *V. lecanii* y *T. wortmannii* (Figura 19). Rijo y Sargent (26); Rijkenberg y Truter (25), observaron que la hifa es intercelular y está compuesta por tres capas de células, la interna es fibrilar, la media es amorfa y la externa es de coloración negra; al parecer presentan propiedades adhesivas (mucílago).

Microscopía electrónica de barrido (MEB).

La observación de uredinios de *H. vastatrix* en el microscopio electrónico de barrido, mostró que las urediniosporas maduras tienen una superficie lisa, y otra con espinas (Figura 20); observaciones de urediniosporas infectadas con *V. lecanii* mostraron una capa de micelio de este hongo cubriendo las urediniosporas maduras, las cuales perdieron sus espinas (Figura. 21)

Hanssler *et al.* (14), investigaron al microscopio de luz la interacción entre *Puccinia graminis* var. *tritici* y *V. lecanii* y encontraron al hiperparásito entre las urediniosporas de la roya, después de 24 horas de inoculación. Observaciones al microscopio electrónico de esta

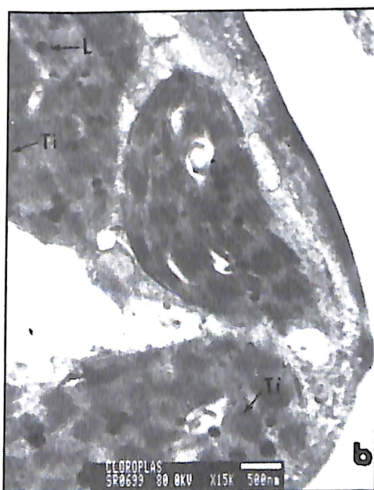


Figura 17. a. Corte de cloroplasto en hoja de *Coffea arabica* var. Caturra no infectado (15000X). b. Corte transversal del cloroplasto en hoja infectada por *Hemileia vastatrix*; se observan los tilacoides desorganizados (Ti). Lípidos (L). MET. (15000X)

Figura 18.
Corte
transversal de
hifa de
Hemileia
vastatrix.
MET.
Se observan
cuerpos
lipídicos (Cl),
aparato de golgi (dictiosomas (D)), ribosomas (R). Capas
de la pared de las hifas: interna (Ci), media (Cm) y
externa (Ce). (12000X)

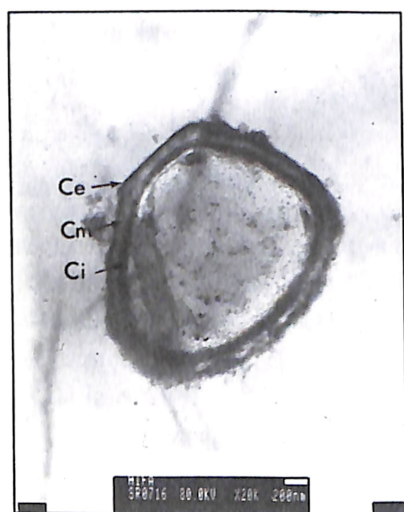
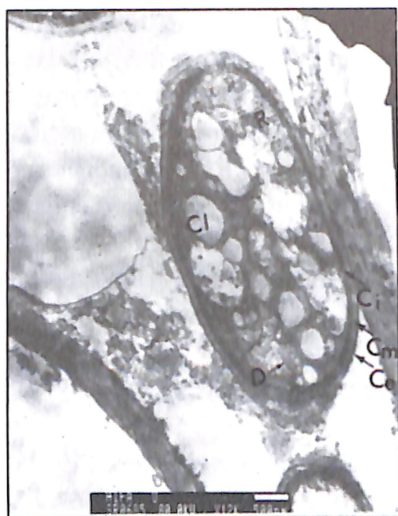
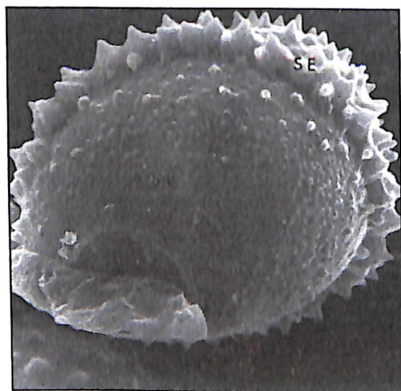


Figura 19.
Corte
transversal de
una hifa de
Hemileia
vastatrix.
MET. Capas
en proceso de
desintegración:
Interna (Ci).
Media (Cm).
Externa (Ce).
(20000X).

Figura 20.
Detalle de
urediniospora
de *H. vastatrix*
madura. MEB.
SL, superficie
lisa; SE,
superficie con
espinas.
(3000X).



interacción confirmaron que la penetración directa depende fundamentalmente de la capacidad enzimática de *V. lecanii* (20).

Mendgen (22), no registró ataque de tubos germinativos de *V. lecanii* a *Puccinia striiformis*, *invitro* pero, en hojas de trigo las hifas del hiperparásito crecieron internamente y alrededor de las urediniosporas.

La mayoría de las urediniosporas fueron invadidas por hifas de *V. lecanii*, las cuales destruyeron el contenido de la urediniospora, causando deformación (Figura 22). Frecuentemente se observó la penetración de la pared de la urediniospora de roya y en algunos casos, una sola urediniospora fue invadida por más de una hifa del hiperparásito (Figura 23). El hiperparásito *V. lecanii* actúa mediante penetración y muerte de urediniosporas de roya en la pústula; de esta manera, el hiperparásito reduce el grado de infección en la hoja (13, 20, 21, 22).

Se observó efecto de lisis sobre urediniosporas no germinadas e indujo la salida del contenido interno de la urediniospora. Sin embargo, en algunos casos el rompimiento tuvo lugar después que las esporas iniciaron el crecimiento de su tubo germinal. En este caso el tubo germinal se hinchó y rompió por un extremo y el contenido comenzó a vaciarse, resultado registrado también por Silveira *et al.* (31).

Locci *et al.* (20), observaron mediante MET y MEB a *V. lecanii* penetrando a través de la pared de las urediniosporas de *H. vastatrix* y el estado final de la infección produjo una degeneración de las urediniosporas.

Mendgen *et al.* (23), indicaron que diferentes aislamientos de *V. lecanii* actúan en la actividad quinolítica y de disolución de las paredes de las urediniosporas de varias royas. Las interacciones entre urediniosporas de *P. graminis* var. *tritici* y *V. lecanii* al microscopio

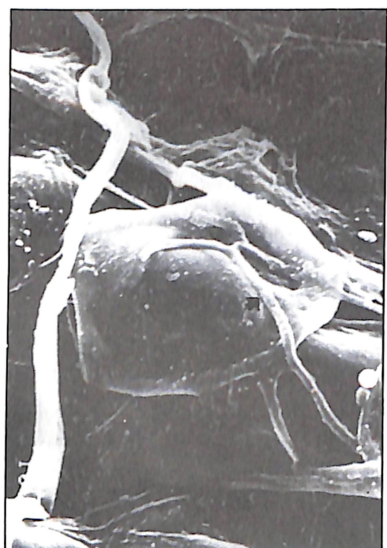


Figura 21.
Hifas de
Verticillium
lecanii
cubriendo
urediniosporas
de *Hemileia*
vastatrix
(3000X).
MEB.



Figura 22. Fotomicrografía. Hifas de *Verticillium lecanii* penetrando una urediniospora de *Hemileia vastatrix*. MEB. Se observa pérdida de espinas, cambio en la forma y tamaño de la misma. (3000X)



Figura 23.
Invasión de
urediniospora
de *Hemileia*
vastatrix por
varias hifas de
Verticillium
lecanii.
(3000X).
MEB.

electrónico, después de 72 horas, registraron disolución casi completa del contenido de la urediniospora por efecto del hiperparásito (14). La invasión parece ocurrir por digestión y muchas veces se observó una pequeña área transparente delante de la pared. Esta área transparente presenta tinción intensa, indicando la colonización del material digestivo de la pared (13).

V. lecanii presenta conidioforos delgados y verticilados; conidios solitarios, ameroconidios, pero en sucesión en el ápice del conidioforo ramificado, de apariencia ovoide a elipsoide con bordes redondeados (Figura. 24)

El mecanismo de antagonismo de *T. wortmannii* sobre *H. vastatrix*, comienza al rodear por medio de micelio las urediniosporas del patógeno, este fenómeno puede ser observado en las Figuras 25, 26, 27. Después de rodear las estructuras infectivas, el micelio logra penetrarlas e inhibir el proceso infectivo de las urediniosporas al rodearlas y obstaculizar el desarrollo del apresorio (Figura 28).

Posterior a la penetración del micelio en las urediniosporas se observó lisis de la pared y vaciado de su contenido (Figura 29). Como consecuencia del aprisionamiento por parte del

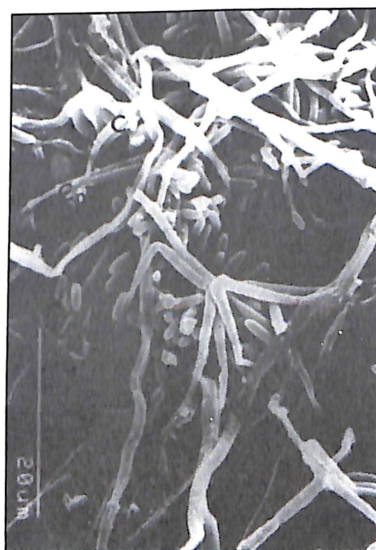


Figura 24.
Conidioforo
(C) y conidios
(Cn) de
Verticillium
lecanii.
(1000X).
MEB

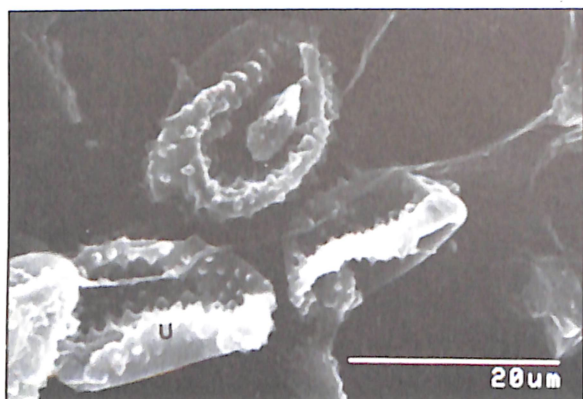


Figura 25. Urediniosporas de *Hemileia vastatrix* (U) rodeadas por hifas de *Talaromyces wortmannii* (H). MEB. (1500X).

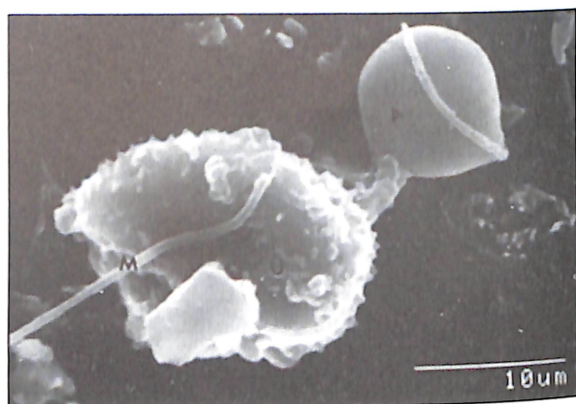


Figura 28. Hifas (H) de *Talaromyces wortmannii* penetrando urediniosporas (U) y apresorio (A) de *Hemileia vastatrix*. MEB. (1500X).

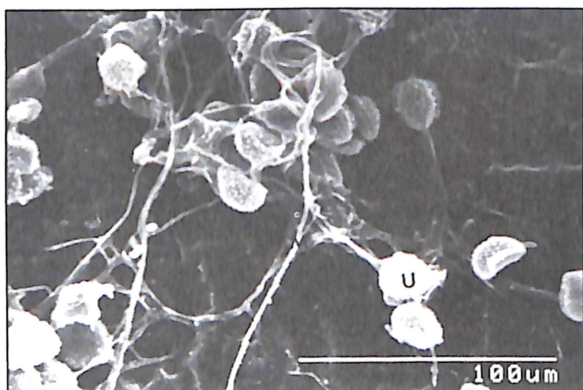


Figura 26. Hifas (H) de *Talaromyces wortmannii* rodeando urediniosporas (U) de *Hemileia vastatrix*. MEB. (600X).

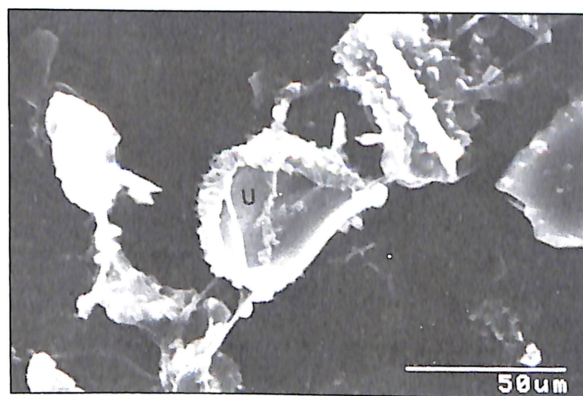


Figura 27. Hifas (H) de *Talaromyces wortmannii* saliendo de urediniospora (U) de *Hemileia vastatrix*. MEB. (2000X).

micelio de *T. wortmannii* pudieron ser observadas deformaciones en las urediniosporas y el vaciado ya indicado (Figuras 30 y 31).

La investigación nos permite concluir que los antagonistas *V. lecanii* y *T. wortmannii* son controladores biológicos del parásito *H. vastatrix* y su aplicación debe hacerse en los primeros estados de desarrollo de la enfermedad, a partir del grado 4, según la escala de Leguizamón (18) y no descartar grados 5 a 7 de la misma escala, lo cual redundaría en disminución de inóculo residual y potencial al reinicio de los ciclos epidémicos. Además, es necesario tener en cuenta el periodo de incubación y periodo de latencia (PI y PL) de la roya del café.

Las observaciones de la interacción, patógeno-hiperparásito demostraron que *V. lecanii* penetró solamente las urediniosporas maduras de *H. vastatrix* y no se evidenció su penetración en urediniosporas inmaduras o en micelio.

La microscopía electrónica de transmisión (MET) permite estudiar con detalle los eventos nucleares y citológicos que se presentan en las urediniosporas, su desarrollo y maduración. Esto podrá ayudar a entender los procesos bioquímicos involucrados en la resistencia a la infección del hongo.

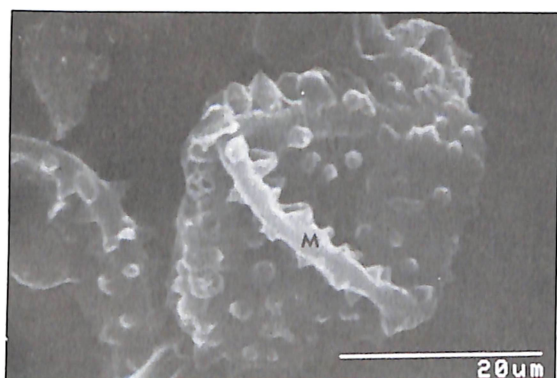


Figura 29. Ruptura de la pared de urediniospora (U) de roya (*Hemileia vastatrix*), causado por la acción de *Talaromyces wortmannii*. Obsérvese la pérdida de su contenido. MEB. (1000X).

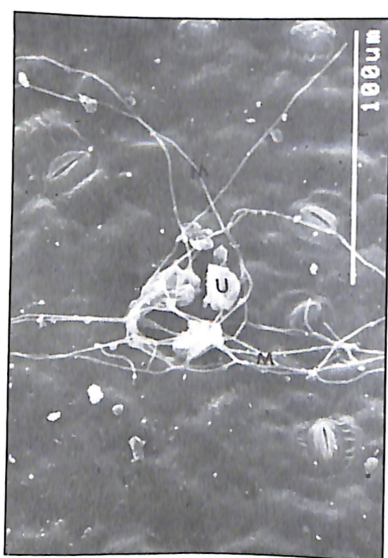


Figura 30. Deformación y pérdida del contenido de urediniosporas de roya (U) causada por la acción del hongo *Talaromyces wortmannii*. Presentan compresión de sus paredes. MEB. (800X).

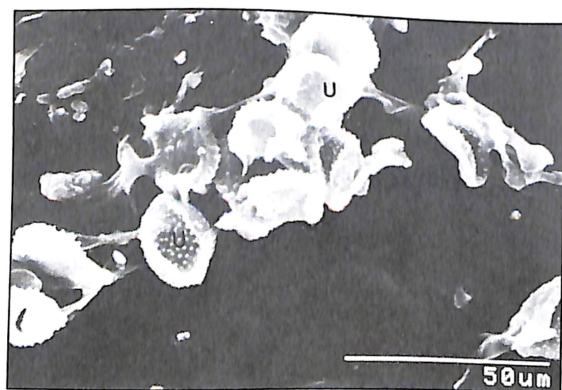


Figura 31. Deformación de urediniosporas de *Hemileia vastatrix* por efecto de *Talaromyces wortmannii*. MEB. (1000X).

La microscopía electrónica de barrido (MEB) proporciona una valiosa información sobre la morfología en forma tridimensional del modo de penetración de los hiperparásitos y del patógeno.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones y Servicios - CIS- Universidad del Cauca y al Centro Nacional de Investigaciones de Café - CENICAFE.

A los Doctores Pablo Buriticá y César Sierra Sanz por su valiosa colaboración en la revisión del texto original.

LITERATURA CITADA

1. AGRIOS, G.N. Fitopatología. México, Limusa. 1991. 756 p.
2. AINSWORTH, G.C.; SPARROW, F.K.; SUSSMAN, A.A. The fungi; and advanced treatise. A taxonomic review with keys: Basidiomycetes and lower fungi. New York, Academic Press. 1973. 504 p. (vol. IV.B.)
3. BAKER, K.F.; COOK, R.J. Biological control of plant pathogens. San Francisco. W.H. Freeman and Co., 1974. 433 p.
4. CARLING, D.E.; BROWN, M.F.; MILLIKAN, D.F. Ultrastructural examination of the *Puccinia graminis* - *Darluca filum* host-parasite relationship. Phytopathology 66: 419-422. 1976.
5. EBBEN, M.H.; SPENCER, D.M. The use of antagonistic organisms for the control of black root rot of cucumber, *Phomopsis sclerotoides*. Annals of Applied Biology 89: 103-106. 1978.

6. EKBOM, B.S. Investigation on the potential of a parasitic fungus (*Verticillium lecanii*) for biological control of the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). Swedish Journal Agriculture Research 9: 129-138. 1979.
7. ERIKSSON, O. On *Eudarlucica caricis* (Fr.) O. Eriks. Comb. nov. a cosmopolitan urediniculous pyrenomycete. Botaniska notiser 119: 33-69. 1966.
8. ESKES, A.B.; MENDES, M.D.L.; ROBBS, C.F.; GAMS, W. Estudos sobre o hiperparasitismo de *Hemileia vastatrix* por *Verticillium* spp. In: CONGRESSO Paulista de Fitopatologia, 10. Piracicaba (Brasil). Grupo Paulista de Fitopatologia, 1987. s.p.
9. ESKES, A.B.; MENDES, M.D.L.; ROBBS, C.F. Laboratory and field studies on parasitism of *Hemileia vastatrix* with *Verticillium lecanii* and *V. leptobactrum*. Café Cacao Thé 35(4): 275-281. 1991.
10. EVANS, H.C.; SAMSON, R.A. The genus *Verticillium*: taxonomic problems in species with invertebrate hosts. In: Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology. Wageningen (Holanda), Society of Invertebrate Pathology, 1986. pp. 186-189.
11. FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA. CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFE. CENICAFE. Anuario Meteorológico 1991. Chinchiná, Cenicafe, 1992. 369 p.
12. FONNEGRA G., R. Prácticas de laboratorio y manejo de equipo para microscopio electrónico de rastreo. s.e., s.e. 1988. 61 p.
13. GRABSKI, G.C.; MENDGEN, K. Einsatz von *V. lecanii* als biologisches Schädlingsbekämpfungsmittel gegen den Bohnenrostpilz *U. appendiculatus* var. *appendiculatus* im Feld und im Gewächshaus. Phytopathologische Zeitschrift 113: 243-251. 1984.
14. HANSSLER, G.; HERMANNS, M.; RESENER, H.J. Light microscope investigations of the interaction between *Puccinia graminis* var. *tritici* and *Verticillium lecanii*. Phytopathologische Zeitschrift, 102 (3/4): 310-319. 1981. (Resumen consultado en: Review of Plant Pathology 61(9). 1982).
15. HANSSLER, G.; HERMANNS, M.; RESENER, H.J. Electron microscope observations of the interactions between urediospores of *Puccinia graminis* var. *tritici* and *Verticillium lecanii*. Phytopathologische Zeitschrift 103 (2): 139-148. 1982. (Resumen consultado en: Review of Plant Pathology 61(9). 1982).
16. HASHIOKA, Y. Mycoparasitism in relation to phytopathogens. Shokubutsu Byoga Kenkyu 8: 179-190. 1973.
17. LEAL, J.A.; VILLANUEVA, J.R. Digestión de uredosporas por *Verticillium hemileiae*. Microbiología Española 15(4): 269-275. 1962.
18. LEGUIZAMON C., J.E. Contribution a la connaissance de la résistance incomplète du caféier a *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. Montpellier, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 1983. 183 p. (These - Docteur Ingenieur).
19. LEGUIZAMON C., J.E.; VELEZ A., P.E.; GONZALEZ S., A. Efecto de extractos metabólicos de *Verticillium lecanii* sobre *Hemileia vastatrix*. Cenicafe 40 (2): 31-39. 1989.
20. LOCCI, R.; MINERVINI, F.C.; RODRIGUES, G.J. Studies by transmission and scanning electron microscopy on the *Hemileia vastatrix*-*Verticillium hemileiae* association. Rivista de Patologia Vegetale 7(2): 127-140. 1971.
21. MATSUOKA, K.; VANETTI, C.A. Mudancas histopatologicas causadas por *Hemileia vastatrix* em cafeeiros apresentando diferentes níveis de resistencia. Fitopatologia Brasileira 18: 484-493. 1993.
22. MENDGEN, K. Growth of *Verticillium lecanii* in pustules of stripe rust (*Puccinia striiformis*). Phytopathologische Zeitschrift 102 (3/4) 301:309. 1981. (Resumen consultado en: Review of Plant Pathology 61(9) 1982)
23. MENDGEN, K.; PFROMMER, W.; SEWIFY, G. Useful *Verticillium lecanii* for biological control. In: INTERNATIONAL CONGRESS of Plant Pathology, 5. Kyoto, August 20-27. 1988. Abstracts of papers. s.n.e. 485 p.

24. OLIVEIRA, B. Introduction. *In*: Coffee Rust Research Center (1960-1965), Oeiras (Portugal) 1965. Citado por: SILVEIRA, H.L.; RODRIGUES Jr., C.J. Bursting of rust uredospores caused by *Verticillium hemileiae* Bour. culture filtrates. *Agronomía Lusitana* 33: 391-396. 1972.
25. RIJKENBERG, F.H.H.; TRUTER, S.J. Haustoria and intracellular hyphae in the rusts. *Phytopathology* 63: 281-286. 1973.
26. RIJO, L.; SARGENT, J.A. The fine structure of the coffee leaf rust *Hemileia vastatrix*. *Canadian Journal of Botany* 52: 1363-1367. 1974.
27. ROBINSON, R. A. Plant pathosystems New York (Estados Unidos). Springer-Verlag, 1976. 184 p. (Advanced series in Agricultural Sciences N° 3).
28. RODRIGUES, J.R. Coffee rust: History, taxonomy, morphology, distribution and host resistance. *Fitopatologia Brasileira* 15(1): 1990.
29. ROSILLO G., A.G. Informe Anual de Labores. *In*: Centro Nacional de Investigaciones de Café. Cenicafé. Informe Anual de Labores de la Disciplina de Fitopatología. oct/1991 - sept/1992. Chinchiná, Cenicafé, 1992.
30. SARASOLA, A. A. La resistencia y la lucha contra las enfermedades de las plantas. *In*: SARASOLA A. A.; SARASOLA, M.A. ROCA DE Fitopatología Curso Modemo, Buenos Aires, Hemisferio Sur, 1975. pp. 125-126.
31. SILVEIRA, H.L.; RODRIGUES, C.L. Bursting of rust uredospores caused by *Verticillium hemileiae* Bour. Culture filtrates. *Agronomía Lusitana* 33: 391-393. 1972.
32. SPENCER, D.M.; ATKEY, P.T. Parasitic effects of *Verticillium lecanii* on two rust fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 77(3): 535-542. 1981.
33. VELEZ A., P.E. Estudio macro y microscópico del efecto de *Verticillium lecanii* sobre el desarrollo de lesiones de la roya del cafeto. *Cenicafé* 42(1): 13-30. 1991.