

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE  
INVESTIGACION Y ENSEÑANZA  
CATIE

PROGRAMA DE EDUCACION  
ESCUELA DE POSTGRADO

**EFECTO DE *Pseudomonas* FLUORESCENTES SOBRE *Rosellinia bunodes*  
( Berk y Br.) Sacc. EN PLANTAS DE CAFÉ**

Tesis sometida a la consideración de la Escuela de Postgrado. Programa de Educación en Ciencias  
Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza,  
para optar el grado de

*Magister Scientiae*

por

**JAIME CARDENAS LOPEZ**

**TURRIALBA, COSTA RICA**

**1997**

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE  
INVESTIGACION Y ENSEÑANZA  
CATIE

PROGRAMA DE EDUCACION  
ESCUELA DE POSTGRADO



**EFFECTO DE *Pseudomonas* FLUORESCENTES SOBRE *Rosellinia bunodes*  
( Berk y Br.) Sacc. EN PLANTAS DE CAFÉ**

Tesis sometida a la consideración de la Escuela de Postgrado. Programa de Educación en Ciencias  
Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza,  
para optar el grado de

*Magister Scientiae*

por

**JAIME CARDENAS LOPEZ**

**TURRIALBA, COSTA RICA**

**1997**

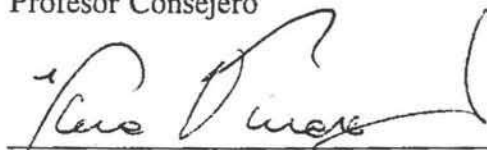
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Jefatura del Area de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

*MAGISTER SCIENTIAE*

FIRMANTES:



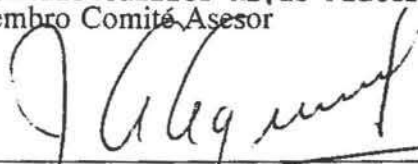
Elkin Bustamante Rojas, Ph.D.  
Profesor Consejero



Vera Sánchez Garita, Ph.D.  
Miembro Comité Asesor



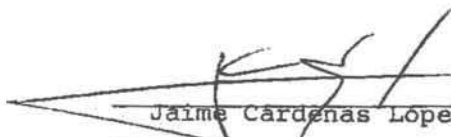
Gonzalo Galileo Rivas Platero, M.Sc.  
Miembro Comité Asesor



Juan Antonio Aguirre, Ph.D.  
Jefe, Area de Postgrado



Markku Kanninen, Ph.D.  
Director, Programa de Enseñanza



Jaime Cardenas Lopez  
Candidato

## DEDICATORIA

A mis padres Nelly y José Angel. A quienes debo lo que soy.

A mis hermanos:

Luis Carlos, Jorge Humberto, María Cristina, José Albeiro, Alvaro Hernan.

A mi esposa María Teresa compañera de mil batallas.

A mis sobrinos.

A Hugo, Marco y Reynaldo.

.....A Alvaro donde se encuentre.



## AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sincero agradecimiento al Instituto Colombiano Agropecuario ICA, por el apoyo brindado para la realización de los estudios de Maestría en CATIE.

A las siguientes personas:

Dr. Elkin Bustamante Rojas. Profesor Consejero, por todas sus enseñanzas y su permanente apoyo y confianza.

Dr. Luis Felipe Guevara Benavidez

Dr. Gabriel Cadena Gómez. Director de Cenicafé.

Dr. Ramiro Gómez. Jefe Sanidad Vegetal ICA.

Dr. Jairo Leguizamon Caicedo

M.Sc. Carlos Alberto Rivillas O.

Dra. Vera Sánchez

M.Sc. Galileo Rivas P.

Ing. Juan Carlos Camacho A.

Dra. Esther Cecilia Montoya R.

M.Sc. Bertha Lucia Castro C.

Dra. Claudia Marcela Pérez L.

Dr. Hector Mejía Echeverry

Dr. Cesar Cortés López

Ing. Ruben Dario Ospina T.

Sr. Rigoberto Aguilar

Sr. Hernando García

Sr. Asdrual Pérez

Sr. Uriel Gallego

A todas las personas que de una u otra forma hicieron posible con su apoyo y colaboración la realización del presente trabajo.

CARDENAS LOPEZ, J. 1997. Efecto de *Pseudomonas* fluorescentes sobre *Rosellinia bunodes* ( Berk y Br.) Sacc. en plantas de café. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 86 p.

### Resumen

En el presente trabajo se evaluó el efecto de diferentes aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes sobre *Rosellinia bunodes*, agente causante de la llaga negra radical del cafeto. Algunos aislamientos se obtuvieron de raíces de cafetos, variedad Colombia (zona central cafetera colombiana) y otras cepas de *Pseudomonas* fueron facilitadas por el CIAT. Los aislamientos provenientes de campo se identificaron como *Pseudomonas cepacia* (técnica BBL Crystal). Pruebas "in vitro" permitieron determinar una tasa de crecimiento diario de micelio de *Rosellinia bunodes* de 0.57 cm en Agar extracto de malta (coeficiente de variación de 6.99). Igualmente se verificó en condiciones de laboratorio, el efecto inhibitorio del aislamiento PC 9701 sobre el crecimiento micelial de *R. bunodes*. En invernadero se evaluó el antagonismo de los aislamientos PC 9701, PC 9702, PC 9703, PC 9704, F87, PO3, PO5 y C 88 utilizando plántulas ("chapolas") de café, las cuales antes de ser sembradas en suelo estéril, fueron inoculadas con cada uno a razón de 30 ml de suspensión bacteriana por plántula, utilizando como sustrato de incremento de la bacteria leche descremada estéril al 5%. Patógeno y antagonista se evaluaron hasta los 50 días detectándose diferencias significativas entre aislamientos del antagonista, con menores porcentajes de mortalidad en los aislamientos C 88 y PC 9701 (60 y 74% respectivamente). La recuperación de éstos de la rizosfera de las plántulas de café fue alta, con persistencia de hasta 60 DDI (días después de la inoculación de la bacteria). El recuento de UFC/g de raíz a los 30 DDI resultó de  $2.38 \times 10^6$  para PC 9701 y  $1.15 \times 10^6$  para C 88. Los resultados obtenidos en este estudio muestran perspectivas importantes para lograr en el futuro el uso de estos agentes de control biológico en programas de Manejo Integrado de la llaga radical del cafeto.

**Palabras claves:** *Coffea arabica*, *Pseudomonas cepacia*, *Rosellinia bunodes*, Enfermedades fungosas, Control biológico, Antagonismo.

CARDENAS LOPEZ, J. 1997. Effect of fluorescent *Pseudomonas* on *Rosellinia bunodes* (Berk and Br.) Sacc. on coffee plants. Thesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 86 p.

#### SUMMARY

The purpose of this research was to evaluate the effect of different fluorescent *Pseudomonas* spp isolations on *Rosellinia bunodes*, causal agent of coffee black radical rot disease. Some isolates were obtained from coffee roots, var. "Colombia" (central Colombian coffee production area) and other *Pseudomonas* strains were facilitated by CIAT. The field isolates were identified as *Pseudomonas cepacia* (Crystal BBL technique). *In vitro* evaluations allowed to determine a 0.57 cm daily growth rate of *Rosellinia bunodes* mycelium in malt extract agar (variation coefficient 6.99). The PC 9701 isolate inhibitory effect on the mycelial growth of *R. bunodes* was verified under laboratory conditions. Likewise, the PC 9701, PC 9702, PC 9704, F87, PO3, PO5 and C88 isolates' antagonism was evaluated at the greenhouse employing for this purpose coffee plantlets inoculated with 30 ml bacterial suspension of each isolate prior their culture in sterile soil. Sterile skimmed milk at 5% was used as bacteria increase substrate. Both pathogen and antagonist were evaluated after 50 days, observing significant differences between the antagonist's isolates. The isolates which showed the lowest mortality percentages were C 88 and PC 9701 (60 and 74% respectively). The recovery index of these isolates from coffee plantlets rhizosphere was high, with a persistence of up to 60 DAI (days after bacteria inoculation). The number of root UFC/g after 30 DAI was  $2.38 \times 10^6$  for PC 9701 and  $1.15 \times 10^6$  for C 88. The results obtained through this research evidence important perspectives to attain a future utilization of the above mentioned bio-controllers for coffee radical rot integrated management programs.

**Key words:** *Coffea arabica*, *Pseudomonas cepacia*, *Rosellinia bunodes*, fungal diseases, biological control, antagonism.



## INDICE

Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Resumen	iv
Summary	v
Indice	vi
Lista de cuadros	viii
Lista de figuras	xi
Lista de anexos	xiv
1. Justificación	1
2. Objetivos	5
2.1 General	5
2.2 Específicos	5
3. Hipótesis	6
4. Antecedentes	7
4.1 Aspectos generales de <i>Rosellinia bunodes</i>	7
4.1.1. Taxonomía	7
4.1.2. Biología	9
4.1.2.1. Estructuras del hongo	9
4.1.2.2. Condiciones que favorecen a <i>Rosellinia bunodes</i>	9
4.1.3. Distribución de <i>Rosellinia bunodes</i>	10
4.2. Importancia de <i>R. bunodes</i> en la caficultura mundial	11
4.3. Mecanismos de dispersión y ataque de <i>R. bunodes</i>	12
4.4. Manejo integrado de <i>R. bunodes</i>	15
4.4.1. Control cultural	15
4.4.2. Control químico	15
4.4.3. Control biológico de hongos del suelo	16

4.4.3.1. Control biológico de <i>Rosellinia bunodes</i>	18
4.4.3.2. Uso de <i>Pseudomonas</i> spp fluorescentes	18
4.4.3.3. Formulaciones de <i>Pseudomonas</i> spp	22
5. Materiales y métodos	25
5.1. Localización del experimento	25
5.2. Metodología	25
5.2.1. Primera etapa	26
5.2.2. Segunda etapa	31
5.2.3. Tercera etapa	36
6. Resultados	40
6.1. Muestreo y aislamiento de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes	40
6.2. Identificación de los microorganismos aislados	42
6.3. Conservación	44
6.4. Pruebas de antagonismo segunda etapa	45
6.5. Tasa de crecimiento de <i>R. bunodes</i>	46
6.6. Evaluación del antagonismo	48
6.7. Pruebas de antagonismo tercera etapa	53
6.8. Persistencia de las bacterias en la rizosfera	59
6.9. Inhibición "in vitro" del crecimiento de <i>R. bunodes</i>	61
7. Discusión	63
8. Conclusiones	69
9. Recomendaciones	70
10. Referencias bibliográficas	71
11. Anexos	84

## LISTA DE CUADROS

No.	Titulo	Pag.
1	Tipificación por tinción de gram y oxidasa de colonias que presentaron fluorescencia en la lámpara de luz ultravioleta de 365 n.m.. Cenicafé, Colombia. 1997.	41
2	Identificación de 6 bacterias seleccionadas por su reacción oxidasa positiva e índole negativo y procedentes de aislamientos realizados en raíces de café. Cenicafé, Colombia. 1997.	42
3	Pruebas de identificación de 10 aislamientos bacteriales facilitados por el CIAT. Cenicafé, Colombia. 1997.	43
4	Identificación de algunas de las bacterias presentes en la pulpa de café conocidas como posible antagonistas. Cenicafé, Colombia. 1997	44
5	Pruebas de viabilidad, fluorescencia y humedad efectuada 24 horas después de la liofilización, a los 8 aislamientos de <i>P. cepacia</i> seleccionados para la segunda etapa. Cenicafé, Colombia. 1997.	45
6	Análisis de suelos para uno de los sitios donde se realizaron muestreos y para el utilizado en los experimentos a nivel de invernadero. Cenicafé, Colombia. 1997.	46
7	Crecimiento diario de micelio de <i>Rosellinia bunodes</i> en AEM. Cenicafé, Colombia. 1997	47

No.	Titulo	Pag.
8	Mortalidad de "chapolas" de café 20 DDI con <i>R. bunodes</i> . Cenicafé, Colombia. 1997.	48
9	Mortalidad de "chapolas" de café 35 DDI con <i>R. bunodes</i> . Cenicafé, Colombia. 1997.	50
10	Número de "chapolas" con tejido foliar necrótico presente en 5 repeticiones 35 DDI con <i>R. bunodes</i> . Cenicafé, Colombia. 1997.	51
11	Respuesta de "chapolas" de café var. Colombia a la aplicación de hipoclorito de sodio a la raíz, de acuerdo al porcentaje de mortalidad de plántulas. Cenicafé, Colombia. 1997.	53
12	Mortalidad de "chapolas" de café 20 DDI con <i>R. bunodes</i> . Cenicafé, Colombia. 1997. (tercera etapa)	54
13	Mortalidad de "chapolas" de café 50 DDI con <i>R. bunodes</i> . Cenicafé, Colombia. 1997. (tercera etapa)	55
14	Incidencia de tejido foliar necrótico en "chapolas" de café a los 30 y 50 DDI con <i>R. bunodes</i> . Cenicafé, Colombia. 1997.	58
15	Valores de peso fresco, seco y materia seca de "chapolas" de café de los tratamientos 1 y 2 evaluados en la tercera etapa. Cenicafé, Colombia. 1997	59

No.	Titulo	Pag.
16	Persistencia de los aislamientos PC 9701 y C 88 en la rizosfera de "chapolas" de café. Cenicafé, Colombia. 1997.	60
17	Recuento de UFC/g de raíz 15 y 30 DDI con los aislamientos PC 9701 y C 88. Cenicafé, Colombia. 1997.	60
18	Crecimiento acumulado de <i>R. bunodes</i> en AEM con diferentes cantidades de PC 9701. Cenicafé, Colombia. 1997.	61



## LISTA DE FIGURAS

No.	Descripción	Pag.
	<i>Rosellinia bunodes</i> . Peritecios, Sección transversal de la raíz mostrando puntos negros del hongo, Asca, Ascosporas.	8
2	Penetración de <i>Rosellinia</i> spp. Proliferación externa, Formación del "cojín infeccioso", Penetración en el tejido, Penetración interna en la forma de cordón subcortical.	14
3	Raíces de plántulas de cafeto con micelio de <i>R. bunodes</i> y raíces sanas.	26
4	Proceso de aislamiento e identificación de <i>Pseudomonas</i> fluoescentes. Cenicafé, Colombia. 1997	28
5	<i>Pseudomonas cepacia</i> en medio cetrimid agar 24 horas después de la siembra. Se puede apreciar la fluorescencia de la colonia. Cenicafé, Colombia. 1997. (foto G. Hoyos)	29
6	Verificación de la calidad de la liofilización. Cenicafé, Colombia. 1997.	30
7	Micelio de <i>R. bunodes</i> en agar extracto de malta(AEM). Cenicafé, Colombia. 1997.(foto G. Hoyos)	31

No.	Descripción	Pag.
8	Plántula de café var. colombia 50 días después de ser sembrada en suelo estéril. Cenicafé, Colombia. 1997. (foto G. Hoyos)	33
9	Inoculación de las "chapolas" de café con el antagonista y el patógeno. Cenicafé, Colombia. 1997.	34
10	Disposición de los tratamientos en el invernadero. Cenicafé, Colombia. 1997. (foto G. Hoyos)	36
11	Preparación de la suspensión bacterial partiendo de un cultivo de 24 horas en leche estéril al 5%. Cenicafé, Colombia. 1997.	37
12	Curva de crecimiento diario de <i>R. bunodes</i> en medio AEM. Cenicafé, Colombia. 1997.	47
13	Mortalidad de "chapolas" de café en los diferentes tratamientos 20 DDI con <i>R. bunodes</i> . Cenicafé, Colombia. 1997.	49
14	Curva de progreso de la mortalidad de "chapolas" de café en los diferentes tratamientos 35 DDI con <i>R. bunodes</i> . Cenicafé, Colombia. 1997.	50
15	Número de "chapolas" de café con tejido foliar necrótico en los diferentes tratamientos 35 DDI con <i>R. bunodes</i> . Cenicafé, Colombia. 1997.	52

No.	Descripción	Pag.
16	Porcentaje de mortalidad de "chapolas" de café 20 DDI con <i>R. bunodes</i> . Cenicafé, Colombia. 1997.	54
17	Comparación de la mortalidad de "chapolas" de café a los 20 y 50 DDI con <i>R. bunodes</i> . Cenicafé, Colombia. 1997.	56
18	Tratamientos PC 9701, C 88 y testigos 50 DDI con <i>R. bunodes</i> . Cenicafé, Colombia. 1997. (foto G. Hoyos)	57
19	Número de "chapolas" de café con tejido foliar necrótico 30 y 50 DDI con <i>R. bunodes</i> . Cenicafé, Colombia. 1997.	58
20	Nivel de inhibición en el crecimiento micelial de <i>R. bunodes</i> con diferentes cantidades de <i>P. cepacia</i> . Cenicafé, Colombia. 1997.	62
21	Curvas de progreso de la mortalidad de "chapolas" de café en los diferentes tratamientos 50 DDI con <i>R. bunodes</i> . Cenicafé, Colombia. 1997	67

## LISTA DE ANEXOS

No.	Descripción	Pag.
1	Medio de cultivo agar extracto de malta (AEM)	84
2	Agar F para <i>Pseudomonas</i> spp fluorescentes	84
3	Medio de cultivo cetrimid agar	85
4	Análisis aproximado de la leche descremada	85
5	Caracterización microbiológica del lombricomposto de pulpa de café realizado por la Disciplina de Química Industrial de Cenicafé en 1996. Cenicafé, Colombia. 1997	86

## **EFFECTO DE *Pseudomonas* FLUORESCENTES SOBRE *Rosellinia bunodes* ( Berk y Br.) Sacc. EN PLANTAS DE CAFÉ**

### **1. JUSTIFICACION**

Las enfermedades causadas por hongos del género *Rosellinia* han sido registradas en casi todos los países del mundo, ocasionando daños de consideración en muchas especies vegetales, así como gran dificultad en su manejo (Aranzazu 1992).

Castro y Esquivel (1991) registraron la llaga negra o podredumbre negra, como una enfermedad de las raíces del cafeto ocasionada por el habitante natural del suelo *Rosellinia bunodes* Berk y Br. Lo anterior confirma lo establecido por Waterston (1941), quien describe a *Rosellinia* como un habitante del suelo, cuyo parasitismo es incidental a su existencia saprofítica.

En Colombia han sido registrados numerosos y graves ataques ocasionados por la llaga negra (*R. bunodes*) en plantaciones nuevas de café, tanto de variedad caturra como de variedad Colombia (Castro y Esquivel 1991).

En países centroamericanos como Honduras, Tronconi (1990) , menciona a *R. bunodes* como una de las enfermedades presente en las plantaciones comerciales, sin embargo Alpizar (1989) la incluye como un problema que en la actualidad no reviste gran importancia en las zonas cafetaleras de Costa Rica.

Regaldo y Villanueva (1990) indican que en México la enfermedad ataca tanto plantaciones jóvenes como adultas. Los daños en el árbol de cafeto se distinguen

por el amarillamiento, marchitez y defoliación.

En la India, Govindarajan (1988) registró ataques más severos en cafetales a pleno sol que con sombra. *Rosellinia* tiene un rango muy amplio de plantas hospedantes, atacando numerosas especies cultivadas así como también varias especies de árboles de sombrío en plantaciones de café. Algunos hospedantes de *R. bunodes* son el café (*Coffea arábica*), la yuca (*Manihot esculenta*), el cacao (*Theobroma cacao*), los cítricos (*Citrus* sp.), la macadamia (*Macadamia integrifolia*). El ataque es muy severo en árboles de sombrío especialmente del género *Inga* spp., frecuentemente utilizados en zonas cafetaleras (Bermudez y Carranza 1990, Villegas 1997).

Este hongo afecta las plantaciones de café, produciendo la muerte de los árboles y por lo tanto disminuyendo los rendimientos de la plantación (Galvez 1990).

El manejo de la enfermedad está basado fundamentalmente en retardar la diseminación del patógeno, reduciendo al mínimo el inóculo en el suelo, además de favorecer su aireación y exposición solar (Katan 1981).

Hasta el momento se carece de métodos eficientes que garanticen plenamente la recuperación de áreas afectadas. Sin embargo y como con muchos patógenos habitantes del suelo, existe un gran potencial antagónico ejercido por microorganismos benéficos tales como : micorrizas vesículo arbusculares, el hongo *Trichoderma* y bacterias del género *Pseudomonas* spp. fluorescentes, los cuales al parecer compiten por espacio y nutrientes, ofreciendo grandes posibilidades de ser incluídos satisfactoriamente en un control integrado (Kaska 1976, Burbano 1992, Castro 1995, Valencia 1996).

El control biológico presenta ventajas para el manejo de enfermedades, como la reducción del uso de fungicidas, lo cual favorece a largo plazo un equilibrio en el

sistema de producción, costos más bajos y la protección del ecosistema cafetero (López 1994).

El manejo de las llagas radicales del cafeto producidas por el hongo *R. bunodes* utilizando el control biológico, tiene amplias posibilidades de éxito. Trabajos adelantados por Esquivel *et. al* (1992) y Castro (1995) indican que el manejo de *R. bunodes*, utilizando el antagonista *Trichoderma*, es promisorio en sistemas de producción cafeteros, bien sea como un componente de los sistemas integrales de manejo de enfermedades o mediante el desarrollo de fungicidas biológicos. Igual mención hace Valencia (1996) quien encontró inhibición del crecimiento de *R. bunodes* en laboratorio, al ser puesto a competir con bacterias del género *Pseudomonas*.

Es posible mejorar la capacidad de los microorganismos para controlar las enfermedades mediante la selección de aquellos con características más efectivas y además brindándoles sustratos que favorezcan su capacidad de crecimiento y multiplicación (Okumoto 1992).

Instituciones como el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza- CATIE- y el Centro Nacional de Investigaciones del Café -Cenicafé- adelantan trabajos de investigación con agentes de control biológico promisorios como *Trichoderma koningii* y micorrizas vesículo arbusculares, enfatizando su aplicación inicial, en condiciones de invernadero. La posibilidad de la presencia de *Pseudomonas* spp. fluorescentes nativas de suelo colombiano, con potencial antagonico, ameritan este tipo de investigaciones. Ello permitirá a mediano plazo contar con alternativas confiables que ofrezcan efectividad y persistencia del control biológico en lotes afectados, tanto en café como en otros cultivos de importancia en la diversificación del ingreso cafetero.

Considerando la importancia del café para Colombia, Centroamerica y más de 20 países productores en todo el mundo, en donde el cultivo tiene una alta influencia



social, es generador de empleos y ocupa un lugar preponderante en sus economías (Saenz 1885, Graff 1986), es necesario profundizar las investigaciones que permitan encontrar métodos eficientes de control de *R. bunodes* con microorganismos antagonistas, entre ellos *Pseudomonas* spp fluorescentes.

El control biológico de enfermedades radicales en una amplia variedad de cultivos ha sido explorado por diversos autores, existiendo referencias exitosas con el uso de bacterias del género *Pseudomonas* del tipo fluorescentes (Kloeper 1974, Austin *et al.* 1977, Pierson y Weller 1994).

Con el presente trabajo se pretende aportar información básica que permita el aislamiento de este tipo de microorganismos de la rizosfera del café, así como explorar el efecto antagónico de *Pseudomonas* spp. sobre *R. bunodes*, agente causante de la llaga negra radical del cafeto.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 General

Evaluar en condiciones de invernadero el efecto antagónico de *Pseudomonas* fluorescentes contra *R. bunodes* en plántulas ("chapolas") de cafeto.

### 2.2 Específicos

**2.2.1** Determinar una metodología confiable para aislar, identificar y conservar *Pseudomonas* fluorescentes con potencial efecto antagónico sobre *R. bunodes*.

**2.2.2** Verificar en laboratorio el efecto antagónico de *Pseudomonas* fluorescentes contra *R. bunodes*.

**2.2.3** Evaluar en condiciones de invernadero el efecto antagónico de especies de *Pseudomonas* sobre *R. bunodes*, en plántulas ("chapolas") de cafeto, var. Colombia.

**2.2.4** Determinar la persistencia de *Pseudomonas* en la rizosfera de plántulas ("chapolas") de cafeto, var. Colombia, cuando son inoculadas utilizando un sustrato específico.

### 3. HIPOTESIS

- Aislamientos nativos en suelo cafetero colombiano de *Pseudomonas* fluorescentes no presentan efecto antagónico sobre el agente causante de la llaga negra radical del cafeto, *R. bunodes*
- La utilización de leche descremada como sustrato, no le garantiza a *Pseudomonas* fluorescentes su persistencia en la rizosfera de plántulas de cafeto y efecto antagónico sobre *R. bunodes*.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 Aspectos Generales de *Rosellinia bunodes*

#### 4.1.1 Taxonomía

*Rosellinia bunodes* (Berk y Br.) Sacc. pertenece a la clase Ascomycetes, orden Sphaeriales, familia Xylariaceae, género *Rosellinia* (Kannan 1986).

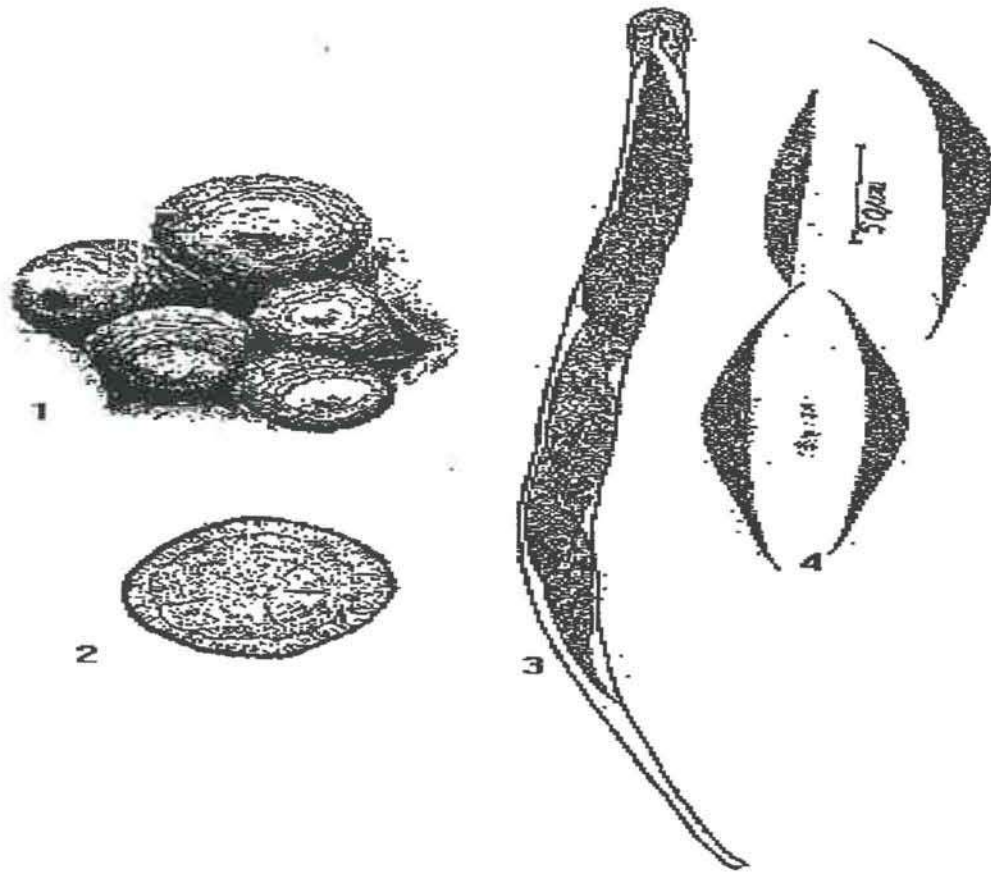
Duque (1933) clasificó el género *Rosellinia* como imperfecto o Pyrenomyceto, orden Sphaeriales, familia Sphaeriaceae y lo describió como un organismo que posee la forma sexual ascospórica, asexual conídica y la vegetativa.

Sarasola (1975) indica que el hongo puede presentarse en su forma sexual ascospórica que corresponde a *Rosellinia*, en la forma asexual conídica del tipo *Graphium* y en la forma vegetativa con cordones miceliales del tipo *Dematophora*.

Estudios microscópicos han permitido la observación de características morfológicas como el aspecto general de los conidios del género *Graphium*, el extremo del conidióforo, la forma de la conidia, la ascospora y el micelio (Saccas 1956). El mismo autor afirma que el micelio de *R. bunodes* posee una forma cilíndrica tabicada, muy ramificado y de color pardo oscuro; posee una capa compacta parecida a una corteza. El estroma inicialmente es pardo rojizo y luego negro, formado por hifas densamente aglomeradas de varios milímetros de espesor que comienzan a emerger en el tejido cortical.

Muthappa (1977) describe a *R. bunodes* con peritecios densamente agregados, de 1-2 mm de diámetro y 2 mm de altura, ásperos y prominentes, hifas superficiales negras, con micelio sobre la superficie del hospedante. Ostiolos papilados, ascas cilíndricas de tallo largo, unitunicados de 8 esporas, 270-378 x 13-20 (300x17) m., ascosporas café oscuras, uniceluladas de pared delicada,

simbiforme, extremos prolongados en forma de hilo (Fig. 1).



**Figura 1.** *Rosellinia bunodes*: 1. Peritecios; 2. Sección transversal de la raíz mostrando los puntos negros del hongo; 3. Asca; 4. Ascosporas. (Ilustración tomada de Muthappa 1977).

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 Aspectos Generales de *Rosellinia bunodes*

#### 4.1.1 Taxonomía

*Rosellinia bunodes* (Berk y Br.) Sacc. pertenece a la clase Ascomycetes, orden Sphaeriales, familia Xylariaceae, género *Rosellinia* (Kannan 1986).

Duque (1933) clasificó el género *Rosellinia* como imperfecto o Pyrenomyceto, orden Sphaeriales, familia Sphaeriaceae y lo describió como un organismo que posee la forma sexual ascospórica, asexual conídica y la vegetativa.

Sarasola (1975) indica que el hongo puede presentarse en su forma sexual ascospórica que corresponde a *Rosellinia*, en la forma asexual conídica del tipo *Graphium* y en la forma vegetativa con cordones miceliales del tipo *Dematophora*.

Estudios microscópicos han permitido la observación de características morfológicas como el aspecto general de los conidios del género *Graphium*, el extremo del conidióforo, la forma de la conidia, la ascospora y el micelio (Saccas 1956). El mismo autor afirma que el micelio de *R. bunodes* posee una forma cilíndrica tabicada, muy ramificado y de color pardo oscuro; posee una capa compacta parecida a una corteza. El estroma inicialmente es pardo rojizo y luego negro, formado por hifas densamente aglomeradas de varios milímetros de espesor que comienzan a emerger en el tejido cortical.

Muthappa (1977) describe a *R. bunodes* con peritecios densamente agregados, de 1-2 mm de diámetro y 2 mm de altura, ásperos y prominentes, hifas superficiales negras, con micelio sobre la superficie del hospedante. Ostiolo papilados, ascas cilíndricas de tallo largo, unitunicados de 8 esporas, 270-378 x 13-20 (300x17) m., ascosporas café oscuras, uniceluladas de pared delicada,

en humus, se le considera como parte de la flora natural. Lo anterior coincide con lo expuesto por Waterston (1941), quien describe a *Rosellinia* como un habitante natural del suelo.

Existen tres factores que favorecen el desarrollo del patógeno: 1) la presencia de árboles viejos de sombrero con sus raíces en proceso de descomposición; 2) los contenidos de materia orgánica en la superficie del suelo y 3) la frecuencia de las lluvias, detectándose una incidencia casi insignificante en donde la frecuencia de las lluvias es menor y poca la acumulación de humus y restos vegetales (López de Oliveira 1992). La enfermedad es favorecida además por la alta precipitación y la reducida luminosidad.

Estas condiciones son coincidentes con la información presentada por López y Fernández (1966) quienes indican que *R. bunodes* se desarrolla mejor en suelos con humedad alrededor del 70% y alto contenido de materia orgánica. Igualmente Aranzazu (1992) menciona la penumbra, el exceso de hojarasca, suelos de textura franco arenosa con buen drenaje interno, sueltos y ricos en materia orgánica como factores que favorecen a *Rosellinia*. En relación con el ámbito de temperatura, se ubica entre 7 y 33 °C con un óptimo de 25 a 27 °C (Merchán 1989).

#### **4.1.3 Distribución geográfica de *R. bunodes***

Este Ascomiceto tiene una amplia distribución en zonas tropicales, viéndose favorecido por las características agroecológicas. Fue detectado por primera vez en 1870 en fragmentos de raíces provenientes de Ceilán (Saccas 1956).

Actualmente *R. bunodes* se encuentra ampliamente distribuido tanto en América tropical como en la República Centro Africana, India, Indonesia, Malasia, Filipinas, Sri Lanka y Zaire (Holliday 1980).



En los países productores de café de Centro y Suramérica se ha informado que causa la muerte de árboles jóvenes y viejos, así como de especies utilizadas como sombrío (Galvez 1990).

En Colombia la enfermedad causada por *R. bunodes*, se conoce desde 1931, cuando fue encontrada en cacao, café y árboles de sombrío en los departamentos de Antioquia, Caldas y Cundinamarca, Santander y Valle del Cauca (Merchán 1993).

Duque (1952) reconoció la gravedad de la enfermedad en Colombia así como la persistencia de los ataques, en trabajos de campo realizados entre los años 1931 y 1943.

#### **4.2 Importancia económica de *R. bunodes* en la caficultura mundial**

*Rosellinia* spp., causa pudrición de la raíz en muchos cultivos tropicales, especialmente en tierras recién habilitadas para nuevas siembras (Waller 1987).

A pesar que los ataques de *R. bunodes* ocasionan la muerte de muchos árboles en plantaciones comerciales de varios países productores de café, no se tienen datos de la cuantificación de pérdidas causadas por este patógeno.

Es importante considerar que el impacto económico producido por *R. bunodes* está representado en la disminución progresiva del número de árboles productivos, costos directos de control y eliminación de árboles enfermos y el costo de no poderse resembrar café en los suelos contaminados con la enfermedad.

Castro (1992) observó niveles de incidencia hasta del 80% en varias fincas de la zona cafetera colombiana, con pérdidas millonarias no solo en café sino también en cítricos y macadamia.

### 4.3 Mecanismos de diseminación y ataque de *R. bunodes*

La penetración directa probablemente es la más común forma de ataque en los hongos. Estos lo hacen por medio de una hifa fina o un apresorio, el cual se forma entre la zona de contacto del tubo germinal o micelio y la superficie del hospedante (Agrios 1996).

Duque (1952) describe dos formas de propagación para *R. bunodes*: 1) en la superficie del suelo por contacto de éste con material infectado y 2) por contacto de las raíces de árboles enfermos con árboles sanos.

El contacto que ocurre entre las raíces o troncos infectados con raíces de árboles sanos por medio de los rizomórfos es una de las formas más frecuentes de dispersión de las llagas radicales (López 1965).

Estudios de patogenicidad de *R. bunodes* mostraron que antes de penetrar en las raíces de su hospedante para establecerse como parásito, necesita tener un vigoroso crecimiento ectotrófico a lo largo del sistema radical (López 1965, Salazar y Aranzazu 1991). El éxito o fracaso en la infección dependerá del menor o mayor desarrollo previo adquirido por el hongo.

Cuando la base alimenticia es insuficiente, el hongo no puede llegar hasta la fase parasítica, ya que por agotamiento del sustrato no es capaz de continuar su crecimiento y muere antes de vencer la resistencia pasiva del susceptible (Fernández y López 1964, Salazar y Aranzazu 1991).

En cuanto a la relación patógeno-hospedante, Nicole *et al.* (1994) describen las estructuras celulares particulares de los hongos que pueden estar involucradas en la alteración de la pared celular. Los patógenos pueden producir un amplio arreglo de sus estructuras celulares especializadas en la penetración del hospedante. Estos pueden ser apresorios, haustorios o microhifas. La alteración

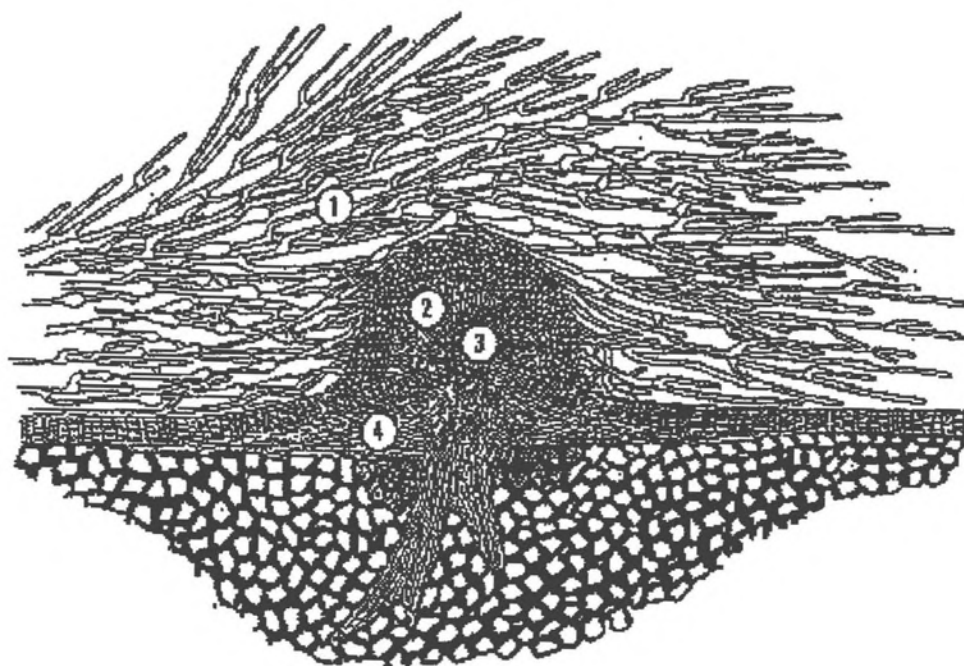


de los tejidos resulta de la presión mecánica y de la actividad enzimática de la cutinasa, pectinasa y celulasa, que ha sido parcialmente demostrada en hongos con apresorios.

Agrios (1996) afirma que para que un patógeno infecte una planta, debe ser capaz de abrirse paso al interior de ésta, obtener nutrientes de ella y neutralizar sus reacciones de defensa.

Debido a la poca información existente sobre la relación del patógeno con el hospedante, Ibarra (1997) actualmente adelanta el estudio del proceso infectivo de *R. bunodes* en café, el cual es parte del conocimiento básico que se debe tener sobre la biología y ecología del patógeno.

La figura 2 ilustra el mecanismo de penetración de *Rosellinia* spp. cuando logra vencer la resistencia de su hospedante.



**Figura 2.** Penetración de *Rosellinia* spp. 1 Proliferación externa; 2. Formación del "cojín infeccioso"; 3. Penetración en el tejido; 4. Proliferación interna en la forma de cordón subcortical. (Ilustración tomada de Tourvieille de Labrousche 1982).

Castro y Esquivel (1991) afirman que en la zona cafetera prevalece la llaga negra, se desarrolla rápidamente y su proceso de penetración es más precoz y masivo; por lo tanto, los efectos en el hospedante se manifiestan más temprano. Indican que la sintomatología en el árbol se manifiesta de manera tardía como clorosis generalizada, necrosis de las hojas, posterior defoliación y por último la muerte.

#### **4.4 Manejo integrado de *R. bunodes* (Berk y Br.)**

Se puede afirmar que la asociación de café con otros cultivos susceptibles al patógeno como yuca y cacao, favorecen la aparición de la enfermedad y hace muy difícil su manejo (López de Oliveira 1992, Castro y Esquivel 1991).

Aranzazu (1992) menciona que el manejo de las enfermedades producidas por hongos del género *Rosellinia* es muy difícil por su carácter de habitante natural de los suelos, además porque los síntomas externos aparecen cuando se ha ocasionado un daño severo al sistema radical.

##### **4.4.1 Control cultural**

En el manejo de las llagas radicales se debe enfatizar en la eliminación de sustratos frescos. Aranzazu y Salazar (1995) insisten en la necesidad de eliminar raíces sanas y enfermas de árboles infectados próximos a morir o recién muertos.

La solarización y aireación del terreno por un período no inferior a 2 meses antes de sembrar, es una práctica necesaria si se desea recuperar suelos infectados (Castro 1992, Cristancho 1992).

##### **4.4.2. Control químico**

En el control de patógenos del suelo, han sido utilizados productos químicos, los cuales reducen temporalmente su incidencia, pero debido al continuo uso, el suelo pierde el equilibrio proporcionado por la competencia microbiana y además se le permite al patógeno producir estructuras de resistencia que le ayudan a sobrevivir en condiciones adversas (Restrepo 1997).

Merchán (1993) afirma que el uso de fungicidas como Captan, Carboxim, Cyproconazole, Metil thiofanato, Oxicarboxin, Tiabendazole, Triadimefon y Tridemorph, incrementan la incidencia y severidad de la enfermedad al favorecer

el desarrollo del patógeno, mediante la reducción de la microflora antagonista.

Hasta el momento se carece de métodos de control químico eficientes para estas enfermedades, pero existen recomendaciones como la eliminación de residuos de árboles producto del desmonte para la incorporación de áreas nuevas en la producción de café (Castro y Esquivel 1991).

Además de las anteriores prácticas surge la posibilidad de manejar la enfermedad empleando y/o preservando la microflora del suelo, estimulando los organismos antagónicos.

#### **4.4.3 Control biológico de hongos del suelo**

Baker y Cook (1974) definen el control biológico como la reducción de un patógeno o de su capacidad para producir la enfermedad logrado por o a través de uno o más organismos excluyendo al hombre. El uso de microorganismos como agentes de control ha despertado mucho interés para la fitopatología en los últimos treinta años.

Andrews (1992) afirma que el control biológico es fundamentalmente ecología aplicada, con la meta específica de manejar una comunidad microbial para favorecer al agente de control y desfavorecer al patógeno.

Las relaciones existentes entre los organismos habitantes del suelo, tienden en condiciones normales a mantener el equilibrio (Finegan 1996). De la misma manera Isaac (1992) menciona que restablecer el equilibrio mediante el control biológico puede deberse a varios factores, entre los que relacionó la baja capacidad competidora de muchos patógenos.

Bull (1987) considera que el control biológico depende del establecimiento y mantenimiento de un umbral poblacional de las bacterias en el material de



siembra o en el suelo; por lo tanto una reducción de la viabilidad puede reducir su eficiencia.

Igualmente Weller (1988), indica que el establecimiento y supervivencia de las bacterias en el suelo depende de factores edáficos que incluyen temperatura, humedad, pH y contenido de arcilla, además de la manera en que las bacterias se cultivan y se formulan, pues se afecta la viabilidad y tolerancia a condiciones adversas una vez aplicadas al suelo.

Son varios los ejemplos que se pueden citar con microorganismos como agentes de control biológico. Kaska (1976) describe a *Serratia marsecens* como una bacteria productora de enzimas, la cual puede ejercer control sobre varios grupos de plagas. Este microorganismo se ha usado para el control de *Xanthomonas campestris*, var. *vignaradiatae* en frijol (Bora et al. 1993).

La bacteria *Pseudomonas cepacia* ha sido utilizada en el control de patógenos foliares (Knudsen y Spur 1987, Homma et al. 1989). El hongo *Trichoderma* spp. ha sido empleado por largo tiempo en el control biológico de varias enfermedades de plantas. Actúa como hiperparásito, como productor de antibióticos o como competidor por nutrientes dadas sus características de rápido crecimiento (Reinecke 1974, Alonso 1994).

Entre los organismos antagónicos a patógenos de suelo se documentan *Trichoderma* spp., micorrizas vesículo arbusculares, *Aspergillus* spp., *Gliocladium* spp. y bacterias del género *Pseudomonas* (Cristancho 1992, Castro 1995, Cattelan 1994, Rivillas 1996).

#### 4.4.3.1 Control biológico de *R. bunodes*

El control biológico de *R. bunodes* con la utilización del antagonista *Trichoderma* spp. mostró buenas posibilidades de aplicación en los sistemas de producción cafeteros (Esquivel *et al.* 1992, Castro 1993).

Actualmente Castro (1997) adelanta trabajos de investigación para cuantificar el efecto de *Trichoderma koningii* (T-3) y *Glomus manihotis* en el control de *R. bunodes*, mientras que López (1997) realiza la evaluación de diferentes sustratos para la multiplicación de *T. koningii* antagonista de *R. bunodes*, y pretende determinar la forma más adecuada de producción y aplicación de este agente biológico.

Igualmente existe gran potencial en el control de este hongo, con bacterias controladoras biológicas, especialmente con *Pseudomonas* fluorescentes con lo que se ampliaría aún más un esquema de Manejo Integrado de las llagas radicales (Valencia 1996).

#### 4.4.3.2 Uso de *Pseudomonas* fluorescentes

El género *Pseudomonas* pertenece a la división Gracillicutea (gram negativos), clase Proteobacteria, subclase Gamma, familia Pseudomonaceae (Montecinos y Beltrá 1996).

Koneman (1989) indica que el género *Pseudomonas* presenta células con forma bacilar, rectos o ligeramente curvos, con un tamaño comprendido entre 0.5 y 1  $\mu\text{m}$  de ancho y 1.5 a 5  $\mu\text{m}$  de largo, gram negativos, aerobios, no formadores de esporas y con movilidad dada por uno o varios flagelos polares.

El metabolismo de las *Pseudomonas* es aerobio y el oxígeno actúa como aceptor de electrones terminales. Estas bacterias degradan la glucosa y otros

carbohidratos por oxidación, producen una amplia variedad de enzimas, entre ellas oxidasas y catalasas, colonizan abundantemente el suelo, plantas y animales ( Krieg y Holt 1984).

Las *Pseudomonas* participan en la nitrificación, proceso microbiológico mediante el cual el  $\text{NH}_4^+$  es oxidado a  $\text{NO}_3^-$  ( Blandón 1996). Igualmente están consideradas como solubilizadoras de fósforo.

Subba (1992) afirma que bacterias como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia* y *Flavobacterium* son de gran importancia pues actúan en la solubilización y asimilación del fósforo.

Kloeper (1974) describe a *Pseudomonas fluorescens* como una bacteria asociada al filoplano y a la rizosfera. Si la bacteria es introducida en la semilla o material de siembra, puede controlar enfermedades patogénicas del suelo y promover el crecimiento al suprimir otros organismos dañinos.

Asímismo, Austin *et al.* (1977) describen los mecanismos que operan en el control biológico con *P. fluorescens*. Como antagonista se cree que reduce en el patógeno la germinación de esporas y crecimiento del tubo germinativo y causa lisis de la hifa, lo cual reduce el desarrollo de la enfermedad.

Existen cepas de *Pseudomonas* spp fluorescentes que producen sideróforos los cuales inhiben el crecimiento de otros microorganismos de las raíces al competir por el hierro disponible en el suelo (Schroth y Hancock 1982).

Especies de *Pseudomonas* como *P. putida* y *P. fluorescens* compiten con los patógenos por el hierro y otros nutrientes disponibles en el suelo, debido a la producción de quelatantes como los sideróforos (Chet 1990, Chao *et al.* 1986).

Los sideróforos son compuestos sintetizados por *Pseudomonas* spp. fluorescentes para la captura del hierro. Los pigmentos hidrosolubles



fluorescentes producidos por estas bacterias actúan como sideróforos (León 1986).

Algunas especies usadas para control biológico producen pioverdina, una pigmentación fluorescente que se difunde en el medio de cultivo (León 1986).

Varios aislamientos de *P. fluorescens* presentan dos tipos de antibióticos fenil pirroclorinados, uno de ellos con acción inhibitoria contra oomicetos (Howell *et al.* 1980). Pueden también tener un efecto inductor, mediante algún producto de su metabolismo que genera en las plantas mecanismos de protección y defensa contra organismos patógenos (Porras 1996).

Cepas de *Pseudomonas* spp. fluorescentes se han usado intensivamente en el control de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. La raza 2-79 se aisló de raíces de trigo y su mecanismo de acción es por antibiosis (Cook 1991).

Pierson y Weller (1994) evaluaron *Pseudomonas* spp fluorescentes en combinación e individualmente para suprimir el crecimiento de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, tanto en cámaras de crecimiento como en invernadero, obteniendo resultados promisorios con algunas mezclas, lo que demuestra los beneficios potenciales de usar *Pseudomonas* spp fluorescentes para suprimir este problema, planteando la importancia de los efectos aditivos e interactivos cuando se introducen bacterias en el control biológico.

Los experimentos de resistencia en plántulas de café mostraron un mejor comportamiento inductor al emplear *Pseudomonas* spp mezcladas que en forma individual, encontrándose correlación entre las pruebas de antagonismo bacteriano y la capacidad inductora de la bacteria (Porras 1996). Los máximos niveles de protección contra la infección por *Hemileia vastatrix* fueron del 67.4%, logrado con la mezcla de *P. alcaligenes* y *P. aureofaciens*.

Este hecho, afirma Porras (1996), comprueba la inducción parcial de resistencia,



ya que el efecto metabólico producido por *Pseudomonas* es asumido lentamente por la planta.

Diversos estudios han demostrado que el grupo de *Pseudomonas* fluorescentes representa un potencial promisorio, no solo para incrementar los rendimientos en el cultivo de la yuca, sino para prevenir las pudriciones radicales en este cultivo (Hernández y Lozano 1985).

*Pseudomonas* spp. han sido aplicadas eficientemente para suprimir *Fusarium oxysporum* en varias especies de plantas; estas bacterias tienen efectos directos e indirectos contra *F. oxysporum* (Lemanceau y Alabouvette 1993, Cattelan 1994).

La inoculación de raíces de tomate con *P. fluorescens* en suelos previamente solarizados suprimió la colonización por *Penicillium pinuphillum* y anuló el retardo en el crecimiento de las plantas. (Gamliel y Katan 1991, 1993). Estos autores sugieren que *P. fluorescens* es un agente efectivo en la supresión de patógenos del suelo.

Varias investigaciones han demostrado que *Pseudomonas* spp. es efectiva contra mal del talluelo ("damping-off") y la pudrición de raíz causada por *Aphanomyces* sp. (Lindell y Parke 1989, Parke *et al.* 1991, Bowers y Parke 1993, King y Parke 1993)

Algunas especies de *Pseudomonas* son usadas como controladores biológicos por la relativa facilidad para su aislamiento, identificación y manejo. Uno de sus ambientes naturales es el suelo, especialmente la materia orgánica y la rizosfera donde se desarrollan más rápidamente en comparación con otras rizobacterias (Howie y Echandi 1985, Anuratha y Gnanamanickam 1990).

Ahl *et al.* (1986), afirman que *Pseudomonas* spp. se establecen en la planta en dos fases: una de adhesión al tejido de la raíz y otra de proliferación y competencia de la bacteria con otros microorganismos.

Bacterias de este tipo pueden ser introducidas en los sistemas radicales y rizosfera de muchos cultivos con el propósito de restablecer el equilibrio (Lozano 1991).

Kim *et al.* (1997) encontraron una excelente persistencia de bacterias como *Bacillus* sp. y *Pseudomonas fluorescens* en la rizosfera de plantas de trigo, inclusive después de 150 días de haber sido inoculadas las semillas con estos microorganismos.

#### **4.4.3.3 Formulación de *Pseudomonas* spp.**

Existen diferentes tipos de sustratos para la multiplicación e incorporación de controladores biológicos al suelo. Desde el descubrimiento de la potencialidad de microorganismos como *Trichoderma* y *Gliocladium* como agentes de control biológico de patógenos del suelo, se han desarrollado trabajos que demuestran la necesidad de incluir una base alimenticia enriquecida con el agente de control biológico, para que su efecto sea efectivo y persistente en el suelo (López 1997).

Dhingra y Sinclair (1994) cultivaron con éxito *Gliocladium roseum* en una mezcla de 75% de turba, 10% de suelo, 10% de hojas en descomposición y 5% de arena.

Una forma común de aplicar microorganismos es a través de formulaciones líquidas. Papavizas *et al.* (1984) reportan el uso de la fermentación líquida para *Gliocladium virens*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma harzianum* utilizando materiales comunes tales como melaza y levadura.

Son pocos los productos registrados por la agencia de protección ambiental (EPA) para control biológico de enfermedades. Cook (1993) menciona el Gastrol-

A, a base de *Agrobacterium agrobacter* K-84 para el control de agallas causadas por *A. tumefaciens* en los cultivos que se presenta esta enfermedad.

Este autor también incluye el Dagger-G a base de *Pseudomonas fluorescens* para el control de enfermedades de plántulas de algodón, el G-21 y Gliogard a base de *Gliocladium virens* contra *Pythium* y *Rhizoctonia*.

El material que se use para las formulaciones debe cumplir con los requisitos necesarios para promover la persistencia del microorganismo. Comúnmente se ha usado turba (Thompson 1980) y suelos minerales (Chao y Alexander 1984).

La turba se ha usado para *P. fluorescens* en la formulación del producto comercial Dagger-G (Weller 1988).

Bashan (1986) menciona el uso de alginato de sodio y leche descremada en forma peletizada para bacterias de los géneros *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas* spp. Este material le confiere ventajas a la formulación, ya que contiene un reservorio de cultivo de bacterias que las libera de forma controlada y a una tasa constante.

La encapsulación con otros materiales también se ha utilizado. Zidack *et al.* (1995) lograron la encapsulación de bacterias gram (-) y hongos usando materiales simples, tales como aceite mineral, almidón de maíz y azúcares en un producto final que es económico y que presenta excelente viabilidad en almacenamiento.

Knudsen y Spurr (1987) han usado polvos mojables o talcos especialmente con bacterias liofilizadas de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* para aplicaciones foliares contra *Cercospora arachidicola*.

Vidhyasekaran y Muthamilan (1995) encontraron que la sobrevivencia de *P. fluorescens* en semillas cubiertas con formulaciones a base de talco permitirían

que este antagonista sea ofrecido a los agricultores en formulaciones para el tratamiento de semilla. Igualmente destacan que la aplicación a la zona de la raíz de *P. fluorescens* formulada a base de turba, incrementó las poblaciones de la bacteria en la rizosfera. Algunas razas de *P. fluorescens* han mostrado buen control de patógenos radicales cuando se aplican al suelo.

En ensayos adelantados por Ramírez (1996) se propone la utilización de turba molida estéril como base sólida para preparar inoculantes de bacterias antagonicas de *Moniliophthora roreri*.

La utilización de sustratos como pulpa de café, cachaza y bagazo de caña fueron probados para la aplicación de *Pseudomonas cepacia* y *Pseudomonas fluorescens* a la zona radical de plantas de banano (Gutiérrez 1996). Este tipo de sustratos, afirma Blandón (1996), actúan directamente sobre los cultivos incrementando la permeabilidad celular. Aportan a las plantas, a través de la descomposición biológica, elementos como N, S y P en formas aprovechables y se convierten a la vez en sustrato para los microorganismos.

Blandón (1996) también encontró que la pulpa de café es un sustrato rico en microorganismos celulolíticos, pectinolíticos y aminolíticos, entre los que destaca las bacterias y los hongos. Entre las bacterias presentes en la pulpa de café sometida a compostaje durante dos meses, la autora encontró *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Streptomyces*.

## 5. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Localización del experimento

El trabajo se realizó en condiciones de laboratorio e invernadero en el Centro Nacional de Investigaciones del Café, CENICAFE, localizado en el municipio de Chinchiná, Colombia, 5° latitud Norte, 75° 36' longitud Oeste, a una altitud de 1420 m.s.n.m., con una temperatura promedio de 20.5 °C , 80% de humedad relativa y una precipitación media de 2540 mm al año.

Pruebas complementarias fueron adelantadas en los laboratorios del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE, ubicado en el Cantón de Turrialba, Costa Rica, 9° 53' latitud Norte, 83° 34' longitud oeste, a una altitud de 602 m.s.n.m., con una temperatura promedio de 22.3 °C, 87.6% de humedad relativa y una precipitación media anual de 2648 mm.

### 5.2 Metodología

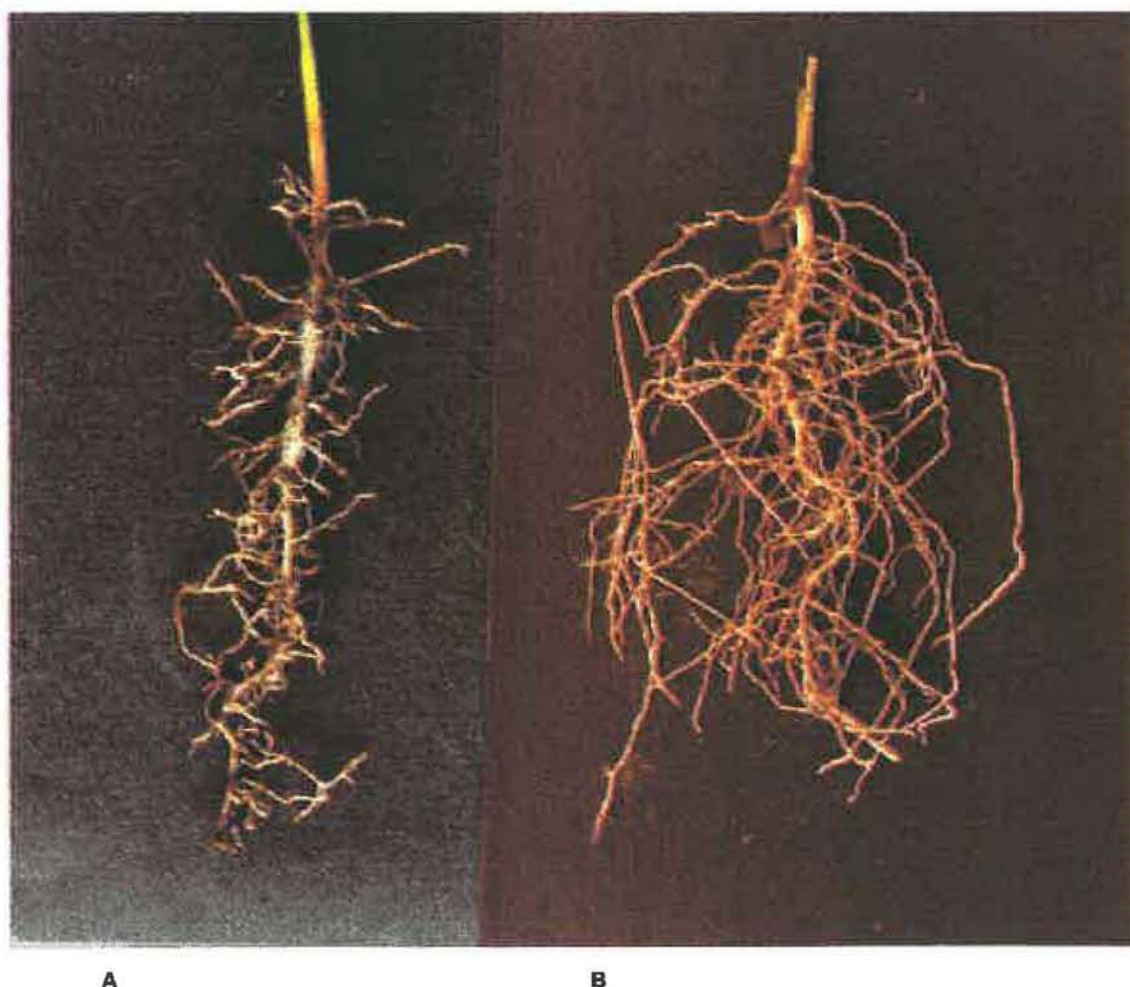
La investigación se efectuó en tres etapas: 1) Aislamiento, identificación y liofilización de *Pseudomonas* fluorescentes. Igualmente preparación de las suspensiones de trabajo de estos aislamientos en leche descremada esterilizada al 5%; 2) Pruebas en invernadero, utilizando plántulas("chapolas") de café de 30 días después de germinación para evaluar el potencial antagónico de bacterias fluorescentes del género *Pseudomonas* sobre el hongo *R. bunodes* y 3) Evaluación de los mejores aislamientos obtenidos en la prueba anterior utilizando un sistema de inoculación que garantizara el establecimiento y persistencia de la bacteria en la rizosfera de las "chapolas" de café (variedad Colombia).



### 5.2.1 Primera etapa

#### Muestreo, Aislamiento e Identificación de *Pseudomonas fluorescentes*

Para dar cumplimiento a este objetivo, muestras de raíces de árboles de café variedad Colombia de 3-4 años, sanos y muestras de raíces de árboles con sintomatología inicial de *R. bunodes*, fueron recolectadas en las fincas La Merced y Santa Inés del municipio de Palestina, Caldas.



**Figura 3.** A. Raíces de plántulas de cafeto con micelio (uno de los signos característicos del patógeno). B. Raíces sanas. Cenicafé, Colombia. 1997. (foto G. Hoyos.)

## Procesamiento de las muestras

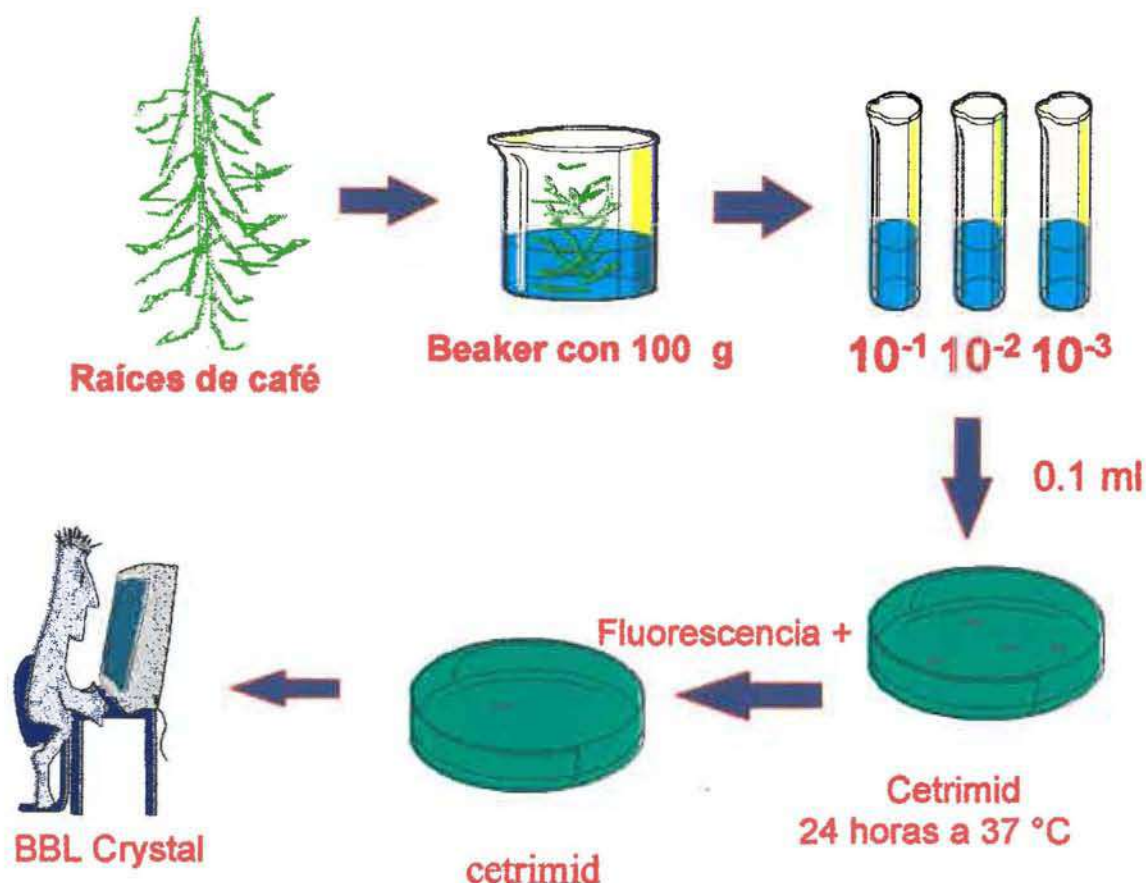
Las raíces fueron empacadas y rotuladas en bolsas plásticas para su procesamiento en el laboratorio de la siguiente manera (fig. 4):

- Las raíces fueron sacudidas con el propósito de retirar el exceso de suelo.
- Se cortaron en fracciones de 8-10 cm, incluyendo algunas raíces gruesas y la gran mayoría de raíces secundarias y terciarias.
- 100 g de raíces se colocaron en un beaker y se aforó con agua destilada estéril hasta 500 c.c.
- El beaker se sometió a agitación durante 20 min. a 150 r.p.m.
- De éste se tomaron 10 ml para iniciar el proceso de diluciones hasta  $10^{-3}$
- De cada dilución se tomaron 0.1 ml para ser sembrados (técnica de superficie) en 1 caja servida con el medio de cultivo Cetrimid Agar, el cual es específico para *Pseudomonas* fluorescentes.
- Las cajas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h.
- Posteriormente se realizó una selección de colonias utilizando como parámetro principal la fluorescencia de éstas, la cual fue verificada en una lámpara de luz ultravioleta de 365 nm.
- Las colonias con fluorescencia fueron repicadas en Cetrimid e incubadas a 27 °C durante 24 h.

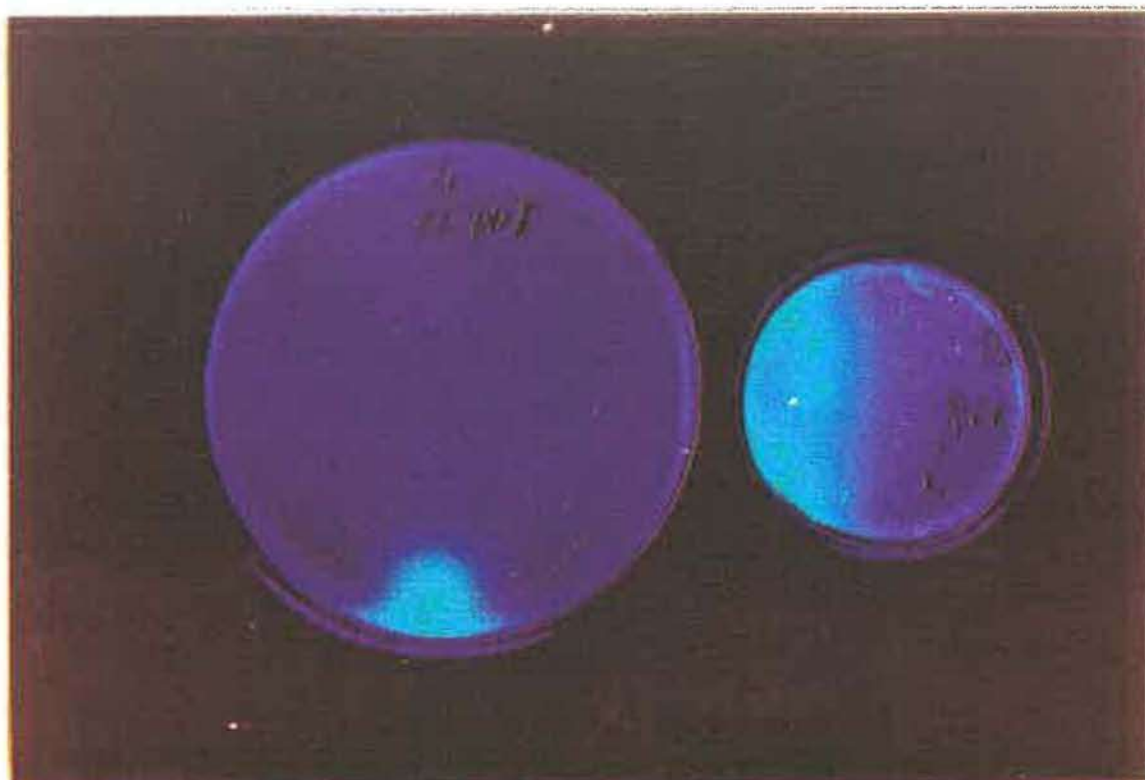
De nuevo se verificó la fluorescencia (fig. 5) para iniciar el proceso de identificación utilizando el sistema BBL Crystal E/NF para identificación de bacilos gram negativos fermentadores y no fermentadores.

El sistema "BBL Crystal" es un método que utiliza sustratos cromógenos y convencionales modificados (Becton Dickinson Microbiology Systems, Maryland U.S.A.)

- Paralelamente al segundo repique y en caso de fluorescencia (fig. 5), fueron realizadas pruebas convencionales de tinción de gram, oxidasa, indole, movilidad, nitrato, citrato, LIA, urea, TSI y OF(maltosa, rafinosa, dextrosa, galactosa, manosa, lactosa) para mayor confiabilidad en el proceso de identificación.



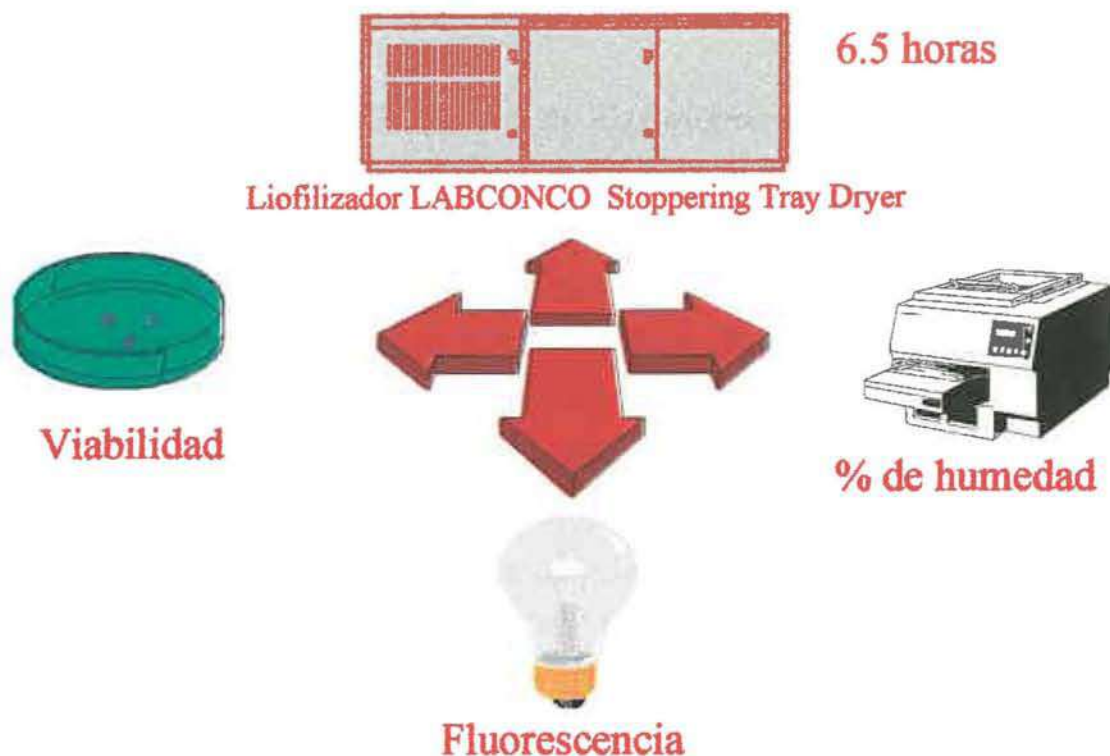
**Figura 4.** Proceso de aislamiento e identificación de *Pseudomonas* fluorescentes. Cenicafé, Colombia. 1997.



**Figura 5.** *Pseudomonas cepacia* en medio agar-cetrimid 24 horas después de la siembra. Se puede apreciar la fluorescencia de la colonia. Cenicafé, Colombia. 1997. (foto G. Hoyos).

Una vez identificadas, fueron preparadas suspensiones bacteriales en leche descremada al 10%, para someterse a liofilización durante 6.5 horas utilizando el liofilizador LABCONCO Stoppering Tray Dryer.





**Figura 6.** Verificación de la calidad de la liofilización. Cenicafé, Colombia. 1997.

Veinticuatro horas después de liofilizadas se confirmó su viabilidad, reactivando la muestra con 1 ml de agua destilada estéril y posterior siembra en ceftrimid-agar e incubación a 27 °C durante 24 horas.

Igualmente se verificó la fluorescencia de la muestra reactivada, exponiéndola a luz U.V. y su porcentaje de humedad utilizando el analizador halógeno de humedad Mettler Toledo HR 73 (fig. 6).



### 5.2.2 Segunda etapa

#### Evaluación del efecto antagónico de *Pseudomonas fluorescentes* sobre *Rosellinia bunodes*

Fueron realizadas pruebas de antagonismo en condiciones de invernadero. Para ello se partió de un aislamiento patogénico de *R. bunodes* extraído de raíces de plántulas de café de 6 meses. El medio de cultivo utilizado para obtener el patógeno fue Agar-extracto de malta acidificado con ácido láctico al 37% (Castro 1997) (fig. 7). En este medio se determinó la tasa de crecimiento diario de *R. bunodes*, colocando en una caja de petri una fracción de micelio del hongo al cual, luego de tres días y durante los siguientes ocho días, se le midió su crecimiento (en cm). Como unidad experimental se utilizó una caja petri con 20 repeticiones. El diseño utilizado fué completamente al azar. El experimento se realizó bajo las condiciones ambientales del laboratorio ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) y proporcionando oscuridad constante al material experimental.



**Figura 7.** Micelio de *Rosellinia bunodes* en Agar extracto de malta (AEM).  
Cenicafé, Colombia. 1997. (foto G. Hoyos).

## Inoculación de la bacteria

En esta segunda etapa fueron utilizados como tratamientos 4 de los 8 aislamientos encontrados en la primera etapa y codificados como PC 9701, PC 9702, PC 9703 y PC 9704, más 4 aislamientos facilitados por el CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) codificados como F87, C88, PO3 y PO5. (cuadro de tratamientos segunda etapa).

Para evaluar el efecto antagónico de estos aislamientos se siguió el siguiente procedimiento: fueron tomadas por cada aislamiento 50 "chapolas" de café variedad Colombia, sembradas en vasos desechables de 300 g en suelo previamente esterilizado en CIAT con vapor de agua proveniente de caldera a 80 °C durante dos h.

La raíz de cada "chapola" fue sumergida durante 24 horas en 30 ml de la suspensión del aislamiento de *Pseudomonas* (concentración de  $10^9$  ufc/ml), luego de ser preparada en leche descremada esterilizada al 5%. (para la preparación fue utilizada una caja petri con cetrimid-agar en el cual se sembró el aislamiento y se incubó durante 24 horas a 27 °C). Luego de este tiempo la "chapola" fue sembrada en el vaso y cinco días después se inoculó con el hongo *R. bunodes* (fig. 8).



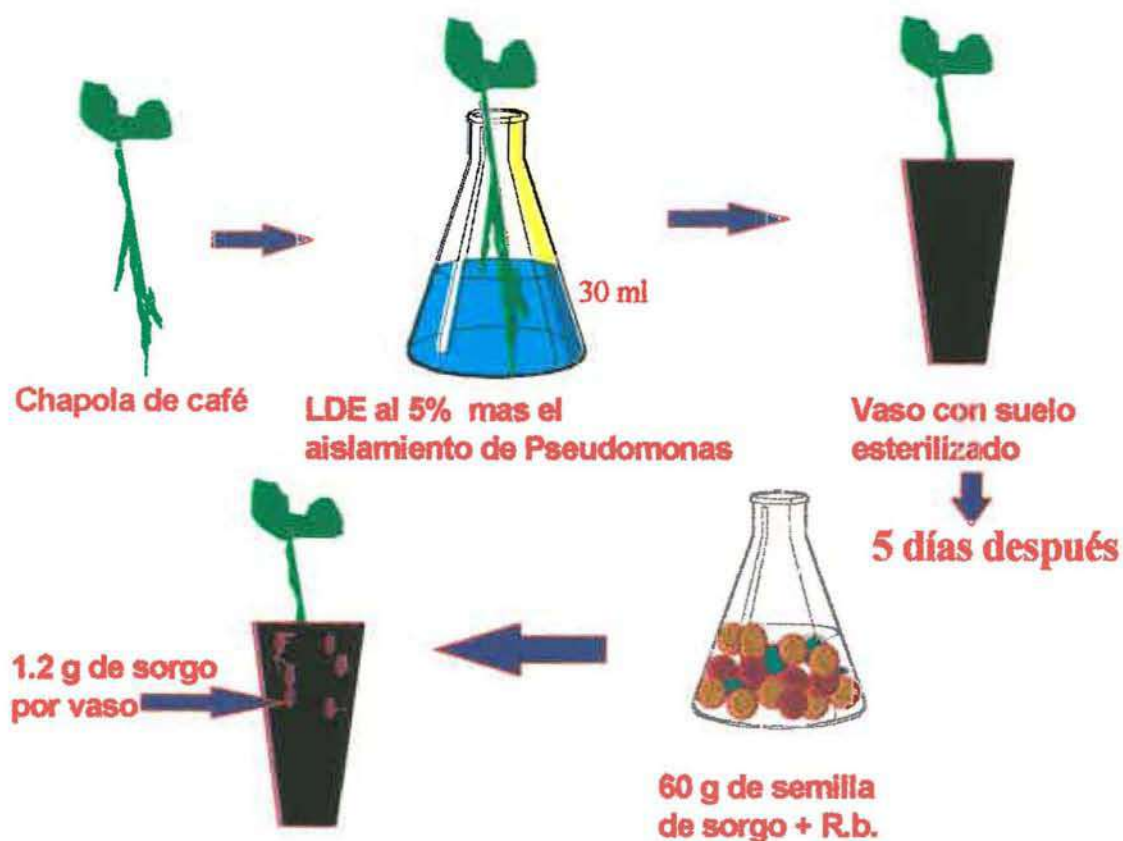
**Figura 8.** Plántula de café var. Colombia 50 días después de ser sembrada en suelo estéril. Cenicafé, Colombia. 1997. (foto G. Hoyos).

### **Inoculación del patógeno**

Un aislamiento de *R. bunodes* cuya patogenicidad fue probada en plántulas de café, variedad Colombia de 6 meses de edad, se incrementó en semilla de sorgo. Con este propósito se utilizaron 60 g de sorgo y 20 ml de agua destilada por erlenmeyer, esterilizando el sorgo durante 30 min. a 121 °C.

Luego se inoculó la semilla de sorgo con fracciones de 1 cm<sup>2</sup> de crecimiento micelial del hongo en AEM y posteriormente se dejó en incubadora a 27 °C y en completa oscuridad. A los 12 días, cuando se presentó un completo cubrimiento del sorgo por el patógeno, éste se utilizó como inoculante.

Fueron utilizados 4 g de semilla de sorgo con *R. bunodes* por Kg de suelo esterilizado. La incorporación al suelo de la semilla de sorgo colonizada por *R. bunodes* en la dosis antes indicada, se realizó colocando la semilla ligeramente enterrada alrededor de la "chapola" y se cubrió luego, con suelo de la parte superior del vaso (fig.9).



**Figura 9.** Inoculación de las "chapolas" de café con el antagonista y el patógeno. Cenicafé, Colombia. 1997.

### Cuadro de Tratamientos segunda etapa:

TRATAMIENTO	DESCRIPCION
1	PC 9701 + <i>R. bunodes</i>
2	PC 9702 + <i>R. bunodes</i>
3	PC 9703 + <i>R. bunodes</i>
4	PC 9704 + <i>R. bunodes</i>
5	F 87 + <i>R. bunodes</i>
6	PO3 + <i>R. bunodes</i>
7	PO5 + <i>R. bunodes</i>
8	C 88 + <i>R. bunodes</i>
9	Testigo absoluto (sin inoculación)
10	Testigo de referencia ( <i>R. bunodes</i> )
11	Testigo inoculado con PC 9701
12	Testigo con sustrato(LDE) + <i>R. bunodes</i>

Una vez inoculadas las “chapolas” de café con *R. bunodes* fueron realizadas 7 evaluaciones de mortalidad de plantas (%) con intervalo de 5 días. (fig. 10).

El efecto de tratamientos fue evaluado bajo el modelo de análisis para un diseño experimental completamente aleatorizado en la variable mortalidad de plantas (%). La unidad experimental estaba conformada por 10 “chapolas” y por tratamiento se tuvieron 5 repeticiones. Para evaluar el efecto de tratamientos se utilizó la prueba de tukey al nivel del 5%. Igualmente se utilizó el modelo matemático área bajo la curva de progreso de la enfermedad expresada como  $ABCPE = \sum (y_i + y_{i+1})/2 \times dt_i$  (Rivas 1996).





**Figura 10.** Disposición de los tratamientos en el invernadero. Cenicafé, Colombia. 1997. (foto G. Hoyos).

### 5.2.3 Tercera etapa

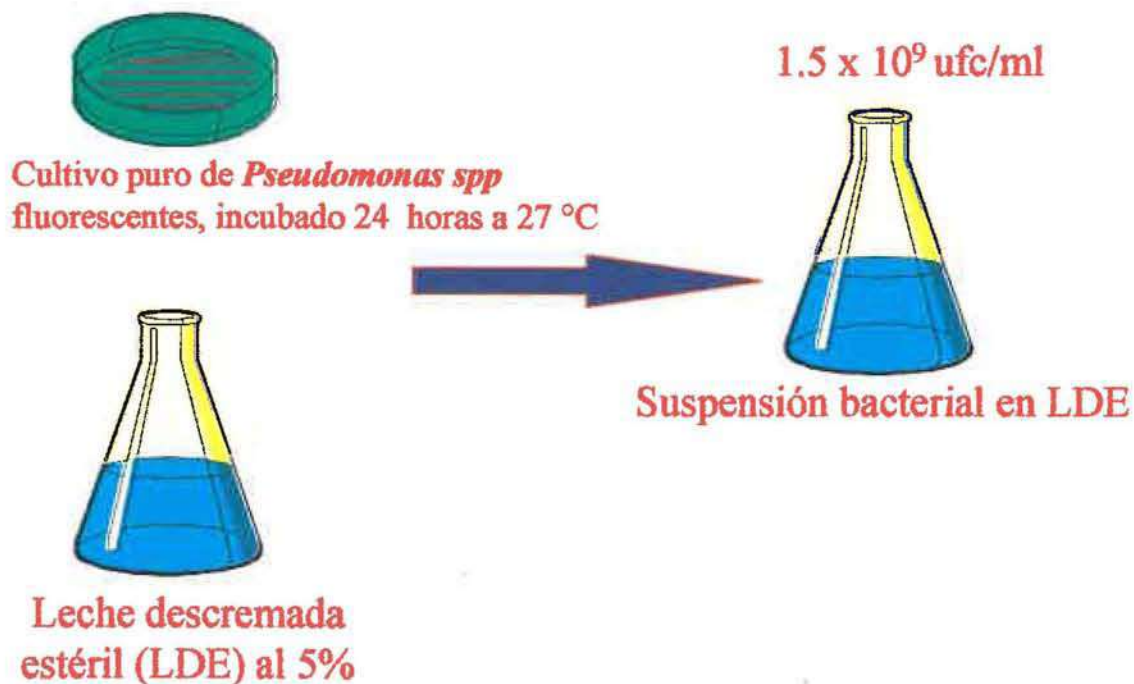
#### **Evaluación de la persistencia en la rizosfera de los aislamientos de *Pseudomonas* más promisorios y verificación de su efecto antagónico sobre *R. bunodes***

Se realizaron pruebas de antagonismo en condiciones de invernadero utilizando “chapolas” de café variedad Colombia, las cuales fueron inoculadas con los aislamientos PC 9701 y C 88 (estos 2 aislamientos mostraron control sobre el patógeno en la segunda etapa), al momento de la siembra en vasos desechables de 300 g. (cuadro de tratamientos tercera etapa).

El suelo utilizado fue previamente esterilizado de igual manera como en la etapa anterior.

### **Preparación e inoculación de los aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes**

Los aislamientos fueron preparados en leche descremada estéril al 5%, con el objeto de garantizar su establecimiento y persistencia una vez dejados en contacto con la raíz de las "chapolas". (fig. 11).



**Figura 11.** Preparación de la suspensión bacteriana partiendo de un cultivo de 24 horas en leche estéril al 5%. Cenicafé, Colombia. 1997.

A los cultivos puros de cada uno de los 2 aislamientos se les realizó un conteo de unidades formadoras de colonias por mililitro. La concentración fue  $1.5 \times 10^9$  ufc/ml.

La inoculación con los 2 aislamientos se realizó al momento de la siembra y 15 días después fue inoculado el patógeno de manera similar como en la etapa anterior.

#### Cuadro de Tratamientos tercera etapa:

TRATAMIENTOS	DESCRIPCION
1	PC 9701 + <i>R. bunodes</i>
2	C 88 + <i>R. bunodes</i>
3	PC 9701 y luego lavado de la raíz + <i>R. bunodes</i>
4	C 88 y luego lavado de la raíz + <i>R. bunodes</i>
5	PC 9701 incrementada en pulpa de café + <i>R. bunodes</i>
6	Testigo absoluto(sin inoculación)
7	Testigo referencia con <i>R. bunodes</i>

Los tratamientos 3 y 4 se utilizaron como testigos para inducción de resistencia. Las raíces de las "chapolas" de estos tratamientos fueron lavadas con hipoclorito de sodio al 0.5% 24 h después de ser sumergidas en la suspensión bacteriana y 15 días después fueron inoculadas con *R. bunodes*.

Se incluyó un testigo inoculando las "chapolas" con el aislamiento PC 9701 incrementado en pulpa de café, la cual había sido sometida a compostaje durante 2 meses. La bacteria se suspendió en LDE al 5% y 24 h después se colocó de manera uniforme en la pulpa. Una vez que transcurrieron 24 h se dispusieron 30 g. de pulpa inoculada en cada "chapola".

Para todos los tratamientos después de inoculadas las bacterias, se incorporó *R. bunodes* utilizando 4 g / Kg. de suelo.



Las variables evaluadas fueron peso seco, altura y mortalidad de las "chapolas" hasta los 50 DDI con *R. bunodes*.

El efecto de tratamientos se evaluó bajo un modelo de análisis para un diseño experimental completamente aleatorizado en la variable mortalidad de las "chapolas" (%). Para las variables peso seco y altura de las plantas se realizó un análisis descriptivo.

La unidad experimental estuvo conformada por 10 "chapolas" y para cada tratamiento se tuvieron 5 unidades experimentales. Para evaluar el efecto de tratamientos fue utilizada la prueba de Tukey al nivel del 5%.

Adicionalmente se verificó la persistencia de la bacteria, realizando aislamientos de ella a nivel de la rizosfera a los 15, 30, 45 y 60 DDI (días después de la inoculación), siguiendo el mismo procedimiento utilizado en la primera etapa. A los 15 y 30 días se realizó el recuento de UFC/g de raíz.

Como prueba complementaria a nivel de laboratorio se evaluó el efecto antagónico ejercido por el aislamiento PC 9701 sobre el micelio de *R. bunodes*. Con tal fin fueron evaluadas 4 diferentes cantidades del inóculo bacterial en cajas petri conteniendo AEM sin acidificar. Se incluyó también un testigo solo con *R. bunodes*. Cada tratamiento correspondió a una diferente cantidad de inóculo de PC 9701 en la caja de petri alrededor del micelio del patógeno (T1: 0,1 ml, T2: 0,05 ml, T3: 0,025 ml, T4: 0,0125 ml, T5 testigo sin inóculo de PC 9701). Se utilizó un diseño completamente aleatorizado. La unidad experimental fue la caja petri y por cada unidad experimental se tuvieron 5 repeticiones. La variable medida crecimiento micelial del patógeno cada 24 h.

La prueba de Tukey al 5% se utilizó para detectar diferencias entre promedios de tratamientos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Muestreo y aislamiento de *Pseudomonas* fluorescentes.

De un total de 162 cajas de petri, en 3 diferentes medios de cultivo, se obtuvieron 33 colonias con fluorescencia(20.4%)(cuadro 1).

De las 33 colonias con fluorescencia, 29(87.9%) fueron obtenidas utilizando la metodología uno. Las 4 colonias restantes(12.1%) se aislaron con la metodología dos. Una tercera metodología de aislamiento colocando pequeños trozos de raíces sobre los tres medios utilizados, no permitió el aislamiento de colonias con fluorescencia.

En cuanto a los tres medios de cultivo evaluados, en Cetrimid se obtuvo el 90.9% de las colonias con fluorescencia (30 colonias). En medio agar-sangre se obtuvieron 2 colonias fluorescentes (6.1%), mientras que en Agar F solo se aisló una colonia.

De los dos tipos de raíces, tanto de árboles enfermos como sanos, 15 colonias con fluorescencia se aislaron de raíces de árboles afectados por *R. bunodes* y las 18 restantes (54.6%) de árboles sanos.

De las 33 colonias obtenidas, el 18.2% (6 colonias), además de fluorescentes, reaccionaron oxidasa positiva e índole negativo, requisitos indispensables para continuar el proceso de identificación de microorganismos tipo *Pseudomonas* fluorescentes.



**Cuadro 1. Tipificación por tinción de gram y oxidasa de colonias que presentaron fluorescencia en la lámpara de luz ultravioleta de 365 n.m. Cenicafé, Colombia. 1997.**

Colonia	Fluoresc.	Metodol.	Medio	Arbol	Dilución	T. gram	Oxidasa
1	+	1	CET	E	$10^{-3}$	B -	+
2	+	2	CET	S	$10^{-1}$	B -	+
3	+	2	AF	S	$10^{-2}$	B -	+
4	+	1	CET	E	$10^{-3}$	B -	+
5	+	1	CET	E	$10^{-2}$	B -	+
6	+	1	CET	E	$10^{-2}$	B -	+
7	+	1	CET	E	$10^{-2}$	B -	+
8	+	1	CET	E	$10^{-2}$	B -	-
9	+	1	CET	E	$10^{-2}$	B -	+
10	+	1	CET	E	$10^{-3}$	B -	+
11	+	1	CET	E	$10^{-3}$	B -	+
12	+	1	CET	S	$10^{-3}$	B -	+
13	+	1	CET	S	$10^{-2}$	B -	+
14	+	1	CET	S	$10^{-2}$	B -	-
15	+	1	CET	S	$10^{-2}$	B -	-
16	+	1	CET	S	$10^{-1}$	B -	-
17	+	1	CET	S	$10^{-1}$	B -	+
18	+	1	CET	S	$10^{-2}$	B -	+
19	+	1	CET	S	$10^{-1}$	B -	+
20	+	1	CET	S	$10^{-1}$	B -	-
21	+	1	CET	S	$10^{-3}$	B -	+
22	+	1	CET	E	$10^{-2}$	B -	+
23	+	1	CET	S	$10^{-1}$	B -	+
24	+	1	CET	S	$10^{-1}$	B -	-
25	+	1	CET	E	$10^{-1}$	B -	+
26	+	1	CET	E	$10^{-1}$	B -	-
27	+	1	CET	S	$10^{-2}$	B -	+
28	+	1	CET	S	$10^{-2}$	B -	+
29	+	1	CET	E	$10^{-2}$	B -	+
30	+	2	AS	S	$10^{-1}$	B -	-
31	+	2	AS	S	$10^{-1}$	micelio	sin prueba
32	+	1	CET	E	$10^{-1}$	B -	débil
33	+	1	CET	E	$10^{-1}$	B -	-
testigo	+	--	--	--	--	B -	+

Metodología 1. 100 g. de raíces en 500 ml de ADE.

Metodología 2. Igual a 1, pero lavando las raíces con hipoclorito de sodio al 5%.

Medios de cultivo Cetrimid(CET), Agar F(AF), Agar sangre(AS).

S - Arbol sano. E - Arbol enfermo.

## 6.2 Identificación de los microorganismos aislados.

En el cuadro 2 se aprecián los resultados del proceso de identificación de colonias de bacterias obtenidas en los muestreos realizados en las fincas La Merced y Santa Inés. 6 colonias reaccionaron oxidasa positiva e índole negativo, una de ellas fue identificada como *Chromobacterium violaceum*, 4 como *P. cepacia* y 1 como *P. aeruginosa*.

**Cuadro 2. Identificación de 6 bacterias seleccionadas por su reacción oxidasa positiva e índole negativo y procedentes de aislamientos realizados en raíces de café. Cenicafé, Colombia. 1997.**

Colonia	Código	Movilidad	Perfil	Identificación	Confiabilidad (%)
	Cenicafé				
3	PC9702	+	7412311153	<i>Pseudomonas cepacia</i>	100
1	PC9701	*d	7413311113	<i>Pseudomonas cepacia</i>	96
19	PC9703	-	7413311153	<i>Pseudomonas cepacia</i>	100
6	ChV 01	-	2003311113	<i>Chromobacterium violaceum</i>	100
21	PC9704	+	7413311153	<i>Pseudomonas cepacia</i>	100
25	PA9701	-	3003111113	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	79.6

\*débil

Como microorganismos complementarios para las pruebas de antagonismo en invernadero, fueron utilizados 4 de los 10 aislamientos facilitados por el CIAT. En el cuadro 3, se muestran los resultados del proceso de identificación, el cual permitió seleccionar los aislamientos F 87, C 88, PO3 y PO5.

**Cuadro 3. Pruebas de identificación de 10 aislamientos bacteriales facilitados por CIAT. Cenicafé, Colombia. 1997.**

Cepa	Fluo <sup>1</sup>	Oxid <sup>2</sup>	Indo <sup>1</sup>	Movil <sup>3</sup>	Perfil	Identificación	Confia <sup>4</sup> (%)
C 5a	+	+	-	+	7433311351	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	77.8
						<i>Pseudomonas cepacia</i>	22.14
PO 4	+	+	-	+	3403313113	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44.51
						<i>Pseudomonas putida</i>	35.01
F 69	+	+	-	+	3713333313	<i>Xanthomonas maltophilia</i>	96.23
						<i>Pseudomonas cepacia</i>	2.0
PO 5	-	+	-	+	7413211353	<i>Pseudomonas cepacia</i>	99.5
PO 3	-	+	-	+	3633333373	<i>Pseudomonas cepacia</i>	97.62
PO 2	+	+	-	+	3613311353	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	74.14
						<i>Pseudomonas cepacia</i>	25.37
C 88	+	+	-	+	7633333313	<i>Pseudomonas cepacia</i>	98.97
PO 1	-	+	-	+	3413311313	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	96.2
						<i>Pseudomonas cepacia</i>	1.9
PP 44	-	-	-	+	7601330122	<i>Xanthomonas maltophilia</i>	97.24
F 87	+	+	-	-	7433311373	<i>Pseudomonas cepacia</i>	97.68
						<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.4

1. Fluorescencia en medio ceftrimid agar.

2. Prueba de oxidasa.

3. Movilidad de la bacteria.

4. Confiabilidad de la prueba dada por "BBL Crystal".

Con el propósito de confirmar la identificación de algunos de los microorganismos presentes en la pulpa de café sometida a compostaje, se complementaron con el método "BBL Crystal", los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas por Blandón(1996) (Cuadro 4.). Estos resultados fueron el soporte para la utilización de la pulpa como sustrato de multiplicación e inoculación de los aislamientos evaluados en la tercera etapa.

**Cuadro 4. Identificación de algunas de las bacterias presentes en la pulpa de café conocidas como posibles antagonistas. Cenicafé, Colombia. 1997.**

Cod.	Gram	Oxi <sup>1</sup>	In <sup>2</sup>	Perfil	Identificación	Con <sup>3</sup> (%)
Q.I.1	B-	-	-	2222222232	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	99.0
Q.I.2	B-	+	-	7732233373	<i>Pseudomonas cepacia</i>	88.5
Q.I.3	B-	+	-	7777356557	<i>Serratia marcescens</i>	99.8
Q.I.4	B-	+	-	3332232333	<i>Pseudomonas cepacia</i>	72.6

1. Prueba de oxidasa.

2. Reacción indol.

3. Confiabilidad de la prueba dada por "BBL Crystal".

### 6.3 Conservación de los aislamientos de *Pseudomonas* spp fluorescentes

Una vez identificadas las bacterias aisladas en el Centro Nacional de Investigaciones del Café, Cenicafé y las facilitadas por el CIAT, se sometieron al proceso de liofilización con el fin de garantizar su conservación y poderlas utilizar posteriormente en las pruebas en el experimento en condiciones de invernadero. En el cuadro 5 se presentan los resultados del control de calidad efectuado al proceso de liofilización. Todos los aislamientos fueron viables y la humedad de las muestras inferior a 5%.



**Cuadro 5. Pruebas de viabilidad, fluorescencia y humedad efectuada 24 horas después de la liofilización, a los 8 aislamientos de *P. cepacia* seleccionados para la segunda etapa. Cenicafé, Colombia. 1997.**

Aislamientos	Viabilidad	Fluorescencia	Humedad (%)
PC 9701	+	+	4.40
PC 9702	+	+	4.83
PC 9703	+	—	4.59
PC 9704	+	+	4.59
PO5	+	—	4.83
F 87	+	+	4.59
C 88	+	+	4.83
PO3	+	—	4.59

#### 6.4 Pruebas de antagonismo en condiciones de invernadero

El cuadro 6 muestra los resultados del análisis de suelo de la finca La Merced, así como del suelo utilizado en las pruebas de antagonismo. En ambos casos los contenidos de materia orgánica, hierro y la textura Franco Arenosa (FA), condiciones indispensables para el establecimiento de microorganismos como *Pseudomonas*, están en los límites apropiados para el cultivo.



**Cuadro 6. Análisis de suelos para uno de los sitios donde se realizaron muestreos y para el utilizado en los experimentos a nivel de invernadero. Cenicafé, Colombia. 1997.**

Análisis	Muestra 1204	Muestra 1205
pH	5.1	5.8
M.O	9.6	9.6
CIC	16	16
K	0.67	0.44
Fe	205	173
Cu	9	10
N	0.39	0.39
Ca	1.9	1.9
P	13	6
Mg	1.0	0.8
Text.	F.A.	F.A.

Muestra 1204: Finca la Merced, Palestina, Caldas. Muestra 1205: Suelo estación Cenicafé, La Granja.

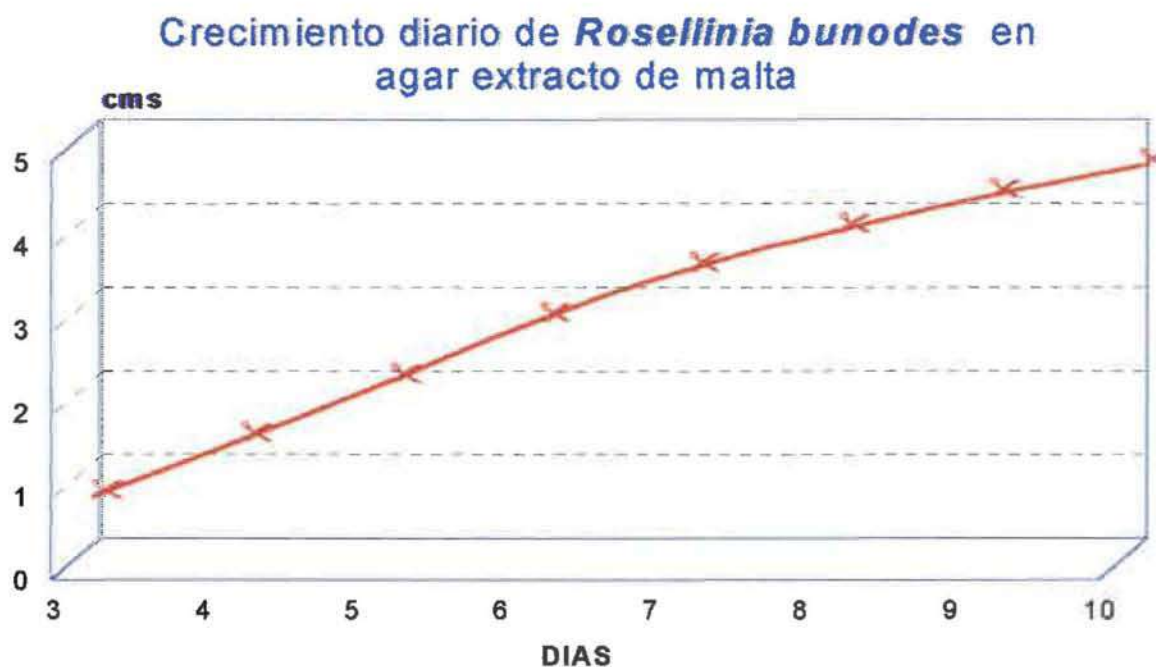
### 6.5 Tasa de crecimiento diario de *R. bunodes* en medio AEM

En condiciones de laboratorio, con una temperatura promedio de  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  y en oscuridad permanente, el crecimiento diario de *R. bunodes* en AEM midió 0.57 cm con un coeficiente de variación de 6.99. Al cabo de 10 días el crecimiento acumulado fue 4.56 cm con un coeficiente de variación de 11.77. (cuadro 7 y figura 12).

Las primeras lecturas mostraron un crecimiento promedio de 0.70 cm/día con un coeficiente de variación entre 30.26 y 47.80%. En las lecturas 6, 7 y 8 el crecimiento promedio fue 0.38 y el coeficiente de variación estuvo entre 11.77 y 13.31%

**Cuadro 7. Crecimiento diario del micelio de *Rosellinia bunodes* en AEM. Cenicafé, Colombia. 1997.**

Lectura (dias)	Crecimiento micelial (cms)	C.V.
1	0.61	47.80
2	1.29	42.11
3	2.00	30.26
4	2.73	20.92
5	3.33	16.50
6	3.79	13.31
7	4.20	11.50
8	4.56	11.77



**Figura 12. Curva de crecimiento diario de *R. bunodes* en medio AEM. Cenicafé, Colombia. 1997.**

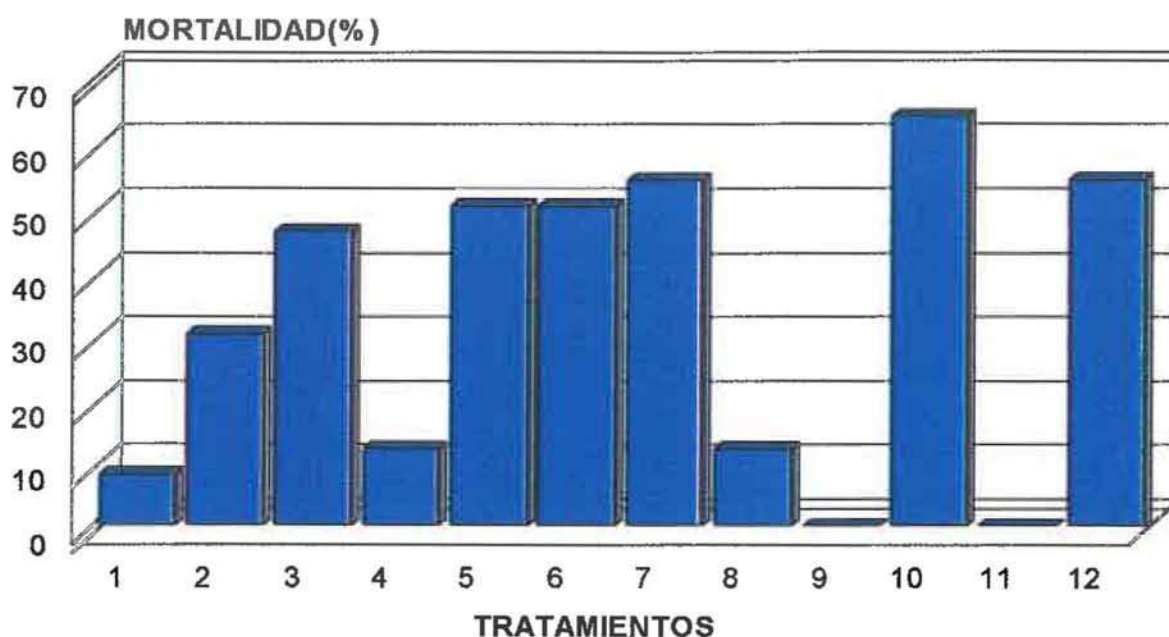
## 6.6 Evaluación del antagonismo de *Pseudomonas fluorescens* sobre *R. bunodes*.

En el Cuadro 8 y la Figura 13 se observa el porcentaje de mortalidad de las chapolas de café en condiciones de invernadero 20 días después de la inoculación (DDI) con el patógeno. (coeficiente de variación 52.60%). Sobresalen los tratamientos 1, 4 y 8 con porcentajes de mortalidad inferiores al 15%. Los tratamientos testigos inoculados con *R. bunodes* presentaron mortalidades superiores al 50%.

**Cuadro 8. Mortalidad de "chapolas" de café 20 DDI con *R. bunodes*.  
Cenicafé, Colombia. 1997.**

Tratamiento		Mortalidad (%)
1.	PC 9701 + <i>R.bunodes</i>	8 c
2.	PC 9702 + <i>R.bunodes</i>	30 abc
3.	PC 9703 + <i>R.bunodes</i>	46 ab
4.	PC 9704 + <i>R.bunodes</i>	12 bc
5.	F 87 + <i>R.bunodes</i>	50 a
6.	P03 + <i>R.bunodes</i>	50 a
7.	P05 + <i>R.bunodes</i>	54 a
8.	C 88 + <i>R.bunodes</i>	12 bc
9.	testigo absoluto	0 c
10.	testigo ref. con <i>R.bunodes</i>	64 a
11.	LDE 5% + PC 9701	0 c
12.	LDE 5% + <i>R.bunodes</i>	54 a

Tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa (Tukey 5%).



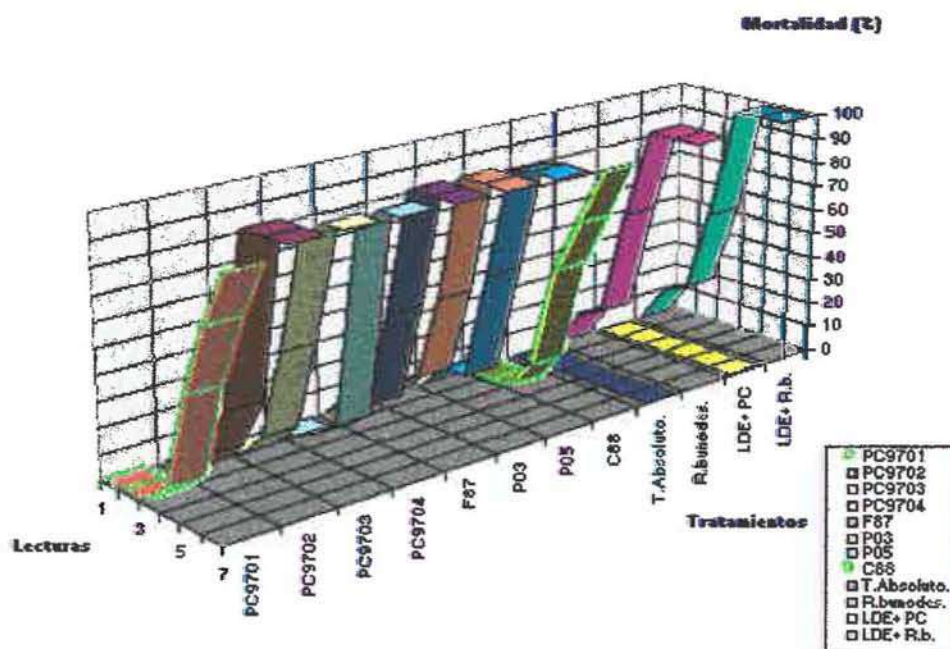
**Figura 13.** Mortalidad de “chapolas” de café en los diferentes tratamientos 20 DDI con *R. bunodes*. Cenicafé, Colombia. 1997.

El Cuadro 9 y la Figura 14 muestran el porcentaje de mortalidad de las “chapolas” de café 35 DDI con el patógeno. (coeficiente de variación 2.46%,  $R^2$  0.99). Aunque ninguno de los tratamientos presenta diferencia significativa con el testigo de referencia, el área bajo la curva de progreso de la mortalidad a lo largo de 7 lecturas, es menor para los tratamientos 1(PC9701) y 8 (C88).

**Cuadro 9. Mortalidad de "chapolas" de café 35 DDI con *R. bunodes*.  
Cenicafé, Colombia. 1997.**

Tratamiento		Mortalidad (%)
1.	PC 9701 + <i>R. bunodes</i>	96 a
2.	PC 9702 + <i>R. bunodes</i>	100 a
3.	PC 9703 + <i>R. bunodes</i>	100 a
4.	PC 9704 + <i>R. bunodes</i>	100 a
5.	F 87 + <i>R. bunodes</i>	100 a
6.	P03 + <i>R. bunodes</i>	100 a
7.	P05 + <i>R. bunodes</i>	100 a
8.	C 88 + <i>R. bunodes</i>	98 a
9.	testigo absoluto	0 b
10.	testigo ref. con <i>R. bunodes</i>	100 a
11.	LDE 5% + PC 9701	0 b
12.	LDE 5% + <i>R. bunodes</i>	100 a

Tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa (Tukey 5%).  $R^2$  0.99.



**Figura 14. Curvas de progreso de la mortalidad de "chapolas" de café en los diferentes tratamientos hasta los 35 DDI con *R. bunodes*. Cenicafé, Colombia. 1997.**

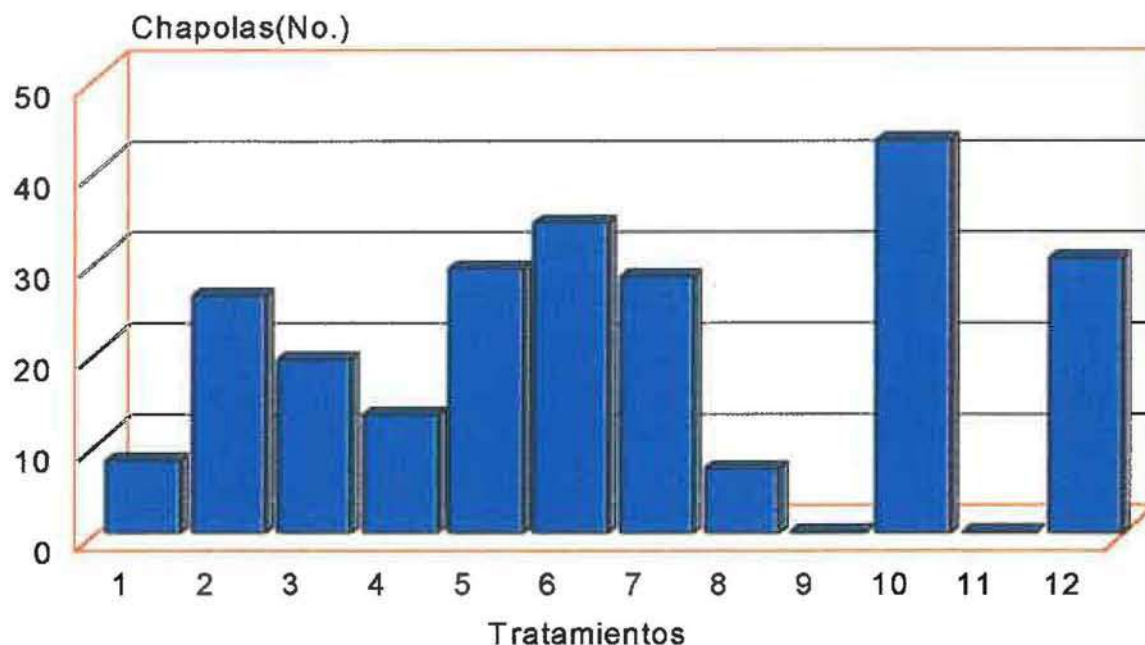


Luego de la última lectura de mortalidad, se cuantificó el número de "chapolas" que además de estar cloróticas presentaban tejido foliar necrótico. El cuadro 10 y la Figura 15 ilustran la calificación de tejido necrótico las "chapolas" 35 DDI con *R. bunodes*. Solo en los tratamientos 1 y 8 menos del 20% de las "chapolas" mostraron esta afección.

**Cuadro 10. Número de "chapolas" con tejido foliar necrótico presente en 5 repeticiones 35 DDI con *R. bunodes*. cenicafé, Colombia. 1997.**

TRATAMIENTOS	R1	R2	R3	R4	R5	total
1. PC 9701 + <i>R. bunodes</i>	0	2	3	1	2	8
2. PC 9702 + <i>R. bunodes</i>	6	5	6	5	4	26
3. PC 9703 + <i>R. bunodes</i>	5	2	3	4	5	19
4. PC 9704 + <i>R. bunodes</i>	4	3	2	1	3	13
5. F 87 + <i>R. bunodes</i>	6	4	4	8	7	29
6. PO3 + <i>R. bunodes</i>	4	7	4	9	10	34
7. PO5 + <i>R. bunodes</i>	5	2	7	8	6	28
8. C 88 + <i>R. bunodes</i>	1	2	1	2	1	7
9. Tes. absoluto	0	0	0	0	0	0
10. Tes. de ref. <i>R. bunodes</i>	10	8	8	8	9	43
11. PC 9701 en LDE	0	0	0	0	0	0
12. LDE + <i>R. bunodes</i>	5	4	7	7	7	30

\*Total chapolas calificadas por tratamiento: 50



**Figura 15.** Número de “chapolas” de café con tejido foliar necrótico en los diferentes tratamientos 35 DDI con *R. bunodes*. Cenicafé, Colombia. 1997.

Igualmente se inició la recuperación de la bacteria de la rizosfera de las “chapolas”, siguiendo el procedimiento utilizado en la primera etapa. Solo en los tratamientos 1 y 8 correspondientes a los aislamientos PC 9701 y C 88, se posibilitó la recuperación de *Pseudomonas cepacia* y en ambos casos la fluorescencia fue positiva.

Para la tercera etapa del experimento se realizaron pruebas preliminares con el propósito de determinar la concentración óptima de hipoclorito de sodio requerida para efectuar la remoción de la bacteria de las raíces de las “chapolas”, una vez hubieran sido inoculadas con los aislamientos a evaluar. En el cuadro 11 se aprecian los resultados de dicha prueba. Solo la concentración de 0.5% de

hipoclorito de sodio garantizó buen nivel de remoción, sin causar necrosamiento y posterior muerte de las “chapolas”<sup>1</sup>

**Cuadro 11. Respuesta de “chapolas” de café var. Colombia a la aplicación de hipoclorito de sodio a la raíz, de acuerdo al porcentaje de mortalidad de plántulas. Cenicafe, Colombia. 1997.**

Tratamiento	Mortalidad(%) días después de la aplicación				
	4	8	12	16	20
Testigo sin hipoclorito de Na.	0	0	0	0	0
Hipoclorito al 0.5%	0	0	0	0	0
Hipoclorito al 1%	0	20	50	100	100
Hipoclorito al 2%	0	20	70	90	100

\*total de “chapolas” evaluadas por tratamiento: 10

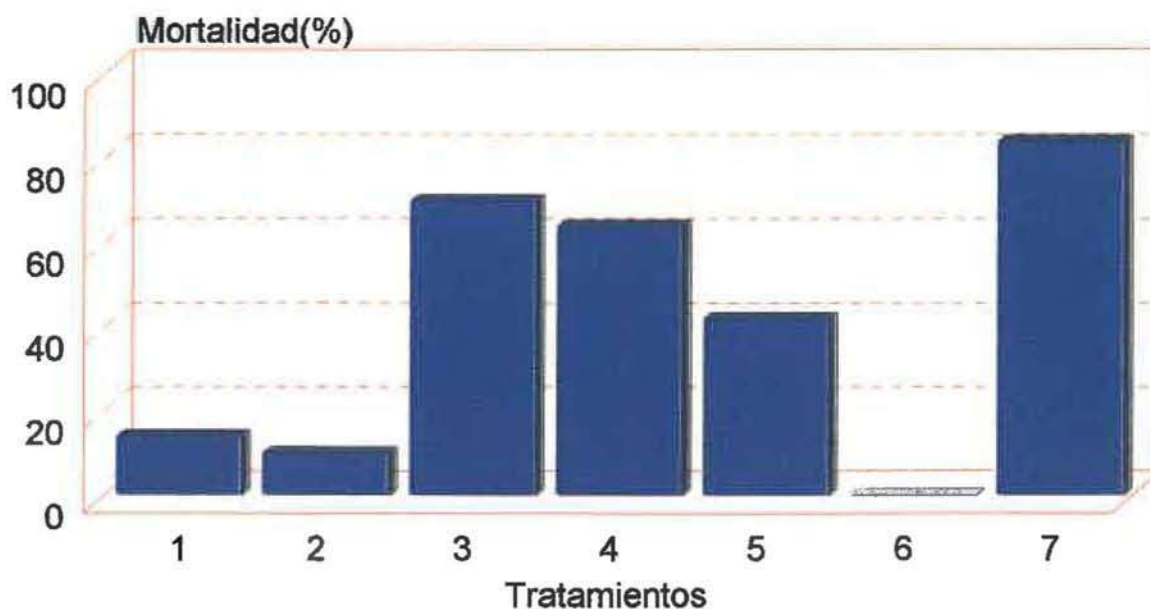
### 6.7 Tercera etapa

El cuadro 12 y la figura 16 presentan el porcentaje de mortalidad en cada uno de los tratamientos 20 DDI con *R. bunodes*. (coeficiente de variación 19.98). Los tratamientos 1, 2 y 6 con el menor porcentaje de mortalidad no tuvieron diferencia significativa, pero si existió entre estos y los tratamientos 3, 4, 5 y 7, de porcentajes de mortalidad superiores al 40%.

**Cuadro 12. Mortalidad de "chapolas" de café a los 20 DDI con *Rosellinia bunodes*. Cenicafé, Colombia. 1997.**

Tratamiento	Mortalidad (%)
1. PC 9701 + <i>R.bunodes</i>	14 d
2. C 88 + <i>R.bunodes</i>	10 d
3. T1 + Hto. de sodio + <i>R.bunodes</i>	70 ab
4. T2 + Hto. de sodio + <i>R.bunodes</i>	64 b
5. PC 9701 en pulpa + <i>R.bunodes</i>	42 c
6. Testigo absoluto	0 d
7. Testigo de ref. <i>R.bunodes</i>	84 a

Tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa (Tukey 5%).  
 $R^2$  0.94.



**Figura 16. Porcentaje de mortalidad de "chapolas" de café 20 DDI con *R. bunodes*. Cenicafé, Colombia. 1997.**

El cuadro 13 presenta los porcentajes de mortalidad a los 50 DDI con *R. bunodes*. (coeficiente de variación 8.41). Los tratamientos 3, 4, 5 y 7, con porcentajes de mortalidad superiores al 75% no presentaron diferencias significativas entre sí.

Los tratamientos 1, 2 y 6 difieren estadísticamente entre sí y con los anteriores.  
(coeficiente de variación en esta lectura 8.4).

**Cuadro 13. Mortalidad de "chapolas" de café a los 50 DDI con *R. bunodes*.  
Cenicafé, Colombia. 1997.**

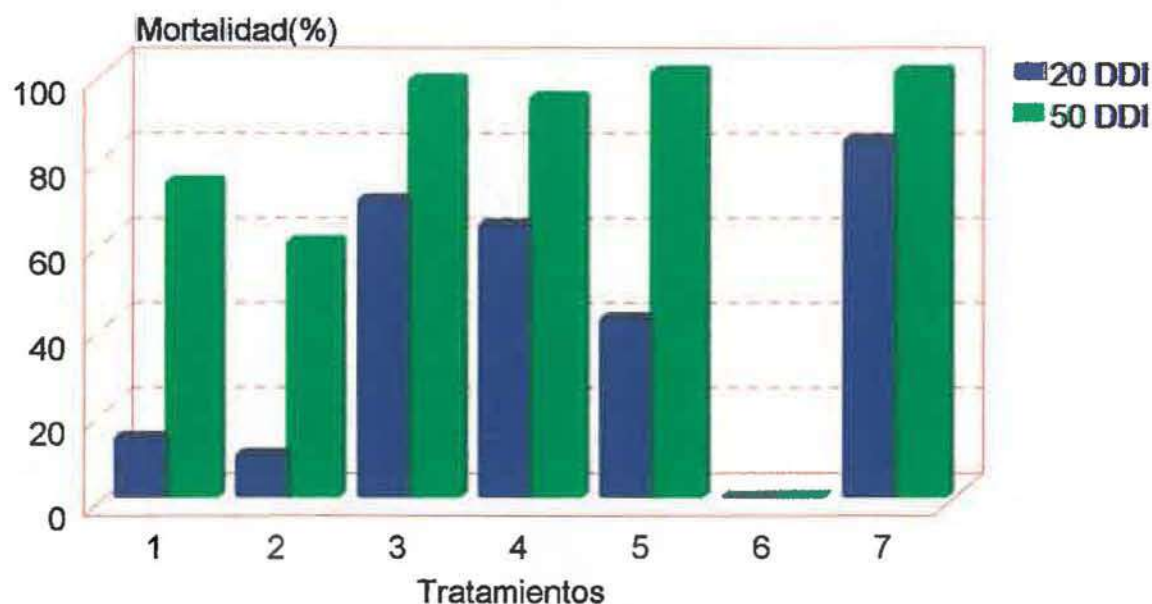
Tratamiento	Mortalidad (%)
1. PC 9701 + <i>R.b.</i> *	74 b
2. C 88 + <i>R.b.</i>	60 c
3. T1 + Hto. de sodio + <i>R.b.</i>	98 a
4. T2 + Hto. de sodio + <i>R.b.</i>	100 a
5. PC 9701 en pulpa + <i>R.b.</i>	100 a
6. Testigo absoluto	0 d
7. Testigo de ref. <i>R.b.</i>	100 a

\**Rosellinia bunodes*

Tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa (tukey 5%).  $R^2$  0.97.

La figura 17 compara la mortalidad de las "chapolas" de café en las lecturas realizadas 20 y 50 DDI con *R. bunodes*.





**Figura 17.** Comparación de la mortalidad de “chapolas” de café a los 20 y 50 DDI con *R. bunodes*. Cenicafé, Colombia. 1997.

Los tratamientos 1 y 2 presentaron los porcentajes más bajos de mortalidad de “chapolas” con 14 y 74% (20 y 50 DDI) y 10 y 60% (20 y 50 DDI), respectivamente. Los porcentajes de mortalidad del tratamiento testigo con *R. bunodes* fueron 84 y 100% (20 y 50 DDI). El tratamiento PC 9701 mostró diferencia significativa con el tratamiento PC 9701 en pulpa.



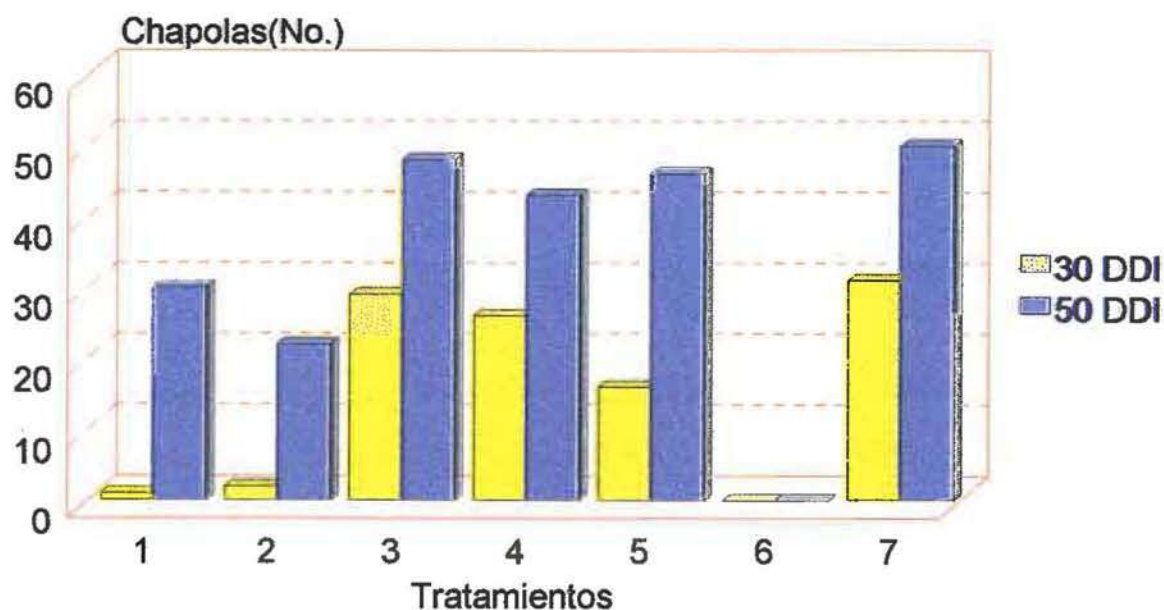
**Figura 18.** Tratamientos PC 9701, C88 y testigos 50 DDI con *R. bunodes*.  
Cenicafé, Colombia. 1997. (foto G. Hoyos)

Adicionalmente se realizó la calificación del tejido foliar necrótico en cada uno de los tratamientos 30 y 50 DDI con *R. bunodes* (cuadro 14). Los tratamientos 1 y 2 presentaron el menor número de plántulas con tejido afectado para ambas fechas de calificación con 1 y 30 para el tratamiento 1 y 2 y 22 para el tratamiento 2. El tratamiento testigo con *R. bunodes* presentó 31 “chapolas” con tejido necrótico en la primera lectura y 50 para la segunda (fig. 19).

**Cuadro 14. Incidencia de tejido foliar necrótico en "chapolas" de café a los 30 y 50 días después de la inoculación con *R. bunodes*. Cenicafe, Colombia. 1997.**

Tratamiento	No. y % de "chapolas" afectadas	
	30 DDI	50 DDI
1. PC 9701 + <i>R. bunodes</i>	1 (2)	30 (60)
2. C 88 + <i>R. bunodes</i>	2 (4)	22 (44)
3. T1 + Hto. de sodio + <i>R. bunodes</i>	29 (58)	48 (96)
4. T2 + Hto. de sodio + <i>R. bunodes</i>	26 (52)	43 (86)
5. PC 9701 en pulpa + <i>R. bunodes</i>	16 (32)	46 (92)
6. Testigo absoluto	0 (0)	0 (0)
7. Testigo ref. <i>R. bunodes</i>	31 (62)	50 (100)

\*Total "chapolas" calificadas por tratamiento: 50



**Figura 19. Número de "chapolas" de café con tejido foliar necrótico 30 y 50 DDI con *R. bunodes*. Cenicafe, Colombia. 1997.**

De las variables altura y peso seco se realizó un análisis descriptivo.

Los tratamientos 1, 2 y 6 presentaron altura de "chapola" promedio de 5,04, 5,32 y 5,12 cm respectivamente al momento de la inoculación con el patógeno. 45 días después la altura promedio de estos tratamientos fue 7,13, 7,34 y 7,09 cm respectivamente.

Los valores de peso fresco y seco de los tratamientos 1, 2 y 6 se presentan en el cuadro 15. Este análisis se realizó 65 DDI con los aislamientos bacteriales\*.

**Cuadro 15. Valores de peso fresco, seco y materia seca de "chapolas" de los tratamientos 1 y 2 evaluados en la tercera etapa. Cenicafé, Colombia. 1997.**

Tratamiento	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Materia seca (%)
PC 9701	1,546	0,365	23,61
C 88	2,418	0,623	25,77
Testigo	1,842	0,456	24,36

\* Equipo utilizado: Analizador halógeno de humedad Mettler Toledo HR 73.

### **6.8 Persistencia de las bacterias en la rizosfera de "chapolas" de café.**

En los tratamientos 1, 2 y 5 se pudo recuperar la bacteria hasta 60 días después de su inoculación. Para los tratamientos 3 y 4 la recuperación solo se logró hasta los 45 DDI.



**Cuadro 16. Persistencia de los aislamientos PC 9701 y C 88 en la rizosfera de "chapolas" de café. Cenicafé, Colombia. 1997.**

Tratamientos	Días después de la inoculación			
	15	30	45	60
1. PC 9701	+	+	+	+
2. C 88	+	+	+	+
3. T1 + H. de Na 0.5%	+	+	+	--
4. T2 + H. de Na 0.5%	+	+	+	--
5. T1 + pulpa	+	+	+	+

\* +. Crecimiento y fluorescencia positivos en Cetrimid Agar 24 horas DDS.

Complementario a esta prueba se realizó el recuento de UFC/g de raíz a los 15 y 30 DDI con los aislamientos. En el cuadro 17 se observan los resultados obtenidos.

**Cuadro 17. Recuento de UFC/g de raíz 15 y 30 DDI con los aislamientos PC 9701 y C 88. Cenicafé, Colombia. 1997.**

Tratamiento	UFC/g raíz	
	15 DDI	30 DDI
1. PC 9701	$1.51 \times 10^6$	$2.38 \times 10^6$
2. C 88	$1.05 \times 10^6$	$1.15 \times 10^6$
3. T1 + H. de Na 0.5%	$1.21 \times 10^6$	$1.21 \times 10^6$
4. T2 + H. de Na 0.5%	$1.34 \times 10^6$	$9.84 \times 10^5$
5. T1 + pulpa	$7.02 \times 10^5$	$5.40 \times 10^5$



A los 30 DDI la bacteria presentó para los tratamientos 1 y 2 una tendencia de aumento y para los tratamientos 3, 4 y 5 una tendencia de disminución en su población.

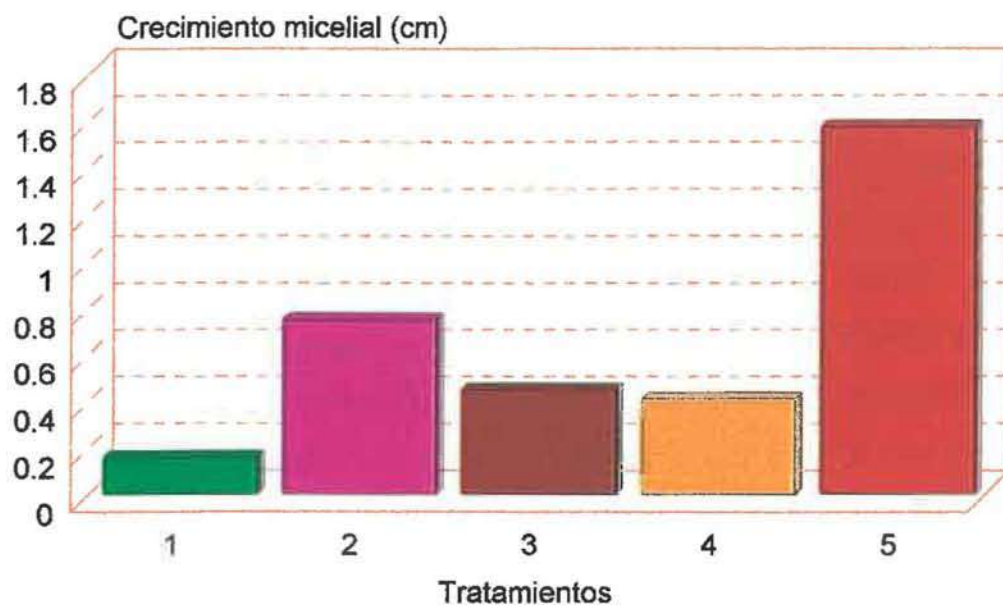
### **6.9 Inhibición de crecimiento micelial del aislamiento PC 9701 sobre *R. bunodes*.**

El cuadro 18 y la figura 20 ilustran el nivel de inhibición de crecimiento micelial de *R. bunodes* por parte de *P. cepacia* PC9701 al cabo de 144 h. La cantidad más alta (0.1 ml) presentó la mayor inhibición en el crecimiento acumulado. En los tratamientos 2(0,05 ml), 3(0,025 ml) y 4(0,0125 ml) no se detectaron diferencias significativas entre sí, pero si entre éstos y los tratamientos 1(0,1 ml) y 5 (testigo sin *P. cepacia*). El tratamiento 1 presentó un crecimiento acumulado de 0.16 cm y en el tratamiento 5 el crecimiento fue 1.57 cm.

**Cuadro 18. Crecimiento acumulado de *R. bunodes* en AEM con diferentes cantidades de PC 9701. Cenicafé, Colombia. 1997.**

Tratamiento	Crecimiento	C.V..
1. 0,1 ml	0.16 c	85.0
2. 0,05 ml	0.75 b	41.4
3. 0,025 ml	0.45 bc	43.4
4. 0,0125 ml	0.41 bc	40.0
5. testigo	1.57 a	41.7

\* tratamientos con la misma letra no difieren estadísticamente (Tukey 5%).



**Figura 20.** Nivel de inhibición en el crecimiento micelial de *R. bunodes* con diferentes cantidades de *P. cepacia*. Cenicafé. Colombia. 1997.

## 7. DISCUSION

Existe un gran volumen de microorganismos en la rizosfera de plantas de cafeto, los cuales interactúan de manera diversa. El proceso de aislamiento permitió obtener bacterias fluorescentes del tipo *Pseudomonas*. En el presente estudio 15 colonias con fluorescencia fueron aisladas de raíces de árboles de café afectados por *R. bunodes* y 18 de árboles sanos. De manera similar Valencia (1996) determinó la presencia de colonias fluorescentes en el rizoplaneo de raicillas de cafetos sanos y enfermos. Kloeper (1974) también encontró *Pseudomonas fluorescens* asociada a la rizosfera de diferentes cultivos. En el caso de Cook (1991) él usó *Pseudomonas* fluorescentes aisladas de raíces de trigo para el control de *Gaeumannomyces graminis var. tritici*.

Las técnicas utilizadas en este trabajo para el proceso de identificación permitieron un nivel de confiabilidad superior al 90%, tanto para género como para la especie de estos microorganismos. Pérez (1997), Blandón (1996) y Porras (1996) utilizaron el "BBL Crystal" y lograron identificar con niveles de confiabilidad superiores al 80% especies de bacterias fluorescentes del género *Pseudomonas* aisladas de hojas, almendras y pulpa de café. Esta técnica funciona para la clasificación de bacterias aerobias gram negativas e incluye pruebas para la fermentación, oxidación, degradación y la hidrólisis de varios sustratos.

El proceso de liofilización aseguró una adecuada conservación de los aislamientos de *Pseudomonas* spp obtenidos. En todas las muestras la viabilidad se determinó positiva y el porcentaje de humedad inferior al 5%. Porras (1996) conservó por liofilización aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes. Esto demuestra las ventajas del uso de la liofilización para conservar microorganismos promisorios en programas de Manejo Integrado. Antheunisse (1973) lo menciona como uno de los métodos más comúnmente usado para la preservación de microorganismos, entre los que menciona *Pseudomonas*.

Las características físico-químicas de los suelos de la zona cafetera proporcionan a las *Pseudomonas* condiciones adecuadas para el establecimiento e interacción con las raíces de las plantas de café. Burbano (1989) y Alexander (1961) hacen especial mención de la textura FA como muy favorable para la presencia de *Pseudomonas*. Elementos como hierro, fósforo y el contenido de materia orgánica se encuentran en niveles óptimos tanto para la bacteria como la planta, lo que garantiza aún más su interacción. Las *Pseudomonas* participan en la nitrificación, son solubilizadoras de fósforo y proveen el hierro  $Fe^{+++}$  que es la forma asimilable para la planta, debido a la producción de quelatantes como los sideróforos (Chet 1990, Chao *et. al* 1986, Blandon 1996, Valencia 1996). Para facilitar la disponibilidad de hierro, es necesario que el pH del suelo permanezca en los límites 4.6 y 5.6. La condición óptima de materia orgánica se debe ubicar entre 11.4 a 12.6%, el fósforo entre 6 y 14 ppm, el potasio entre 0.29 y 0.41 me/100g y el calcio y Magnesio entre 1.6 y 2.6 y 0.6 a 1.4 me/100g respectivamente (Valencia 1995).

La tasa de crecimiento diario de *R. bunodes* en medio AEM de 0.57 cm (coeficiente de variación 6.99) demuestra la buena capacidad de avance micelial, sobre todo cuando dispone de una fuente rica en nutrientes. En AEM los primeros días arrojaron un crecimiento promedio de 0.60 cm/día, mientras que en el décimo día el crecimiento llegó a 0.36 cm. Similar situación obtuvieron Castro (1997) y López (1997) al trabajar bajo condiciones semejantes de laboratorio y con el mismo aislamiento de *R. bunodes*. (cuadro 7 y figura 14). Sin embargo Valencia (1996) menciona un crecimiento diario de *R. bunodes* en medio AEM de 0.89 cm, con un coeficiente de variación de 8.37. Estas diferencias en la tasa de crecimiento se pueden explicar por el uso de diferentes aislamientos y pueden suceder también por la siembra consecutiva del hongo en el mismo medio por varias generaciones.



Para la segunda etapa es evidente que el tiempo de establecimiento de estas bacterias en la rizosfera (4 días) no fue suficiente, impidiendo un buen nivel de colonización y por lo tanto el desarrollo de mecanismos de competencia por espacio y nutrientes. Bull (1987) encontró que el éxito del control biológico con bacterias como *Pseudomonas* depende de un umbral poblacional óptimo en el material de siembra o en el suelo. Asimismo Alh *et al.* (1986) lograron, al tener una buena proliferación de la bacteria, un alto nivel de competencia con otros microorganismos. Este punto es sin duda esencial para que *Pseudomonas* exprese su potencial antagónico.

Los tratamientos 1, 4 y 8 mostraron los menores porcentajes de mortalidad a los 20 DDI. Sin embargo en la evaluación a los 35 DDI en ninguno de los tratamientos se presentó diferencia significativa con el testigo de referencia. No obstante los tratamientos 1 (PC9701) y 8 (C88) presentaron una curva de progreso de la enfermedad menor a lo largo de 7 lecturas, además de plántulas vivas y el menor número de plántulas con tejido foliar necrótico, lo que indica algún grado de antagonismo de estos dos aislamientos.

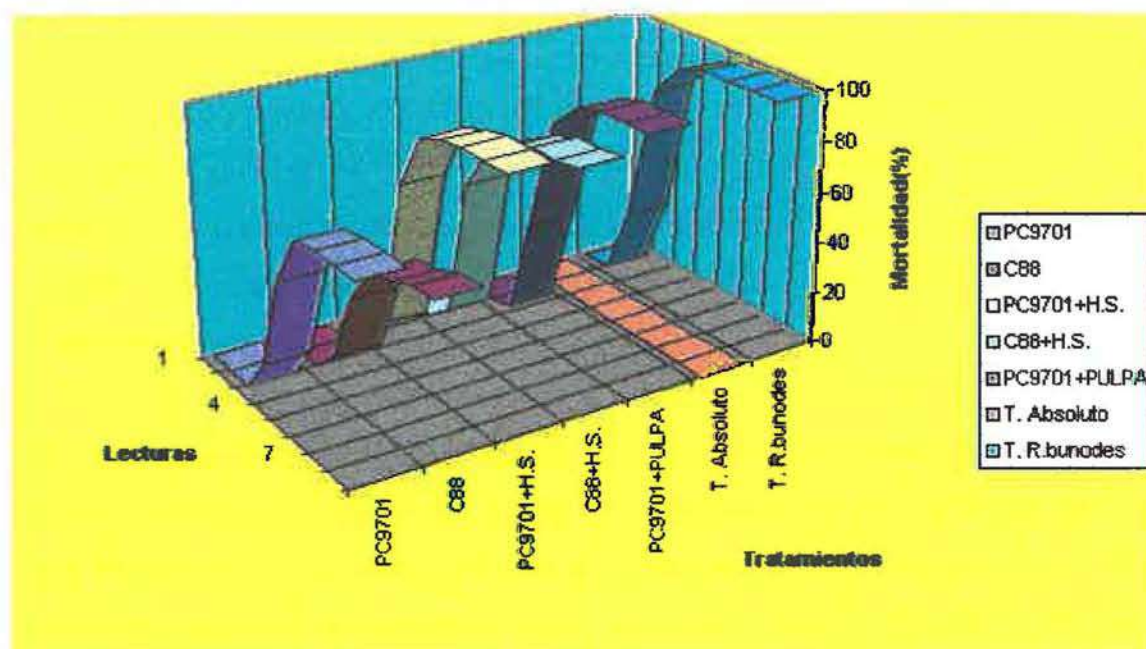
Para la tercera etapa en donde la inoculación con *R. bunodes* se hizo 15 DDI con los aislamientos bacteriales, se estableció que los tratamientos PC 9701, C 88 y testigo sin inoculación, no presentaron diferencias significativas entre sí 20 DDI con *R. bunodes*. Los tratamientos 1 y 2 presentaron 50 DDI con *R. bunodes* un nivel de control de 74 y 60% respectivamente. Estos niveles permitieron corroborar el antagonismo de *Pseudomonas cepacia* (aislamientos PC 9701 y C 88) sobre *R. bunodes*. Igualmente el área bajo la curva de progreso de la enfermedad fue menor para los tratamientos 1 y 2. Estudios anteriores de Lozano (1985), Valencia (1996) y Perez (1997) presentaron resultados similares a los de este trabajo, pues obtuvieron niveles de antagonismo significativos con estas bacterias sobre patógenos radicales de café, espárragos y yuca como *R. bunodes* y *Fusarium spp.*



El potencial antagónico de los aislamientos PC 9701 y C 88 pudo también ser verificado, pues el promedio de “chapolas” con tejido foliar necrótico fue 50% inferior al testigo de referencia con *R. bunodes*.

Los tratamientos donde se incluyó la remoción con hipoclorito de sodio posterior a la inoculación de la raíz con PC 9701 y C 88 no presentaron ningún nivel de control sobre el patógeno, por lo que no se pudo probar efecto por resistencia inducida, aunque Porras (1996) observó inducción parcial de resistencia de *Pseudomonas* spp contra *Hemileia vastatrix*, en experimentos realizados en hojas desprendidas de plantas de cafeto.

En el tratamiento donde se utilizó pulpa de café, como sustrato de multiplicación de la bacteria, se observó una alta recuperación a los 30 DDI ( $5,4 \times 10^5$  UFC/g de raíz), pero las condiciones de colonización y avance favorecieron mucho más al patógeno que a la bacteria. Trabajos adelantados por Ruiz y Leguizamón (1996) demostraron que altos contenidos de materia orgánica disminuyen el potencial de control de antagonistas de *R. bunodes* al facilitar el mantenimiento de su potencial patogénico. En la medida que se aumentó el contenido de materia orgánica al adicionar la pulpa, el porcentaje de infección aumentó (fig. 21).



**Figura 21.** Curvas de progreso de la mortalidad de “chapolas” de café en los diferentes tratamientos hasta los 50 DDI con *R. bunodes*. Cenicafé, Colombia. 1997.

La recuperación de la bacteria de la rizosfera de las “chapolas” de café fue positiva inclusive hasta los 60 días para los tratamientos 1, 2 y 5. En los tratamientos donde fue utilizado hipoclorito de sodio al 0.5% (3 y 4) se logró la recuperación de la bacteria solo hasta los 30 DDI. Para el caso de los tratamientos 1 y 2 explica el efecto de control sobre el patógeno y para los tratamientos 3 y 4 explica la mayor capacidad de colonización y avance de *R. bunodes*.

Esto significa que aunque la bacteria se mantuvo en una cantidad similar a la inoculada hasta los 30 días después, se produjo también una predisposición de las raíces de las plántulas al patógeno, facilitándose la colonización y avance de éste. Por tanto a pesar de la presencia de la bacteria, el potencial infectivo de *R. bunodes* fue superior.

En las condiciones de este ensayo se verificó "in vitro" el efecto inhibitorio de *Pseudomonas cepacia* PC 9701 sobre *R. bunodes*. Por observación se evidenció una disminución en la capacidad de avance del micelio, en presencia de *P. cepacia*. La presencia de diversos mecanismos de inhibición que presenta esta bacteria son mencionados por Austin *et. al* (1977), León (1986), Cook (1991) y Valencia (1996).

En las condiciones del experimento los resultados en invernadero mostraron niveles de control aceptables, dadas las características de los microorganismos que interactuaron. La interacción de la microflora habitante regular del suelo y la rizosfera, pretende un equilibrio de la población, más no el exterminio total de unos por otros.

*Pseudomonas cepacia* tiene muchas posibilidades de utilización dentro de un Manejo Integrado de la llaga negra radical del cafeto, en el agroecosistema cafetero, una vez se logre una adecuada formulación y aplicación de la bacteria a la rizosfera de plantas, para implementar el manejo preventivo. Este componente no garantiza plena eficiencia en condiciones de un potencial de inóculo alto, pero si lo es en condiciones normales de Manejo Integrado del problema. Para este experimento el patógeno se colocó en niveles de alto potencial de inóculo, lo que lo favoreció. A pesar de ello fue posible probar el potencial antagónico de la bacteria.

La adición regular de pulpa a los cultivos de cafeto ubicados en zonas de alta incidencia de este patógeno, proporciona un elemento más en favor del desarrollo de *Rosellinia bunodes*, por lo que el conocimiento de su biología, epidemiología y de control biológico son de gran importancia para el futuro de una caficultura sostenible.

## 8. CONCLUSIONES

1. Los aislamientos nativos identificados como *Pseudomonas cepacia*, provenientes de las muestras analizadas presentaron efecto antagónico sobre *Rosellinia bunodes*.
2. En condiciones de laboratorio y utilizando medio de cultivo agar extracto de malta (AEM), se verificó el efecto inhibitorio de *P. cepacia* PC 9701 sobre *R. bunodes*. Por observación se evidenció la disminución en la capacidad de avance del micelio.
3. *P. cepacia* ejerció un efecto protector a plántulas ("chapolas") de cafeto, inoculadas 15 días después con *R. bunodes*, agente causante de la llaga negra radical.
4. Cuando se aumentó el tiempo de colonización de *P. cepacia* en la rizosfera, se logró un mayor efecto de control de la bacteria sobre *R. bunodes*.
5. La utilización de la leche descremada como sustrato de multiplicación de bacterias fluorescentes, en este caso *P. cepacia*, permitió un buen nivel de persistencia de la bacteria en la rizosfera de las plántulas de cafeto sembradas en suelo estéril. La población se mantuvo en niveles similares a los inoculados hasta los 30 días después de la inoculación (DDI). 60 DDI también fue posible su recuperación.
6. La técnica de liofilización de los aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes obtenidos de raíces de árboles de cafeto, es un método adecuado de conservación de este tipo de microorganismos.



## 9. RECOMENDACIONES

1. Evaluar diferentes sustratos de multiplicación de *P. cepacia*, así como continuar el proceso de caracterización de microorganismos quitinolíticos, glucanolíticos y celulolíticos, sobre el hongo *R. bunodes*.
2. Determinar la dinámica poblacional y la persistencia de estos microorganismos en diferentes sustratos, entre ellos la pulpa de café.
3. Probar el comportamiento de *P. cepacia* en combinación con otros agentes de control biológico de *R. bunodes*, tales como micorrizas vesículo arbusculares y el hongo *Trichoderma koningii*.
4. Estudiar la eficacia de *P. cepacia* a niveles más bajos de inóculo de *R. bunodes*.
5. Evaluar diferentes tiempos de inoculación del patógeno, después de ser inoculada *P. cepacia*.
6. Iniciar pruebas de formulación y aplicación de estas bacterias, solas y en combinación, utilizando plántulas próximas a ser transplantadas al campo.



## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AGRIOS, G.N. 1996. Fitopatología. 2 ed. México, Editorial LIMUSA. 838 p.
- AHL, P.; VOISOD, C.; DEFAGO, G. 1986. Iron bound siderophores, cyanic acid and antibiotics in suppression of *Thielaviopsis brasicola* by a *Pseudomonads* fluorescent strain. Journal of Phytopathology (U.S.A.) 115: 121-134.
- ALPIZAR S., J. M. 1989. Manual de recomendaciones para el cultivo del café. 6 ed. San José, Costa Rica. Programa cooperativo ICAFE-MAG. 122 p.
- ANDREWS, J.H. 1992. Biological control in the phyllosphere. Annual Review of Phytopathology 30: 603-635.
- ALONSO, R; FERNANDEZ, A; GONZALEZ, M; PARRADO, O. 1994. Respuesta de tres variedades de café (*Coffea arábica* L) a la aplicación de *Pseudomonas fluorescens*. (C-IS-16) en la etapa de vivero. In Seminario Científico del INCA. Taller sobre fertilización en los trópicos. La Habana, Cuba. p.16-18.
- ANURATHA, C.S; GNANAMANICKAM, S.S. 1990. Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* in India with antagonistic bacteria. Plant and Soil 124: 109- 116.
- ARANZAZU, L. F. 1992. Seguimiento epidemiológico de la Llaga estrellada del cacao producida por *Rosellinia pepo*. 1987-1992. In Congreso ASCOLFI (13, 1992, Villavicencio, Colombia). Memorias. Bogotá. ASCOLFI. p. 25.

- AUSTIN, B.; DICKINSON, C.H.; GOODFELLOW, M. 1977. Antagonistic interactions of phylloplane bacteria with *Drechslera dictyoides* (Drechsler) Shoemaker. Canadian Journal of Microbiology 23: 710-715.
- BAKER, K.F.; COOK, R.J. 1974. Biological control of plant pathogens. San Francisco W.H. Freeman & Co. 433 p.
- BASHAN, Y. 1986. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. Applied and Environmental Microbiology 51: 1089-1098.
- BERMUDEZ, M; CARRANZA, J. 1990. Patogenicidad de *R. bunodes* en el jaúl (*Alnus acuminata*). Agronomía Costarricense (Costa Rica) 14 (2): 181-188.
- BLANDON, G. 1996. Caracterización microbiológica cualitativa de la flora presente en el lombricompuesto. Chinchiná, Colombia, Cenicafé 142 p.
- BORA, L.; GANGOPADHYAY, S.; CHAND, J. 1993. Biological control of bacterial leaf spot (*Xanthomonas campestris* pv *vignearadiatae* Dye) of mung bean with phylloplane antagonists. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology 23(2): 162-168.
- BOWERS, J.H; PARKE, J.L. 1993. Colonization of pea (*Pisium sativum* L) taproots by *Pseudomonas fluorescens*: effect of soil temperature and bacterial motility. Soil Biology and Biochemistry 25(12): 1693-1701.
- BOWERS, J.H; PARKE, J.L. 1993. Epidemiology of *Pythium* Damping-off and *Aphanomyces* root rot of peas after seed treatment with bacterial agents for biological control. Phytopathology 83:1466-1473.

- BULL, C.T. 1987. Wheat root colonization by disease-suppressive or nonsuppressive bacteria and the effect of population size on severity of take all caused *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. MS. Thesis. Pullman, Washington State University. 75 p.
- BURBANO, V., F. 1992. Influencia de las micorrizas vesículo arbusculares(MVA) sobre *Rosellinia bunodes* agente causal de la llaga negra del café. *In* Congreso ASCOLFI (13, 1992, Villavicencio, Colombia). Memorias. Santafé de Bogotá.ASCOLFI. p. 61.
- CASTAÑO, J.J. 1953. Algunas observaciones sobre la "Llaga Negra" radicular del cafeto.(Colombia). Agricultura Tropical (Venezuela) 9 (2): 41-47.
- CASTRO, C., B.L. 1992. Manejo Integrado y Control de la llaga negra del cafeto. *In* Centro Nacional de Investigaciones de Café. Chinchiná. Colombia. Informe Anual de labores de la disciplina de fitopatología. Chinchiná (Colombia), CENICAFE. 13 p.
- CASTRO, C., B.L; ESQUIVEL, R, H. 1991 Las llagas radicales del cafeto. CENICAFE (Colombia) Avances Técnicos No. 163. 4 p.
- CASTRO,C., B.L. 1995. Antagonismo de algunos aislamientos de *Trichoderma koningii* originados en suelo colombiano contra *Rosellinia bunodes*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Pythium ultimum*. Fitopatología Colombiana 19(2): 7-18.
- CASTRO, T., A.M. 1997. Efecto de *Trichoderma koningii* (T-3) y *Glomus manihotis* en el control de *Rosellinia bunodes*. Proyecto de investigación. Chinchiná, Colombia, Cenicafé. 75 p.



- CATTELAN, A.J. 1994. Antagonism of fluorescent pseudomonads to phytopathogenic fungi from soil and soybean seeds. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo (Brasil)* 18(1) 17-42.
- CHAO, W.L.; ALEXANDER, M. 1984. Mineral soils as carriers for *Rhizobium* inoculants. *Applied and Environmental Microbiology* 47: 94-97
- CHAO, W.L.; NELSON, E.B.; HARMANS, G.E.; HOCH, H.C. 1986. Colonization of the rhizosphere by biological control agents applied to seeds. *Phytopathology (U.S.A.)* 76: 60-65.
- CHET, H.I. 1990. Mechanisms of biocontrol of soil-born plant pathogens by rhizobacteria. *Plant and soil (U.S.A.)*. 129: 85-92.
- COOK, R.J. 1991. Success with biological control requires new thinking by industry. Counterpoint. *Impact AgBioBusiness*. Oxon, UK : CAB Int. June, pp. 3-4.
- COOK, R.J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 31: 53-80.
- CORREA, V.F. 1992. Disease control of sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *Arroz (Colombia)* 41 (378): 32-37.
- CRISTANCHO, M. 1992. Estudio de relaciones antagónicas entre diversos microorganismos y *Rosellinia bunodes*. In Centro Nacional de Investigaciones del Café, Chinchiná, Colombia. Informe anual de labores, Fitopatología Octubre 1991- Septiembre 1992.

- DHINGRA, O., D; SINCLAIR, J.B. 1994. Effect of antagonist on pathogen and disease in soil. *Basic Plant Pathology Methods*. (USA) 255-256.
- DUQUE, J. P. 1933. La podredumbre radical de las raíces del cafeto. México, Comisión Nacional del Café. p. 25-52.
- DUQUE, J.P. 1952. La podredumbre radical de las raíces del cafeto. México, Comisión Nacional del Café. 107 p.
- ESQUIVEL, V.H; LEGUIZAMON, J.E; ARBELAEZ, G. 1992. Búsqueda y evaluación de antagonistas a *Rosellinia bunodes* agente causante de la llaga negra del cafeto. *CENICAFE (Colombia)* 43 (2): 33-42.
- FERNANDEZ, O.; LOPEZ, S. 1964. Las llagas radiculares negra (*Rosellinia bunodes*) y estrellada (*Rosellinia pepo*) del cafeto. I. Patogenicidad e influencia de la clase de inóculo en la infección. *CENICAFE. (Colombia)* 15 (3): 126-144.
- GALVEZ, G.C. 1990. Enfermedades en el cultivo del cafeto. *In VIII Curso "Fundamentos de Caficultura Moderna*. INCA. PROMECAFE. CATIE. Costa Rica. Módulo I. 11-12.
- GAMLIEL, A; KATAN, A.J. 1991. Involvement of fluorescent Pseudomonads and other microorganisms in increased growth response of plant in solarized soils. *Phytopathology* 81: 494-502.
- GAMLIEL, A; KATAN, A.J. 1993. Supression of major and minor pathogens by fluorescent pseudomonads in solarized soils and non-solarized soils. *Phytopathology* 83: 68-65



- GOVINDARAJAN, T.S. 1988. A review of the incidence of root disease on coffee and their management. Supplement. Journal of Coffee Research (India) 18 (1) 16-28.
- GRAFF, J. 1986. The economics of coffee economics of crops in developing countries No. 1. Centre for Agricultural Publishing and Documentation (Pudoc). Wageningen, The Netherlands. 294p.
- GUTIERREZ, F. 1996. Estudio de factores en la inducción de resistencia *Mycosphaerella fijiensis* y promoción de crecimiento en plantas de banano. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 91 p.
- HERNANDEZ, J; LOZANO, J.C. 1985. Efecto y características de algunos aislamientos de rizobacterias fluorescentes en genotipos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Acta Agronómica (Colombia) 35 (1): 61-80.
- HOMMA, Y.; SATO, Z.; HIRAYAMA, F.; KONNO, K.; SHIRAHAMA, H.; SUZUI, T. 1989. of antibiotics by *P. cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. Soil Biology and Biochemistry 21: 723-728.
- HOLLIDAY, P. 1980. Fungus of diseases of tropical crops. Cambridge (Englands). Cambridge University Press. 440 p.
- HOWELL, C.R.; STIPANOVIC, R.D. 1980. Suppression of *Pythium ultimum* induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. Phytopathology 70: 712-715.
- HOWIE, W.J.; ECHANDI, E. 1985. Rhizobacteria: Influence of cultivar soil type in plant growth and yield of potato. Soil Biology and Biochemistry (U.S.A.) 15: 127-182.

- IBARRA, N.L. 1997. Estudio del proceso infectivo de *Rosellinia bunodes* en café. Proyecto de Tesis, Programa Biología. Universidad del Cauca-Cenicafé. 66 p.
- ISSAC, S. 1992. Fungal plant interactions. London (England), Chapman and Hall. 418 p.
- KANNAN, N. 1986. Root disease of coffee. Indian Coffee 50 (12) 21-24.
- KASKA, M. 1976. The toxicity of extracellular proteases of the bacterium *Serratia marcescens* for larvae of greater wax moth, *Galleria mellonella*. Journal of Invertebrate Pathology. 27: 271
- KATAN, J. 1981. Solar heating (Solarization) of soil for control of soilborne pests. Annual Review Phytopathology. 19 211-236.
- KIM, D.S.; WELLER, D.M.; COOK, R.J. 1997. Population dynamics of *Bacillus* sp. L324-92R12 and *Pseudomonas fluorescens* 2-79RN10 in the rizosphere of wheat. Phytopathology 87:559-564.
- KING, E. B; PARKE, J.L. 1993. Biocontrol of *Aphanomyces* root rot and *Pythium* damping-off by *Pseudomonas cepacia* AMMD on our pea cultivars. Plant Disease. 77: 1185-1188.
- KNUDSEN, G.R.; SPURR, H.W. 1987. Field persistence and efficacy of five bacterial preparations for control of peanut leaf spot. Plant disease. 71(5): 442-445.
- KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. EDS. 1984. Bergeys Manual of sistematics Bacteriology. Vol. I. Baltimore (USA), Williams & Wilkins. p. 141-198.

- KONEMAN, E.W. 1989. Diagnóstico microbiológico. México, Panamericana. 531 p.
- LEMANCEAU, P; ALABOUVETTE, C. 1993. Suppression of *Fusarium wilts* by fluorescent pseudomonads: Mechanisms and applications. Biocontrol Science and Technology. 3: 219-234.
- LEON, J. 1986. Siderophores: Their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology (U.S.A.). 24: 187-209.
- LIDDELL, C.M; PARKE, J.L. 1989. Enhanced colonization of pea taproots by a fluorescent Pseudomonads biocontrol agent by water infiltration into soil. Phytopathology 79 (12): 1327-1332.
- LOPEZ, U., A. B. 1997. Evaluación de diferentes sustratos para multiplicación de *Trichoderma koningii* antagonista de *Rosellinia bunodes*. Trabajo de Investigación. Cenicafé, Colombia. Fitopatología. 41 p.
- LOPEZ DE OLIVEIRA, M. 1992. Pudricao negra da raiz do cacaueiro causada por *Rosellinia sp.* no Brasil. Agrotropica (Brasil) 4(2) : 21-26.
- LOPEZ, D. S. 1965. Estudio sobre la Llaga negra. Tesis Ing. Agr. Manizales, Colombia. Universidad de Caldas. 60 p.
- LOPEZ, L.M. 1994. Uso de entomopatógenos y parasitoides como control biológico de plagas y enfermedades en el cultivo del café. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Dirección de Protección Agropecuaria. Programa de Control Biológico. San José, Costa Rica. p. 57-58.

- LOPEZ, S.; FERNANDEZ, O. 1966. Las llagas radicales negra (*Rosellinia bunodes*) y estrellada (*Rosellinia pepo*) del cafeto. II Efecto de la humedad y el pH del suelo en el desarrollo micelial e infección. CENICAFE (Colombia) 17 (2) 61-69.
- LOZANO, J.C. 1990. Biocontrol de enfermedades en plantas con referencia especial a su uso en la producción de yuca. *In* Congreso ASCOLFI (12, 1991, Manizales, Colombia). Memorias. Manizales, ASCOLFI. p.25
- MERCHAN, V.M. 1993. Experiencias en el manejo de *Rosellinia*. Ascolfi Informa. (Colombia). 19(3): 23-24.
- MERCHAN, V.M. 1989. Manejo de enfermedades del Cacao. ASCOLFI informa (Colombia). 15(2) : 10-14.
- METTLER TOLEDO. 1995. Métodos para determinar el contenido de humedad. Analizador halógeno de humedad HR 73. Mettler Toledo, Inc. Hightstown, NJ 08520-0071, U.S.A.
- MONTECINOS, E.; BELTRA, R. 1996. las bacterias fitopatógenas. *In* Llacer, Ct; López M.M.; Trapero, A.; Bello, A. Patología Vegetal. Tomo I. S.E.F Phytoma-España. p. 489-490.
- MUTHAPPA, B. N. 1977. *Rosellinia bunodes* on Coffea spp. Journal of Coffee Research. 7(4): 109-110.
- NICOLE, M.; RUEL, K.; OVELLETTE, B. G. 1994. Fine Morphology of fungal structures involved in host wall alteration. *In* PETRINI, O.; QUELLETTE, G.B. Host wall alteration by parasitic Fungy. Saint Paul (USA). APS Press. p. 13-30.



- OKUMOTO, S. 1992. Efecto de las enmiendas sobre bacterias antagónicas a *Alternaria solani* en tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 114 p.
- PARKE, J. L.; RAND, R.E; JOY, A.E; KING, E.B. 1991 Biological control of *Pythium* Damping-off and *Aphanomices* root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *P. fluorescens* to seed. Plant Disease 75: 987-992.
- PAPAVIZAS, G. C.; DUNN, M. T.; LEWIS, J. A.; BEAGLE-RISTAINO, J. 1984. Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. Phytopatology 74:1171-1175.
- PEREZ, J. C. 1997. Manejo de *Fusarium* spp en espárragos (*Asparagus officinalis* L.) con micorrizas nativas, *pseudomonas* spp fluorescentes y fertilizantes. Tesis Mag. Sc. Manizales, Colombia, Universidad de Caldas. 102 p.
- PIERSON, E.A; WELLER, D.M. 1994. Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat. Phytopathology 84: 940-947.
- PORRAS, V., N. C. 1996. Inducción de resistencia por 4 cepas de *Pseudomonas* spp., en plántulas de café contra la roya de cafeto *Hemileia vastatrix* Berk y Br. Tesis Bacterióloga. Santafé de Bogotá, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana. 147 p.
- RAMIREZ, C. 1996. Control biológico de *Moniliophthora roreri* mediante la inoculación de bacterias antagónicas aisladas del filoplanio de plantas de cacao. Facultad de Agronomía. Universidad de Costa Rica. Mimeografiado.



- REGALDO, A; VILLANUEVA, A. 1990. Enfermedades del cafeto. *In* El cultivo del cafeto en México. Sáenz, A. (Ed). Edit. La Fuente. México. 284p.
- REINECKE, P. 1974. Antagonism and biological control on aerial surfaces of the gramineae. Annual Review Phytopathology. 20: 383-390.
- RESTREPO, F., G.M. 1997. Efecto de los hongos micorrizogenos *Entrophospora colombiana* y *Glomus fistolosum* en el control de la llaga negra del cafeto *Rosellinia bunodes*. Proyecto de Tesis M.Sc. Microbiología. Manizales, Colombia. Universidad Catolica de Manizales. 58 p.
- RIVAS, G. 1996. Descripción matemática de epidemias. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). No. 40. P 35-39.
- RUIZ, S., L.; LEGUIZAMON, C. J. 1996. Efecto del contenido de materia orgánica del suelo sobre *Rosellinia bunodes* con *Trichoderma* spp. Cenicafé 47(4): 179-186.
- SACCAS, A. M. 1956. Les *Rosellinia* de caféiers en Oubangui-Chari. Agronomie Tropicalé(Francia) 11(5): 551-595; 11(6): 687-706.
- SAENZ, N. 1895. Memoria sobre el cultivo del cafeto. O guía para la fundación de un cafetal en Colombia. Incluyendo los cultivos accesorios de plátano, cañas y pastos. 3era ed . J.J. Pérez Edt. Bogotá Colombia. 70 p.
- SALAZAR, M; ARANZAZU, H.F. 1991 Comportamiento en patogenicidad de las raíces de cacao afectadas por *Rosellinia pepo* en diferentes estados y grados de descomposición. Memorias. XII Congreso Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines-ASCOLFI-. Manizales. Colombia. p 57.
- SARASOLA, A. 1975. Fitopatología. V.2 Micosis. Buenos Aires (Argentina), Hemisferio Sur. p. 229 - 242.

- SCHROTH, M.N.; HANCOCK, J.G. 1982. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science* 216: 1376-1381.
- SNYMAN, S.J; BLACK, K.J; HERRERA, G; THOMSON, J.A. 1993. *Pseudomonas fluorescens* genetically engineered to produce an insect toxin: a culmination of five years of collaborative research. *Proceedings South African Sugar Technologists' association (South Africa)*. 67: 78-81.
- SUBBA, N. S. 1992. *Biofertilizers in Agriculture*. 2 ed. New Delhi (India). Oxford and IBH Publishing. 208 p.
- THOMPSON, J.A. 1980. Production and quality control of legume inoculants. *In* *Methods of evaluating biological nitrogen fixation*, de. F.j. Bergersen. Willey. 702 p.
- TOURVIEILLE DE LABROUHE, D. 1982. Pen tration de *Rosellinia necatrix* (Hart) Berl. dans les racines du pommier en conditions de contamination artificielle. *Agronomie (Francia)*. 2(6) 553-560.
- TRONCONI, M.N. 1990. Enfermedades. *In* *Manual de plagas y Enfermedades del café*. Instituto Hondureño del café IHCAFE. Honduras. p 54-55
- VALENCIA, ARISTIZABAL, G. 1995. Nutrición y fertilización del cafeto. *In* *Fertilización de cultivos de clima medio*. Editor Ricardo Guerrero Riascos. Monomeros Combo Venezolanos S.A. pp. 49-97.
- VALENCIA, M. 1996. Estudio del antagonismo de *Pseudomonas* spp. fluorescentes a *Rosellinia bunodes* (Berk. y Br.) Sacc. Tesis Bacteriología. Manizales, Colombia, Universidad Católica de Manizales.

- VARGAS, E. 1996. hongos y bacterias aislados de raíces corchosas de cafeto y cítricos en suelos con diferentes características. *In* Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales. Memorias: Suelos/ Editores Maria Bertsch, Walter Badillo, Elmer Barnemisza. 1 de. San José. C.R. : EUNED, EUNA. pp. 67.68.
- VIDHYASEKARAN, P. ; MUTHAMILAN, M. 1995. Development of formulations of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea Wilt. Plant disease. (79):782-786.
- WALLER, J.M 1987. Control of Coffee diseases. *In* Coffee: Botany, biochemistry and production of beans and beverage. Clifford, N.M. and Willson, K.C. (De). Croom Helm Ltda. England. 457 p.
- WATERSTON, J.M. 1941. Observation of the parasitism of *Rosellinia pepo* pat.. Tropical Agriculture (Trinidad). 18: 174-184.
- WELLER, D. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rizosphere with bacteria. Annual Review Phytopathology 23: 379-407
- WILSON, M; LINDOW, S.E. 1994. Ecological similarity and coexistence of epiphytic ice-nucleating (ice+) *Pseudomonas syringe* strains and a non-ice-nucleating (ice-) biological control agent. Applied and Enviromental Microbiology. 60(9): 3128-3137.
- ZIDACK, N.K; QUIMBY JR, P.C; CAESAR, A. J. 1996. An oil/starch/sugar encapsulation method suitable for gram-negative bacteria and other microbes. Phytopathology (abstracts).

## 11. ANEXOS

### 11.1 Medio de cultivo Agar Extracto de malta(AEM)

#### Composición (g/l.)

Extracto de malta	30.0
Peptona de harina de soya	3.0
Agar-Agar	15.0

Inicialmente se disuelven 50 g/l. y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 min. Para ajustar el pH final a 5.6 se funde el medio de cultivo estéril y se ajusta al nuevo valor de pH mediante una solución esterilizada por filtración de ácido al 10% ó de ácido tartárico al 5%.

### 11.2 Agar F para *Pseudomonas* spp fluorescentes.

#### Composición (g/l.)

Peptona de caseína	10 g
Peptona de carne	10 g
Sulfato de magnesio	1.5 g
Hidrogenofosfato dipotásico	1.5 g
Agar-Agar	12 g
Glicerina (aditivo)	10 ml

#### Preparación

Se disuelven 35 g/l de Agar F para *Pseudomonas* (base) conjuntamente con 10 ml por litro de glicerina.

Se distribuyen en cajas y se esteriliza en autoclave (15 min. a 121 °C).

### 11.3 Cetrimid Agar

Composición (g/l.)

Peptona de gelatina	20
Clorhidrato de Mg	1.4
Sulfato de K	10
Bromuro de trimetil amonio	0.3
Agar-agar	13.6

Preparación

Se disuelven 43.5 g en un litro de agua destilada estéril, conjuntamente con 10 ml de glicerina.

Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 min.

### 11.4 Leche descremada

Análisis aproximado

Grasa max.	.5%
Proteínas	38%
Lactosa	48.5%
Minerales	8%
Hum. Max.	4%

Preparación de LDE al 5%

Se toman 50 g de leche descremada por 1 litro de agua destilada estéril. La leche se disuelve en el agua a temperatura ambiente. Posteriormente se autoclava durante 5 minutos a 121 °C.



**11.5 Caracterización microbiológica del lombricompuesto de pulpa de café realizado por la Disciplina de Química Industrial de Cenicafé en 1996. Cenicafé, Colombia. 1997.**

Pulpa de café sola fresca	Pulpa de café de 2 meses	Lombricompuesto de pulpa de café
<i>Candida sp</i>	<i>Aspergillus sp</i>	<i>Actinomadura sp</i>
<i>Citrobacter sp</i>	<i>Candida sp</i>	<i>Aeromonas sp</i>
<i>Enterobacter sp</i>	<i>Enterobacter sp</i>	<i>Aspergillus sp</i>
<i>Escherichia sp</i>	<i>Escherichia sp</i>	<i>Bacilos Gram (+)</i>
<i>Hafnia sp</i>	<i>Fusarium sp</i>	<i>Citrobacter sp</i>
<i>Rhodotorula sp</i>	<i>Geotrichum sp</i>	<i>Cladosporium sp</i>
<i>Serratia sp</i>	<i>Intraesporangium sp</i>	<i>Chromobacterium sp</i>
<i>Staphylococo sp</i>	<i>Klebsiella sp</i>	<i>Enterobacter sp</i>
<i>Streptomyces sp</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Escherichia sp</i>
<i>Torulopsis sp</i>	<i>* Pseudomonas cepacia</i>	<i>Fusarium sp</i>
	<i>Sarcina sp</i>	<i>Geotrichum sp</i>
	<i>Staphilococcus sp</i>	<i>Klebsiella sp</i>
	<i>Streptomyces sp</i>	<i>Penicillium sp</i>
		<i>Providencia sp</i>
		<i>* Pseudomonas cepacia</i>
		<i>Streptomyces sp</i>

\*Identificación complementaria hasta especie.