

# LLAGAS RADICULARES NEGRA (*ROSELLINIA BUNODES*) Y ESTRELLADA (*ROSELLINIA PEPO*) DEL CAFETO. I. PATOGENICIDAD E INFLUENCIA DE LA CLASE DE INOCULO EN LA INFECCION

Octavio Fernández-Borrero  
y Selma López \*

## INTRODUCCION

Las enfermedades radicales del cafeto tienen una amplia ocurrencia y se cuentan entre las más importantes, debido a los daños de consideración que ocasionan en la mayoría de los países cafetaleros (1,3,4,5,6,8,9,10,12,22,24). A pesar de eso, es muy poco lo que de ellas se sabe. Casi todos los trabajos conocidos son de naturaleza empírica y consisten en descripciones de meras observaciones de campo, muchas veces contradictorias. La ausencia de una clara y definida descripción de los síntomas de las diferentes enfermedades, en todos los estados de su desarrollo; la presencia constante de diversos organismos sobre material enfermo; y la falta de comprobación experimental de las verdaderas relaciones de cada uno de tales organismos con los diferentes síntomas que se observan en la naturaleza, han traído como consecuencia una tremenda confusión en el campo de las enfermedades radicales del cafeto.

En vista de la situación existente y considerando la importancia de las mencionadas enfermedades, en el Centro Nacional de Investigaciones de Café se realizó una serie de investigaciones sobre algunas de ellas.

---

\* Jefe y asistente respectivamente de la Sección de Fitopatología del Centro Nacional de Investigaciones de Café. Chinchiná, Colombia.

Específicamente, los autores se refieren aquí a las enfermedades radicales del cafeto conocidas en Colombia con los nombres de llagas "negra" y "estrellada", atribuidas a los hongos *Rosellinia bunodes* y *R. pepo*, respectivamente, y cuyas descripciones concuerdan con las hechas por Saccas (18), Viegas (20) y Fawcett (13).

En el presente artículo se dan los resultados de la primera fase del trabajo, relacionados especialmente con la patogenicidad y la influencia decisiva que tiene la clase de inóculo en la infección.

#### METODOS DE AISLAMIENTO

El *R. bunodes* fue aislado de raíces de cafetos infectados naturalmente, recolectadas en el Centro Nacional de Investigaciones de Café. Debido al lento desarrollo inicial del patógeno y a la presencia de otros organismos secundarios, especialmente de bacterias, *Fusarium* y *Trichoderma*, que rápidamente invadieron el medio, resultó difícil obtener el hongo en estado puro en cultivo artificial. Después de varios intentos se logró aislarlo, sembrando en P.D.A. acidificado, pequeñas porciones de tejidos desprendidos de los bordes de lesiones típicas de la enfermedad, previamente desinfectadas con bicloruro de mercurio al 1 por mil, durante 2 a 5 minutos y lavadas repetidas veces con agua destilada estéril.

El *R. pepo* se aisló de raíces enfermas de café, cacao y guamo (*Inga sp.*), siguiendo el mismo método anterior y también por siembra directa en el medio P.D.A. de fragmentos de micelio blanquecino en forma de estrella que se desarrolla entre la corteza y la madera. Al medio se le adicionó rosa de bengala en la proporción de 1 : 15.000. Este último sistema fue el que mejores resultados dió. Los aislamientos obtenidos de los tres susceptibles mencionados, resultaron morfológicamente iguales y los estudios de patogenicidad demostraron que se trataba del mismo hongo.

A los cinco días de incubación ambos organismos habían crecido suficientemente y se pasó micelio de las márgenes de las colonias a tubos de ensayo que contenían P.D.A. Los hongos se mantuvieron, bajo condiciones de laboratorio, por transferencias periódicas a nuevo medio.

A pesar de que los hongos no produjeron ningún tipo de fructificación, se identificaron como *R. bunodes* y *R. pepo* por la típica morfología microscópica de sus micelios y por la apariencia de las co-

lonias en cultivo puro, las que concordaron con las descritas por otros autores (17, 18, 20, 21). Posteriormente, la reproducción respectiva de los síntomas por medio de las inoculaciones artificiales, confirmaron plenamente sus identidades.

#### DESARROLLO DE LOS HONGOS EN DIFERENTES MEDIOS

Puesto que los dos organismos se desarrollaron lenta e irregularmente en P.D.A., se preparó una variedad de medios con miras a encontrar alguno que permitiera un buen desarrollo de los hongos. Fueron ellos.

*Medios naturales.* a) Se utilizaron los siguientes materiales: mazorca tierna de maíz, raíces y ramas de cafetos, pulpa y almendra de café, cáscaras y almendras de maní, yuca y zanahoria. Todos los cuales se partieron en pequeñas porciones, se envasaron y esterilizaron durante media hora a 15 lb de presión.

b) Se preparó un medio a base de extracto de maíz tierno y agar (M.T.A.), de la siguiente manera: 350 gramos de granos de maíz tierno se trituraron en una licuadora, en 1 litro de agua destilada. El extracto resultante se filtró a través de una doble tela de gasa, se restauró el volumen a 1 litro y se le agregó 10 gramos de agar. La preparación se puso directamente al fuego hasta la ebullición, teniendo el cuidado de agitarla constantemente; se distribuyó en los recipientes y se esterilizó de la manera usual. También se prepararon medios líquidos, en las proporciones de 4, 20, 60, 100, 160, 200 y 300 gramos de maíz tierno por litro.

c) Extracto de malta-agar (2 )  
y "lima bean-agar" (Difco).

*Medios semi-sintéticos.* Se prepararon tres medios a base de papa-dextrosa-agar, en los cuales se varió la concentración de los respectivos ingredientes, así: 1) 200-10-20; 2) 100-5-10; y 3) 400-20-40. También a la preparación normal (N°1) se le substituyó la dextrosa por otros carbohidratos: maltosa, sacarosa, glucosa, lactosa, levulosa, arabinosa, rafinosa, manosa, xilosa, dulcitol, almidón y dextrina.

*Medios sintéticos.* Se utilizaron varios medios basales de diferentes composiciones, adicionándoles las siguientes vitaminas, solas y en varias combinaciones y concentraciones: tiamina (2, 1 y 0.5 mg/l), riboflavina (1, 0.5 y 0.25 mg/l), piridoxina (1, 0.5 y 0.25 mg/l), inosi-

tol (5, 2.5 y 1.25 mg l), ácido nicotínico (4, 2 y 1 mg l) y ácido paraaminobenzoico (1, 0.5 y 0.25 mg l). La reacción de los medios, líquidos y sólidos, se ajustó a pH 6.0 y se esterilizaron a 15 lb de presión durante 10-12 minutos.

#### OBSERVACIONES

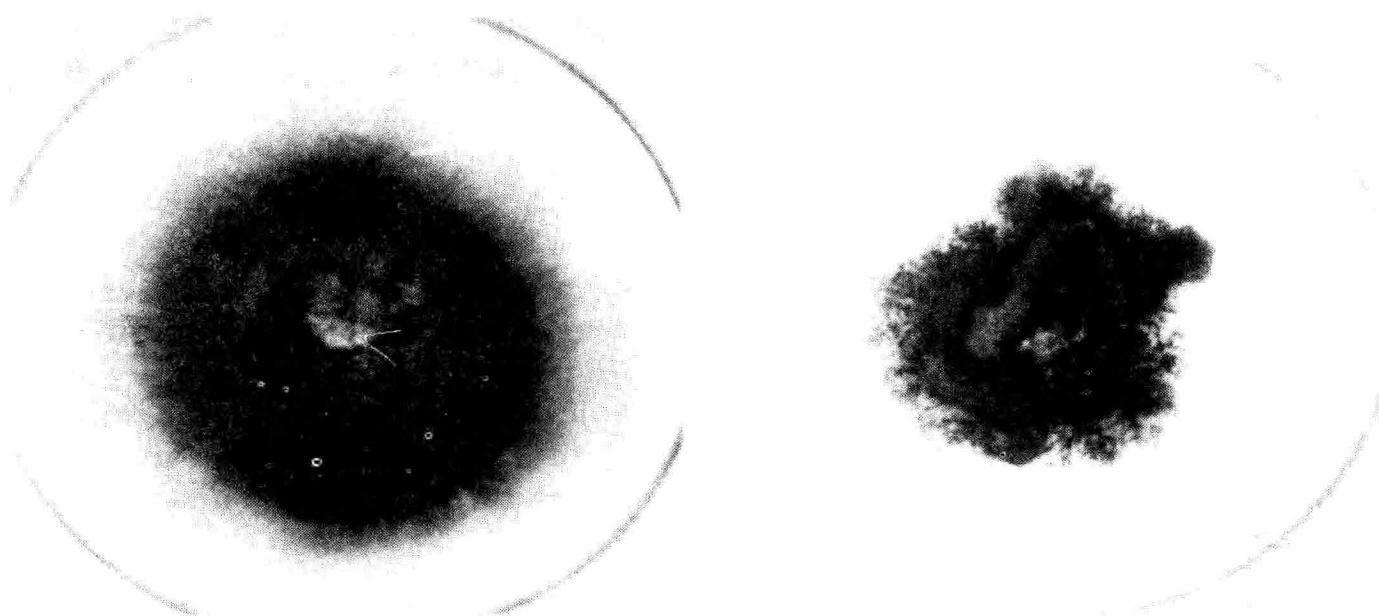
En los trocitos de mazorca tierna de maíz el micelio de *R. bunodes* creció rápidamente sobre la superficie, al principio a manera de una cubierta blanca algodonosa que parcial y progresivamente se fue obscureciendo, quedando al final unas porciones blancas y otras negras. En tal medio, el *R. pepo* creció más lentamente, a manera de una masa algodonosa, inicialmente de color gris claro y más tarde cambió a oscuro, uniformemente.

En los trozos de ramas de cafeto, ambos hongos tuvieron un buen desarrollo, y con características similares a las anteriormente descritas. Superficialmente se formaron agregados miceliales, que caracterizan a las dos enfermedades y que ocurren en las raíces naturalmente infectadas.

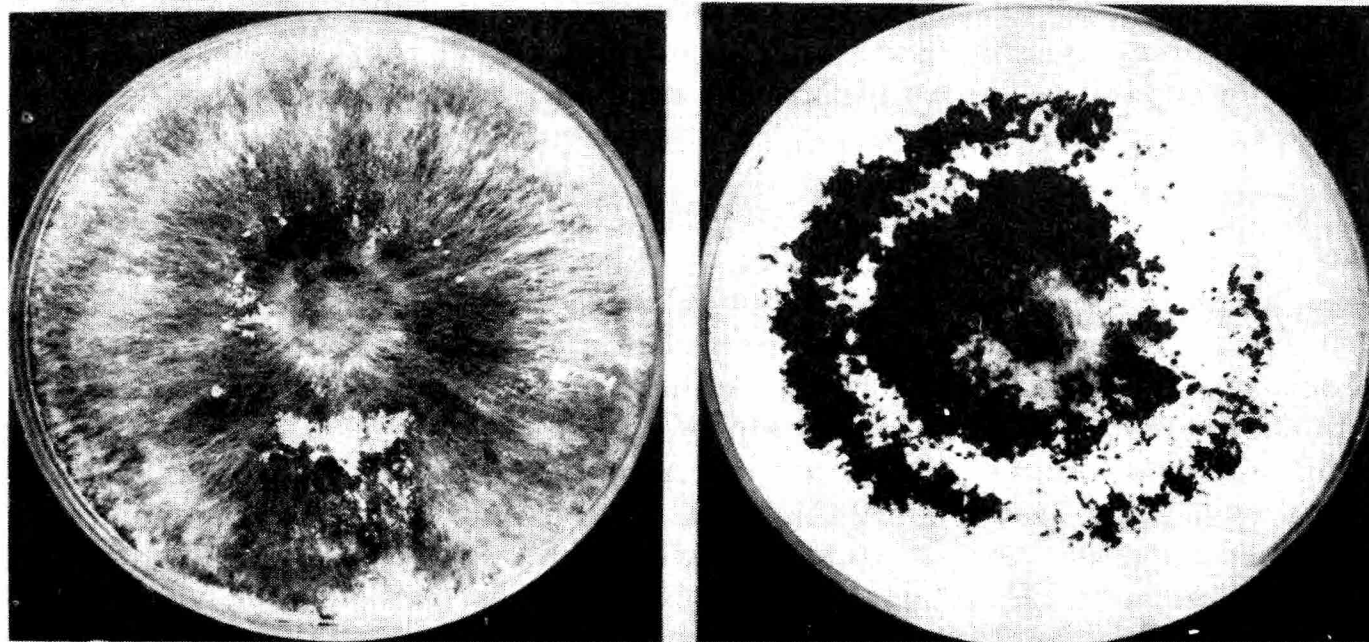
En los otros medios naturales (pulpa y almendra de café, yuca, zanahoria y maní) el micelio de *R. bunodes* invadió lentamente la superficie de los substratos, mediante hifas compactas, que formaron una especie de costra negra de consistencia coriácea.

El medio extracto de maíz tierno-agar (M.T.A.) fue el mejor para el desarrollo del *R. bunodes*. En dicho medio las colonias, al principio, fueron de color blanco y estaban compuestas de hifas gruesas y compactas; luego, cuando el hongo invadió la mayor parte de la superficie del medio, empezaron a ennegrecerse desuniformemente, presentando en su superficie parches negros y blancos. En ocasiones, cuando las condiciones ambientales fueron adversas al crecimiento del hongo, las colonias se volvieron lisas y coriáceas, con bordes definidos y permanecieron uniformemente negras o blancas. El desarrollo del *R. pepo* en este medio fue inferior al de *R. bunodes*. Las colonias, de aspecto algodonoso, crecieron uniformemente; el micelio, de color pardo o grisáceo, al principio, tomó una coloración de café, al final.

En los medios P.D.A., en sus diversas concentraciones, malta-agar y "lima-bean", el desarrollo de ambos hongos fue más limitado, siendo siempre superior el del *R. bunodes* (Fig. 1). En general, en tales medios, las descripciones de los hongos concuerdan con las hechas por Rodríguez (17) y Waterston (21). La sustitución de la dextrosa por



A



B

**Figura 1.** Efecto del medio de cultivo en el desarrollo micelial. Izquierda: extracto de maíz tierno y agar; derecha: papa, dextrosa y agar. A. *Rosellinia pepo*, 14 días de incubación. B. *R. bunodes*, 6 y 8 días de incubación, respectivamente.

otros azúcares, en la preparación normal del medio P.D.A., no influyó fundamentalmente en el desarrollo de los dos organismos, salvo en los casos del dulcitol y de la galactosa que parcialmente inhibieron el crecimiento de *R. pepo*.

En los medios sintéticos el desarrollo micelial de los hongos fue insignificante, casi ausente. La adición de las vitaminas no tuvo efecto benéfico alguno, en las concentraciones y combinaciones ensayadas.

Waterston (21) obtuvo estructuras asexuales de reproducción de *R. pepo* en malta-agar, P.D.A. y ramas esterilizadas de cacao. Sin embargo, en ninguno de los medios aquí descritos fue posible la obtención de algún tipo de estructura reproductiva.

En todos los medios ensayados las colonias de *R. pepo* presentaron con frecuencia sectores que se diferenciaron unos de otros en el color y la apariencia. No así las de *R. bunodes* que siempre permanecieron uniformes a través de las sucesivas transferencias.

#### PATOGENICIDAD

Waterston (21) demostró la patogenicidad del *R. pepo* en planticas de cacao; pero, hasta donde los autores saben, aún no se ha comprobado experimentalmente las relaciones de tal hongo con la llaga "estrellada" del cafeto. Viegas (20), de otro lado, obtuvo resultados parcialmente positivos trabajando en café con el *R. bunodes* aislado de yuca (*Manihot utilissima*). Alvarez (7) y Wellman (23) no lograron reproducir los síntomas de las dos enfermedades en sus respectivos estudios de patogenicidad. Posteriormente, el mismo Alvarez (6) consideró que el *R. bunodes* en café, era un simple saprófito.

Con el propósito de clarificar tal situación se realizaron varios ensayos de inoculación, utilizando diversos tipos de inóculo y plantas en diferentes estados de desarrollo.

#### MATERIALES y METODOS

*A. Inóculo natural.* En el caso de *R. pepo* se utilizaron los siguientes tipos de inóculo: 1) agregados miceliales negros que se

desarrollan superficialmente sobre las raíces de árboles atacados; 2) micelio blanco en forma de abanicos o de estrellas, desprendido del interior de la corteza y parte externa del leño; 3) pedazos de corteza de raíces infectadas; 4) pedacitos de raíces descortezadas, de 2 cm de largo por 1 cm de diámetro; 5) trocitos de raíces enfermas, de las siguientes dimensiones: a) 4.2 x 2.5, b) 4.0 x 1.25 y c) 2.0 x 0.5, cm de largo por cm de diámetro; y 6) suelo recolectado del rededor de raíces de árboles que habían muerto de infecciones naturales. Dicho suelo llevaba incorporado raicillas afectadas y también agregados miceliales del hongo. En este último caso se sembraron planticas de 90 días de edad ("chapolas") en recipientes que contenían el suelo. Con los tipos 1 y 2 se inocularon "chapolas" colocando alrededor del cuello de la raíz varias porciones del respectivo inóculo. Con los tipos restantes se inocularon plántulas de *C. arabica* var. caturra, de 7 meses, previamente heridas. En el caso de los inóculos 3 y 4 se procedió en la misma forma descrita para las "chapolas" y para el tipo de inóculo 5, únicamente se utilizó un trocito por planta.

Se comprobó que el *R. pepo* fue capaz de desarrollar nuevo micelio a partir de las diferentes clases de inóculo, lo que demostró su viabilidad. Sin embargo, el crecimiento fue muy limitado en casi todos ellos.

Con el *R. bunodes* sólo se emplearon los tipos de inóculo 3, 4 y 6, siguiendo los mismos métodos de inoculación para "chapolas" y plántulas.

*B. Inóculo artificial.* La patogenicidad de los *Rosellinia* aislados de raíces enfermas se probó inoculando plantas de café en diversos estados de desarrollo: "chapolas" cultivadas en suelo esterilizado y sin esterilizar, plántulas de 6-8 meses de edad y árboles de 4 años, sembrados individualmente en cajones de madera. Como inóculo se utilizó el mismo empleado por Viegas (20), consistente en pedazos esterilizados de mazorca de maíz sobre los cuales se habían cultivado previamente los hongos. Se siguieron los siguientes métodos de inoculación, cuando se trató de "chapolas" y de plántulas: 1) igual cantidad de inóculo se colocó a ras del suelo, alrededor del tallo, y se protegió con un pedazo de algodón, el cual se mantuvo húmedo durante el período de incubación; 2) se descubrió un poco el sistema radicular y se puso el inóculo en contacto con las raíces, a la altura del cuello; 3) similar al 2, pero con la diferencia de que en este caso se hirieron algunas raíces y el cuello de la planta; 4) inóculo localizado a 5 cm del cuello de plántulas sembradas individualmente en bolsas de polietileno. En un caso el inóculo se dejó superficialmente y en otro se enterró a unos 3 cm. Los árboles adultos se inocularon con el *R. bunodes*, por los sistemas 2 y 3.

En todos los tratamientos se dejaron los respectivos testigos, en los cuales el inóculo fue reemplazado por trocitos esterilizados de mazorca de maíz.

También se inocularon "chapolas" de café con las especies de *Fusarium* que frecuentemente aparecieron en el medio durante el proceso de aislamiento.

Posteriormente se probó la susceptibilidad de las variedades comerciales de café típica, borbón y caturra, siguiendo el segundo de los sistemas de inoculación descritos.

RESULTADOS

*A. Inóculo natural.* A los cuarenta días de incubación se dió por finalizado el ensayo. De acuerdo con los resultados (tabla 1), sólo sirvieron como inóculo efectivo, en forma limitada, el tipo 5 (a y b). En los demás casos, el poco desarrollo de nuevo micelio no fue suficiente para que el organismo pudiera establecer relaciones parasitarias. En pos-

Tabla 1. Influencia de la clase de inóculo natural en la patogenicidad de *Rosellinia pepo*.

Plántulas o chapolas	Clase de inóculo							
	Agregados miceliales	Abanicos miceliales	Corteza de raíces	Raíces descortezadas	Trocitos de raíces de diferentes dimensiones (cm)			Suelo infestado
					4.2x2.5	4.0x1.25	2.0x0.5	
Inoculadas	20	20	15	15	15	15	15	15
Infectadas	0	0	0	0	4	3	0	0

teriores ensayos de patogenicidad se comprobó que pedazos de raíces contaminadas, de un tamaño mucho mayor que los indicados, tampoco fueron satisfactorios como inóculo.

Con el *R. bunodes* los resultados fueron totalmente negativos.

Los anteriores resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores. Waterston (21), trabajando con *R. pepo* en cacao, encontró que porciones de raíces naturalmente infectadas no fueron satisfactorias como fuentes de inóculo. Tampoco pudo reproducir la enfermedad utilizando conidias del organismo. Alvarez (6) fracasó cuando tra-



tó de reproducir la "llaga negra" en plántulas de café sembradas en suelo naturalmente contaminado con *R. bunodes*. Carruthers (citado por Alvarez), igualmente fue incapaz de reproducir una enfermedad radicular del árbol de té causada por una especie de *Rosellinia*, cuando utilizó como inóculo ascosporas del hongo. De otro lado, ciertos autores (2, 5, 11, 12, 18) afirman que las dos enfermedades pueden ser diseminadas en la naturaleza por estructuras de los patógenos.

*B. Inóculo artificial.* Los resultados positivos obtenidos en todas las inoculaciones artificiales efectuadas con los dos organismos confirman sin duda alguna que los hongos *R. bunodes* y *R. pepo* son los verdaderos agentes causales de las llagas radiculares "negra" y "estrellada" del cafeto. Seguidamente se describen las observaciones hechas en las diferentes inoculaciones.

*Chapolas.* Todas las chapolas inoculadas con *R. bunodes* murieron. Los primeros síntomas de la enfermedad aparecieron al segundo día después de las inoculaciones, manifestados por una pudrición húmeda en la raíz y cuello de las "chapolas," acompañada de una coloración parda clara que se hizo oscura con el progreso de la infección. Esta necrosis de los tejidos no sobrepasó la parte del tallo localizado al nivel del suelo. Al tercer día, el cuello y la base del tallo empezaron a perder agua y al cuarto día se observaron deprimidos, a todo lo largo de la extensión de la necrosis. Superficialmente, sobre los tejidos lesionados, se hizo visible el crecimiento micelial del hongo, a manera de una red de finísimos hilos blancos. A partir del quinto día empezaron a manifestarse los síntomas en la parte aérea; las hojas cotiledonares se tornaron completamente flácidas y comenzaron a marchitarse; se doblaron por el pedúnculo y dos días más tarde estaban completamente secas, quedando adheridas al talluelo, el cual permaneció rígido a pesar de haberse secado totalmente (Fig. 2).

Con *R. pepo* los primeros síntomas radiculares aparecieron en un tiempo mínimo de 5 días; la pudrición parda de la raíz fue seca y no ocurrió constricción local de los tejidos afectados; el micelio del hongo corrió abundantemente a lo largo del sistema radicular, formando agregados miceliales de color gris claro, al principio, y oscuro, más tarde; hubo un mayor ataque y consecuente destrucción de las raíces secundarias, parejamente con la raíz principal (Fig. 2). En general, los síntomas aéreos fueron iguales a los anteriormente descritos para *R. bunodes*.

En ambos casos, el período de incubación fue un poco más corto cuando las chapolas se hirieron antes de las inoculaciones.

Los resultados en suelo estéril fueron iguales a los

