

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

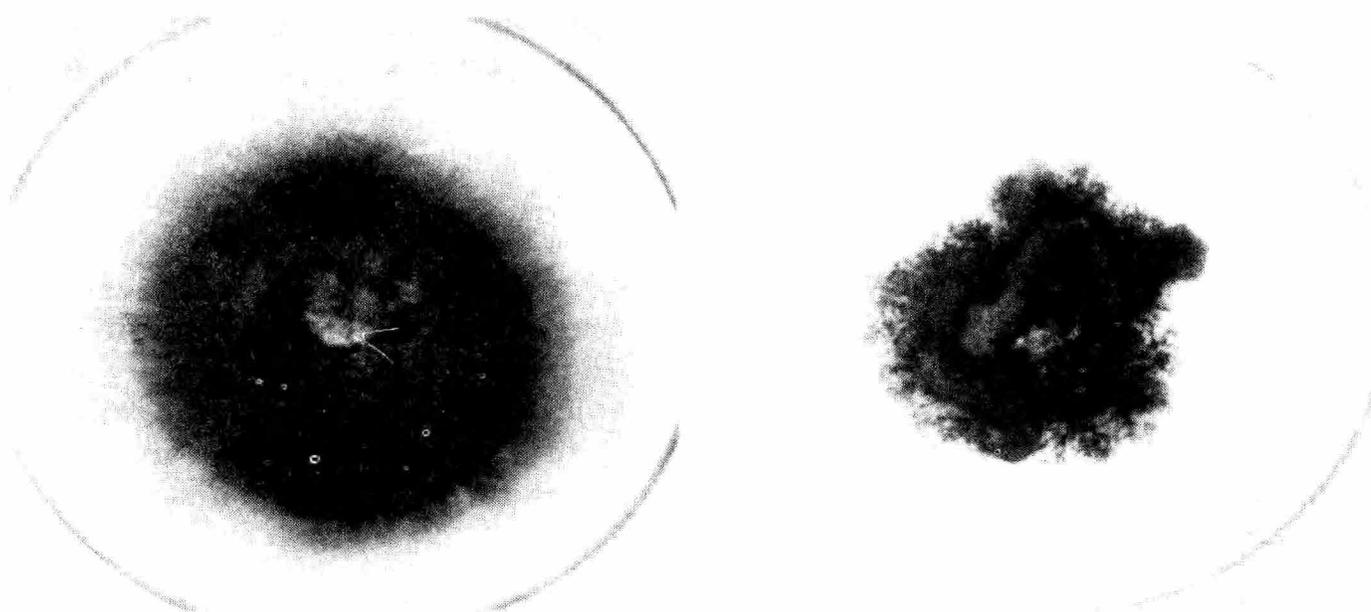
En los trocitos de mazorca tierna de maíz el micelio de *R. bunodes* creció rápidamente sobre la superficie, al principio a manera de una cubierta blanca algodonosa que parcial y progresivamente se fue oscureciendo, quedando al final unas porciones blancas y otras negras. En tal medio, el *R. pepo* creció 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.

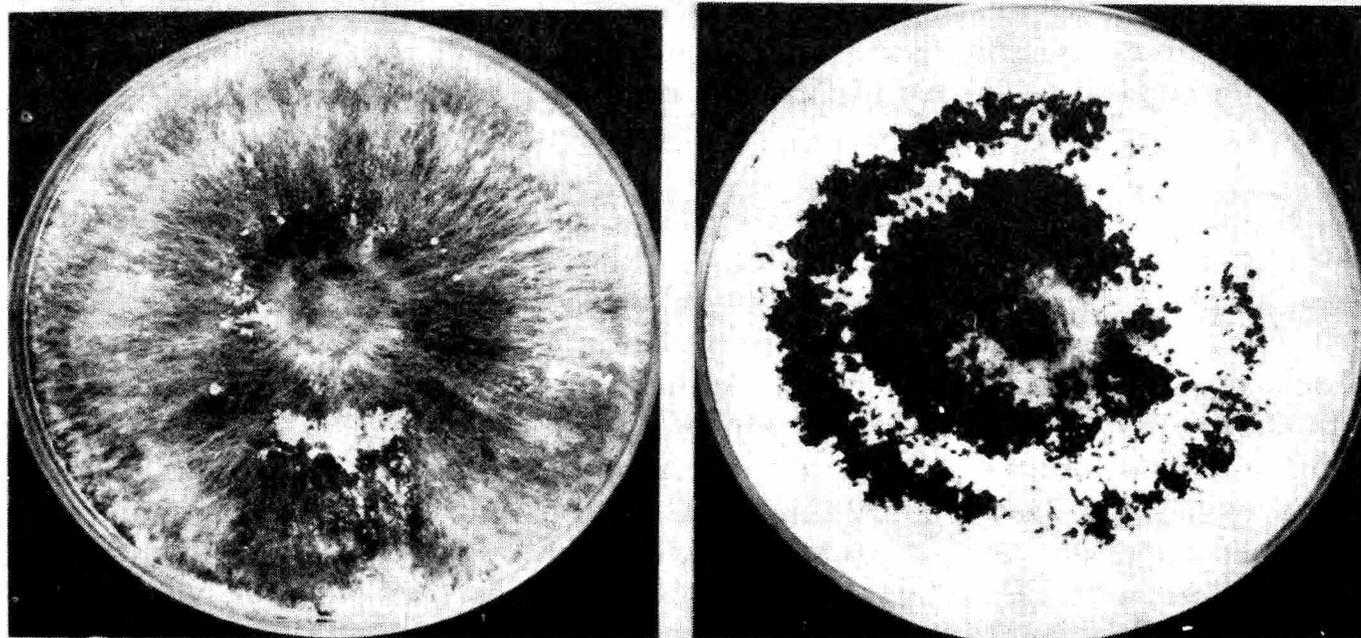
En los otros medios naturales (pulpa y almendra de café, yuca, zanahoria y maní) el micelio de *R. bunodes* invadió lentamente la superficie de los substratos, mediante hifas compactas, que formaron una especie de costra negra de consistencia coriácea.

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

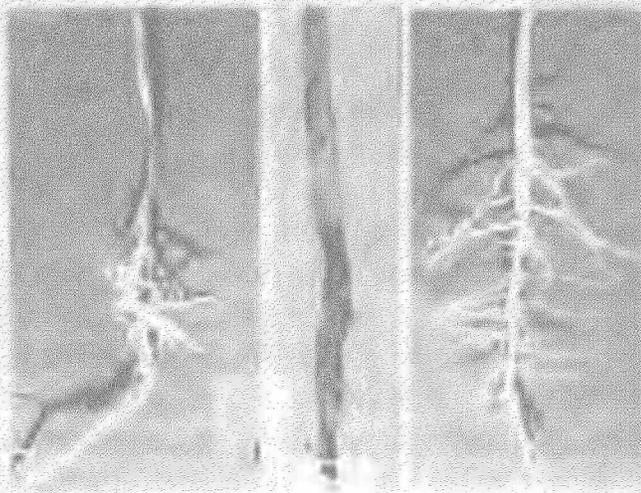


Figura 2.



Figura 3.



Figura 4.

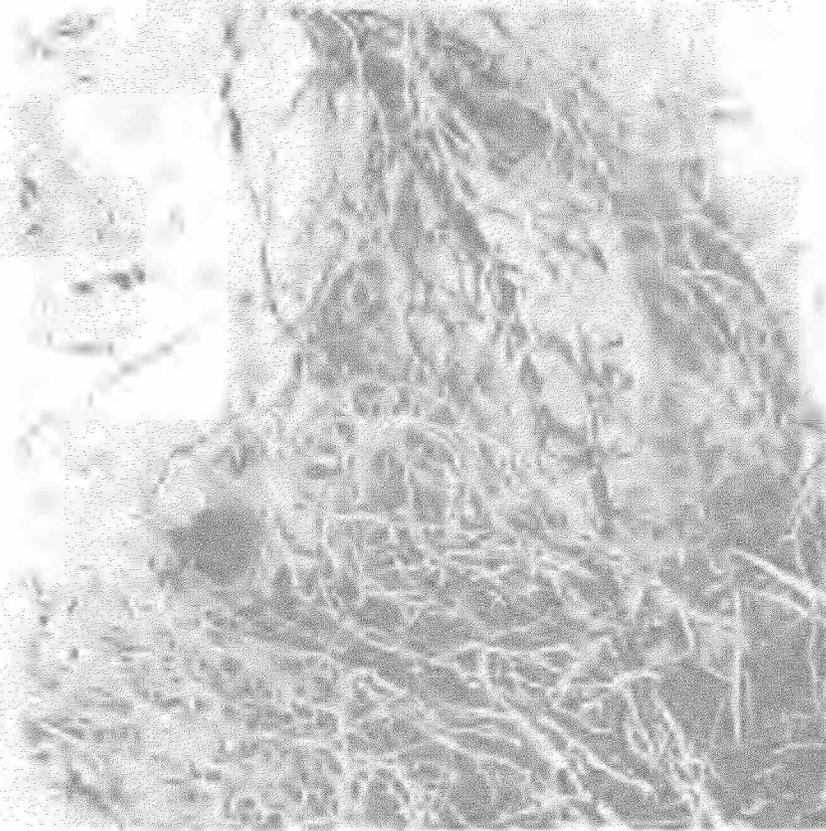


Figura 2. Síntomas radiculares en "chupales" de café inoculados artificialmente. Izquierda: *Rosellinia humicola*; centro: *R. pepo*; y derecha: testigo, no inoculado.

Figura 3. Síntomas séricos en plántula de café inoculada artificial e indistintamente con *Rosellinia humicola* o *R. pepo*. Izquierda: inoculada; derecha: testigo, sin inocular.

Figura 4. Síntomas radiculares en plántula de café inoculadas artificialmente. Izquierda: *Rosellinia pepo*; centro: *R. humicola*; y derecha: testigo, sin inocular. Obsérvanse los abaricos miceliales y los puntos negros característicos de las llagas "estrelladas" y "negra", respectivamente.

obtenidos en suelo sin esterilizar.

Las chapolas inoculadas con las especies aisladas de *Fusarium*, así como los testigos, se desarrollaron normalmente y no presentaron ningún síntoma de infección.

Plántulas de almácigo. Con el *R. bunodes* se obtuvo un 100 por ciento de mortalidad. Los primeros síntomas visibles en el follaje se notaron por lo general a los 14 días de incubación, manifestados por súbito decaimiento y flacidez de las hojas (Fig. 3). Para entonces, había ocurrido un ablandamiento de la corteza de la raíz hasta el nivel del suelo. Progresivamente, los tejidos fueron perdiendo agua y, una vez totalmente necrosados, se formó una depresión entre la parte sana y enferma, claramente diferenciada. Paulatinamente las hojas se fueron marchitando, se doblaron por el pecíolo y terminaron por secarse, al ocurrir la muerte total de la planta, a los 18 días de las inoculaciones. Sobre las raíces muertas se observó la formación de agregados miceliales, al principio blanquecinos y posteriormente de un color marrón oscuro. Superficial e internamente, en el leño de las partes atacadas de la raíz, se formaron los puntos negros y rayas longitudinales característicos de la enfermedad (Fig.4).

En el caso de *R. pepo* no ocurrió ablandamiento de la corteza de la raíz, ni la constricción de los tejidos necrosados. Fue más bien una pudrición seca y, al igual que en las chapolas, hubo un ataque más pronunciado en las raíces secundarias, quedando, en muchos casos, la raíz pivotante completamente desnuda. El micelio, organizado en agregados miceliales, se extendió a lo largo del sistema radicular. Al desprender la corteza de la raíz se observó claramente, adheridas al leño, las estrellas o abanicos miceliales que sirven como signos distintivos de la enfermedad (Fig. 4). Los síntomas aéreos fueron similares a los descritos para *R. bunodes*, con la diferencia de que comenzaron a manifestarse a los 18 días de incubación, como mínimo (Fig. 3).

El período de incubación en las dos enfermedades fue un poco menor cuando las plántulas se hirieron en el lugar de la inoculación. Sin embargo, al causar heridas se estimuló la emisión de nuevas raíces y, por tanto, resultó más satisfactorio no herir los tejidos.

De todos los sistemas de inoculación ensayados, el N° 2, descrito en materiales y métodos, fue el que dio mejores resultados. El sistema menos efectivo fue el N° 4, con el cual, para el caso de *R. bunodes*, solo se obtuvo un 31% de mortalidad.

Las variedades de café típica, dorbón y caturra

resultaron igualmente susceptibles a ambas enfermedades, en cuanto que en todas ellas ocurrió, bajo similares condiciones, un porcentaje igual de mortalidad. Sin embargo, para el caso de *R. bunodes*, se observó que el tiempo transcurrido desde la inoculación hasta la muerte, en la variedad borbón estuvo comprendido entre los 10 y 15 días; en la variedad caturra, entre los 14 y 18 días; y en la variedad típica, entre los 16 y 20 días, prolongándose, en algunos casos, hasta los 25 días. También se encontró que en la variedad borbón las rayitas y puntos negros típicos en las raíces aparecieron simultáneamente con la manifestación de los síntomas aéreos mientras que en las variedades típica y caturra la manifestación de tales signos ocurrió varios días antes y varios días después, respectivamente, de haberse notado los síntomas en el follaje. Con el *R. pepo* no se observaron variaciones apreciables.

Arboles en producción. Igualmente, se obtuvo una mortalidad del 100 por ciento con las inoculaciones de *R. bunodes*. En este caso el proceso de la infección fue mucho más lento, como era de esperarse. Al mes de inoculados los árboles, sus raicillas estaban completamente invadidas, la corteza de raíces secundarias y principal comenzaron a mostrar síntomas de pudrición y el micelio había penetrado en el leño; al siguiente mes ya hubo aparición de las típicas puntuaciones negras, localizadas superficialmente sobre la madera. Al cuarto mes los síntomas se habían extendido en toda la raíz, hasta el nivel del suelo. La penetración del hongo era ya más profunda en el leño, lo que estaba indicado por la formación más interna de las puntuaciones y rayas negras. Después de los seis meses, los árboles comenzaron a manifestar los primeros síntomas en el follaje, con la aparición de una clorosis a lo largo de las nervaduras que progresivamente se fue extendiendo por toda la lámina, hasta quedar las hojas completamente amarillas, para luego desprenderse. No se inocularon plantas en tal estado de desarrollo con *R. pepo*.

Los hongos fueron reaislados del material artificialmente infectado.

INFLUENCIA DE LA BASE ALIMENTICIA EN LA INFECCION

Observaciones preliminares habían indicado que el substrato sobre el cual se incrementaban los hongos para su utilización como inóculo tenía una influencia decisiva en el éxito o fracaso de la infección. Por tanto, se decidió hacer un estudio detallado sobre dicho aspecto tan fundamental. Para esto, los hongos se incrementaron previamente en trocitos de ramas de café de 20, 15, 10, 5, 2.5, 1 y 0.5 gramos de peso, en P.D.A. y en el medio extracto de maíz tierno agar (M.T.A.). Se inocularon 25 plántulas de café de la variedad caturra de 8 meses, en cada trata-

miento. El método de inoculación consistió en colocar, en cada caso, un trocito y el desarrollo de los hongos adquirido en una caja de petri con los referidos medios, alrededor del cuello de la raíz. Al cabo del período de incubación se determinó el porcentaje de plántulas muertas por tratamiento.

Los resultados obtenidos (Tabla 2) muestran cómo el porcentaje de plántulas muertas fue disminuyendo progresivamente con la correspondiente disminución del peso del inóculo, hasta llegar a cero. El micelio desarrollado en el medio M.T.A. fue un inóculo, tan efectivo como el desarrollado en los trozos de ramas de café de 20 gramos de peso.

Tabla 2. Efecto de la base alimenticia en la infección de plántulas de café inoculadas con *Rosellinia bunodes* y *Rosellinia pepo*.

Naturaleza y peso del inóculo (g)	Porcentaje de plántulas muertas		Días promedios de incubación	
	<i>R. bunodes</i>	<i>R. pepo</i>	<i>R. bunodes</i>	<i>R. pepo</i>
25.0	100	95	10	19
15.0	100	75	10	19
10.0	80	50	13	21
5.0	64	45	14	25
2.5	16	0	24	—
1.0	8	0	27	—
0.5	0	0	—	—
P.D.A.	67	0	12	—
M.T.A.	100	—	10	—

En dicho medio (M.T.A.) el *R. bunodes* adquirió un crecimiento micelial vigoroso y compacto que le permitió acumular suficiente reserva para un posterior buen desarrollo, previo a la infección. El P.D.A. fue una base alimenticia más pobre para *R. bunodes* y totalmente nula para *R. pepo*. La energía para el crecimiento (16), derivada de la base alimenticia y necesaria para la infección, fue más crítica para el caso de *R. pepo*. En ambas enfermedades, los días de incubación aumentaron con la disminución del peso del inóculo, pero dicho período fue siempre más prolongado en la llaga “estrellada” (*R. pepo*).

EXTENSION MICELIAL E INFECCION

A partir de diferentes bases alimenticias, se estudió la capacidad que tienen los dos hongos para extenderse libremente en el suelo y también la relación entre dicha extensión y la habilidad de producir infección. En cajones de madera de 30 x 27 x 12 cm, con suelo de un ca-

fetal y mantenido a una humedad cercana a la capacidad de campo, se sembraron chapolas de café en hileras distanciadas a 4 centímetros. Dentro de las hileras las chapolas estuvieron también separadas entre sí a 4 cm. En uno de los extremos de los cajones, en toda la extensión de su ancho y a 2 cm de profundidad, se colocaron los hongos previamente incrementados sobre los siguientes substratos: extracto de maíz tierno-agar (M.T.A. franjas de 1.5 cm de ancho), mazorca tierna de maíz y ramas de cafeto de 2 cm de diámetro. Los cajones se dejaron en completa obscuridad. Al final del experimento se determinó el avance logrado por el micelio en el suelo y el porcentaje de chapolas muertas.

En la Tabla 3 se resumen los resultados del experimento. Aunque el inóculo se colocó a una profundidad de 2 cm, el micelio se desarrolló e invadió las planticas superficialmente. Este desarrollo superficial del hongo, a partir de las diferentes bases alimenticias, fue compacto y parejo hasta que alcanzó la primera hilera (4 cm); luego, a medida que fue avanzando en el suelo, tuvo un desarrollo irregular y menos compacto.

Tabla 3. Mortalidad de "chapolas" de café sembradas a varias distancias de la fuente de inóculo de *Rosellinia bunodes*, desarrollado sobre diferentes bases alimenticias.

Nº de hileras	Distancia del inóculo (cm)	% de chapolas muertas		
		Extracto maíz-agar (M.T.A.)	Mazorca tierna de maíz	Ramas de cafeto
1	4	100	100	100
2	8	0	86	100
3	12	0	43	80
4	16	0	14	20
5	20	0	0	0
6	24	0	0	0

El máximo porcentaje de mortalidad ocurrió en la hilera de chapolas más cercanas al inóculo y el ataque decreció progresivamente con el aumento sucesivo de la distancia. El desarrollo máximo del hongo, a los 26 días, llegó hasta la 4a hilera. De ahí en adelante no se observó posterior progreso del micelio.

Las tres bases alimenticias fueron igualmente efectivas hasta la primera hilera de chapolas. El rápido agotamiento del medio M.T.A. no soportó un avance del micelio más allá de los primeros 4 cm. Respecto de las otras dos bases, la de rama de cafeto fue superior, en cuan-

to permitió un desarrollo micelial más vigoroso, después de haber alcanzado y matado la primera hilera de chapolas.

DISCUSION

Los resultados de la presente investigación demostraron de manera concluyente que los hongos *Rosellinia bunodes*, y *R. pepo*, son los verdaderos agentes causales de las llagas "negra" y "estrellada" del cafeto, respectivamente. Las diferentes especies de *Fusarium* que comunmente se encontraron asociados con las dos enfermedades resultaron ser simples saprófitos.

Los estudios de patogenicidad indicaron la importancia definitiva que tuvo la clase de inóculo en el proceso de la infección. En concepto de Garret (14) para que ocurra una progresiva infección del hospedante, el patógeno necesita ejercer una mínima fuerza invasora la cual es suministrada por el inóculo, hasta que se establezca una infección independiente. De manera similar, los autores encontraron que tanto el *R. bunodes* como el *R. pepo*, antes de penetrar en las raíces de su hospedante para establecerse como parásitos, necesitaron hacer primero un vigoroso crecimiento ectotrófico a lo largo del sistema radicular y el éxito o fracaso en la infección dependió del mayor o menor desarrollo previo adquirido por los hongos. El crecimiento externo dependió de los substratos sobre los cuales se encontraron los organismos. Cuando la base alimenticia fue insuficiente, los hongos no pudieron llegar hasta la fase parasitaria, ya que por agotamiento del substrato no fueron capaces de continuar su crecimiento y murieron antes de vencer la resistencia pasiva del susceptible. Contrariamente, una base alimenticia suficiente permitió que los hongos aumentaran notablemente su inóculo potencial (14, 16) y llegaron a establecerse como verdaderos parásitos. En la Tabla 2 se observa como, a medida que el peso del inóculo fue disminuyendo, la habilidad de los hongos para causar infección igualmente fue decreciendo, hasta llegar a un nivel crítico del inóculo potencial, por debajo del cual no ocurrió infección. Aunque los dos hongos se comportaron de una manera similar a este respecto, sin embargo, dicho nivel crítico fue alcanzado más rápidamente por *R. pepo*. Los resultados aquí obtenidos, respecto de la infección en relación con el tamaño de la base alimenticia, son similares a los descritos para otros hongos (15).

Aun cuando el período de incubación varió proporcionalmente con el tamaño de la base alimenticia, siempre fue más prolongado el de la llaga "estrellada" (*R. pepo*), y, en igualdad de condiciones, el *R. bunodes* mostro ser un patógeno más agresivo.

El tamaño y condición del inóculo natural fueron factores limitantes en la infección. Únicamente el inóculo de determinadas dimensiones (Tabla 1) fue parcialmente efectivo, pero nunca alcanzó un nivel de efectividad tan alto como el del inóculo artificial (Tabla 2) de igual o aún mucho mayor base alimenticia. Tales resultados confirman los obtenidos por otros autores (21, 6). A la luz del análisis hecho anteriormente para el caso del inóculo artificial, resultó evidente que las diversas clases de inóculos naturales utilizados rápidamente se agotaron y el nuevo micelio producido murió antes de que se produjera la invasión del susceptible.

La enfermedad radicular del cafeto que se encuentra en Puerto Rico, y que Alvarez (6) comprobó ser causada por el *Fusarium bulbigenum*, es totalmente diferente a la llaga "negra" causada por *R. bunodes*. Por los síntomas que el mencionado autor describe y por los aislamientos de *R. bunodes* obtenidos por él de material enfermo, se infiere que las dos enfermedades se pueden dar allí simultáneamente en el mismo árbol, y los resultados negativos obtenidos en sus estudios de patogenicidad, se pudieron deber al sistema de inoculación empleado, especialmente en lo relacionado con la clase de inóculo utilizado. Sus conclusiones sobre el carácter saprofítico de *R. bunodes* están en completo desacuerdo con nuestros evidentes resultados. Igualmente, Welman (23) fracasó en sus intentos de reproducir las dos enfermedades posiblemente por el tipo de inóculo utilizado.

Muchos conceptos se han expuesto en relación con las diferentes posibles maneras de diseminación natural de las dos enfermedades. Así, Saccas (18) afirma que ellas pueden ser diseminadas por coridias y ascoporas, transportadas por el viento y los insectos a grandes distancias. Alvarado (5) es de opinión similar, en relación con el *R. bunodes*. Duque (12) considera que los abanicos miceliales y los peritecios de *R. pepo* pueden servir para los procesos de inoculaciones artificiales. Los resultados obtenidos en el presente trabajo se apartan totalmente de tales puntos de vista. Nuevamente, el micelio producido por las esporas y demás estructuras de los hongos, separadas de las partes atacadas del susceptible, dependerían de una base alimenticia tan pobre que rápidamente moriría, mucho antes de establecerse independientemente en sus hospedantes.

También se ha dicho que los rizomorfos que se originan en las raíces de los cafetos afectados, avanzan por el suelo a considerable distancia y establecen contacto con árboles sanos, diseminando así las enfermedades (2, 11, 18). Aunque no se haya observado que los *Rosellinias* estudiados produzcan estructuras con una morfología de verdaderos rizomorfos (14, 16), sino simples agregados miceliales, los resultados obtenidos aquí sobre la libre extensión de tales agregados a través del suelo

(Tabla 3) indicaron que tal proceso fue limitado y en el éxito de la infección, la distancia fue crítica: a medida que el micelio se alejó de la base alimenticia, su efectividad para causar enfermedad disminuyó sensiblemente. Viegas (20) no logró obtener infección de plantas sanas de café distanciadas a 20 cm de plantas inoculadas e infectadas con *R. bunodes*. Es posible, por tanto, que en la naturaleza tal método de diseminación, de existir, sea igualmente limitado, de manera similar a como ocurre con *R. necatrix* (19).

Analizando la diseminación de las dos enfermedades, basados en los resultados logrados por los autores, los métodos más factibles serían por contacto directo de raíces enfermas y sanas y por el transporte de pedazos de raíces contaminadas, lo suficientemente grandes como para que sirvan de inóculo efectivo, y que queden localizados lo más cercanamente posible a los órganos susceptibles del cafeto. Por esto último es razonable suponer que las zanjas de aislamientos, recomendadas por algunos autores (8, 12, 13) no hayan detenido el avance de las dos enfermedades (6, 2, 24). De ser factible, la aplicación del principio de sanidad de extraer y destruir todas las raíces grandes de un árbol afectado, sería el método más efectivo para combatir las dos enfermedades en las resiembras. Waterston (21) empleando este sistema, en cacao, obtuvo excelentes resultados con *R. pepo*. Desde luego, esto no evitaría las nuevas contaminaciones por transporte de material infectado.

RESUMEN

De varios medios de cultivo ensayados, uno preparado a base de maíz tierno y agar fue óptimo para el desarrollo de los hongos *Rosellinia bunodes* y *R. pepo*. En medios sintéticos suplementados con varias vitaminas el crecimiento de ambos organismos fue prácticamente nulo.

Por medio de inoculaciones artificiales de plantas de café en todos los estados de desarrollo, se reprodujeron los síntomas típicos de las dos enfermedades. El inóculo consistió en trozos de mazorca tierna de maíz y de ramas de café sobre los cuales se habían incrementado los hongos. El mejor método de inoculación fue el de colocar el inóculo en contacto con las raíces a la altura del cuello de la planta.

No fue posible reproducir ninguna de las dos enfermedades cuando se inocularon "chapolas" o plántulas de café con agregados miceliales desprendidos de material naturalmente contaminado con *Rosellinia pepo* y *R. bunodes* ni tampoco utilizando los abanicos miceliales blanquecinos de *R. pepo*. Cuando se emplearon pedazos de raíces natu-

ralmente infectadas, solo fue parcialmente efectivo el inóculo de determinadas dimensiones de *R. pepo*. Con *R. bunodes* los resultados fueron negativos.

La base alimenticia tuvo una influencia decisiva en la infección. Cuando ésta fue suficiente, los dos hongos aumentaron notablemente su inóculo potencial y hubo una infección exitosa. Contrariamente, cuando dicha base fue insuficiente los hongos murieron antes de establecerse en sus susceptibles. Se encontró también que la libre extensión del micelio a través del suelo estuvo en relación con la naturaleza de la base alimenticia, y a medida que el micelio se iba alejando fue disminuyendo notablemente su efectividad para causar enfermedad.

Las dos enfermedades se diseminan fundamentalmente por contacto directo de raíces enfermas y sanas y por el transporte de partes grandes de raíces contaminadas. La aplicación del principio de sanidad de extraer y destruir todas las raíces grandes de un árbol afectado, sería el método más efectivo para evitar las dos enfermedades en las re-siembras.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ABBOTT, E. V. Diseases of economic plants in Perú. *Phytopathology* 19(7):645-656. 1929.
- 2.- ABRAHAO, J. Combate a roselinose do cafeeiro. *O. Biologico* 16(8):172-173. 1950.
- 3.- ———— A "podridao das raizes" do cafeeiro. *O. Biologico* 17(5):87-89. 1951.
- 4.- ABREGO, L. Podredumbre radicular de los cafetos. Santa Tecla. Instituto Salvadoreño de Investigaciones del Café. *Boletín Informativo* no. 40:4-6. 1962.
- 5.- ALVARADO, J. A. Enfermedades del cafeto. *El café de El Salvador*. 7(79):296-299, (80):340-342. 1937.
- 6.- ALVAREZ G., L. A. Studies on coffee root disease in Puerto Rico. I. A coffee fusarium wilt. Puerto Rico. University. *Journal of Agriculture* 29(1):1-29. 1945.
- 7.- ———— Coffee diseases. *In* Puerto Rico (Rio Piedras). Agricultural Experiment Station. Annual Report for the fiscal year 1939-1940. 1941 ? pp. 39-41.
- 8.- BIANCHINI P., C. L. Enfermedades del café en Costa Rica. San José, C. R., Ministerio de Agricultura y Ganadería. *Boletín Técnico* no. 33. 1961. 42 p.
- 9.- CASTAÑO, J. J. Algunas observaciones sobre la "llaga negra" radicular del cafeto. *Agricultura Tropical (Colombia)* 9(2):41-47. 1953.
- 10.- CHARDON, C. E. & TORO, R. A. Mycological explorations of Colombia. Puerto Rico. University *Journal of Agriculture* 14(4):272. 1930.
- 11.- DRUMMOND-GONCALVES, R. Podridao das raizes. *O. Biologico* 16(1):17-18. 1950.
- 12.- DUQUE, J. P. La podredumbre negra de la raíz del cafeto; estudio preliminar. *El Café de El Salvador* 21(230):31-37, (231):103-115. 1951.

- 13.- FAWCETT, H. S. Citrus diseases and their control. 2a. ed. rev. & enl. New York, McGraw-Hill, 1936. 656 p.
- 14.- GARRETT, S. D. Inoculum potencial. In Horsfall, J. G. & Dimond, A. E., eds. Plant Pathology; an advanced treatise. New York, Academic Press, 1960. pp. 23-56. (Vol. - 3 the diseased population epidemics and control.)
- 15.- ————— Rhizomorph behaviour in *Armillaria mellea* (Vahl) Quél. II. Logistics of infection. *Annals of Botany* 20(78):193-209. 1956.
- 16.- ————— Biology of root-infecting fungi. Cambridge, University Press, 1956. 292 p.
- 17.- RODRIGUEZ, R. A. "Torbo", a tropical disease of potatoes. *Plant Disease Reporter* 42(8):972-980. 1958.
- 18.- SACCAS, A. M. Les *Rosellinia* des caféiers on Oubangui-Chari. *Agronomie Tropicale* 11(5):551-595, (6):687-706. 1956.
- 19.- THOMAS, H. E. , WILHELM, S. & MacLEAN, N. A. Two root rots of fruit trees. In U. S. Department of Agriculture. Plant diseases, the yearbook of agriculture, 1953. Washington D. C., Government Printing Office, 1953. pp. 702-705.
- 20.- VIEGAS, A. P. Podridao do colo do cafeeiro. *Revista do Café Portugues* 1(1):13-26, (2):9-15, (3):5-12. 1954.
- 21.- WATERSTON, J. M. Observations on the parasitism of *Rosellinia pepo* Pat. *Tropical Agriculture (Trinidad)* 18 (9):174-184. 1941.
- 22.- WELLMAN, F. L. Consideraciones sobre los problemas más urgentes en enfermedades del café. *Revista Cafetalera (Guatemala)* 2(12):11-16. 1962.
- 23.- ————— The *Fusarium* phase of the root-disease complex in coffee. (Abstract) *Phytopathology* 44(9):509. 1954.
- 24.- ————— Reporte acerca del adelanto de los estudios sobre las podredumbres radiculares del cafeto en El Salvador. *El Café de El Salvador* 16(178):105-117. 1946.