

ESTUDIO BIOLÓGICO DE *Corticium salmonicolor* Berk y Br, AGENTE CAUSAL DEL MAL ROSADO DEL CAFETO 1/

Carlos Julio Ramírez-Hernández*
Gabriel Cadena-Gómez**

RESUMEN

En Cenicafé, bajo condiciones de campo y laboratorio, se realizaron estudios biológicos sobre *Corticium salmonicolor*, agente causal del mal rosado del café. El crecimiento y formación de estructuras del hongo fueron medidos en cinco medios de cultivo, bajo condiciones de luz controlada diariamente (3, 6 y 9 horas) y 22 °C de temperatura en una cámara marca Percival PGW-132. El mejor crecimiento del hongo y la mayor formación de esclerocios se encontró en el medio a base de malta agar y está influenciado por periodos diarios de tres horas de luz. Bajo las mismas condiciones se observó crecimiento rítmico zonado. Frutos de café con síntomas de la enfermedad fueron seccionados (micrótopo Kryomat modelo 1210) en cortes finos (20 micras). Las observaciones a través del microscopio permitieron conocer el papel de los esclerocios en el proceso infeccioso. Bajo condiciones de campo, se desarrolló un método eficiente de inoculación en frutos de café. La metodología es independiente de las condiciones climáticas externas.

SUMMARY

RAMIREZ H., C. J. and CADENA G., G. Biological studies on *Corticium salmonicolor* Berk y Br. causal agent of the coffee pink disease. Cenicafé (Colombia) 33(2):40-52. 1982.

At Cenicafé, under laboratory and field conditions, biological studies were conducted on *Corticium salmonicolor*, the causal agent of coffee pink disease. Fungal growth and structure formation were measured on five culture media under controlled daily light conditions (3, 6 and 9 hours) and 22°C in a growth chamber Percival PGW-132. The best fungal growth and sclerotia formation was found on malt agar. The number of sclerotia was influenced by 3 hours daily light period. Also a typical zonation rhythm favored by the same light condition was observed. Coffee fruits with symptoms of pink disease were sectioned (Kryomat model 1210) in fine cross sections (20 μ), under the microscope, they showed the sclerotial role in the infection process. Under field conditions, an efficient inoculation method of coffee fruits was developed. This methodology is independent of the external environmental conditions.

Additional Key Words: Fungus physiology. Inoculation methodology. Histopathology. Culture media. Light effect.

1/ Adaptación de la tesis de grado presentada por el autor principal para optar al título de Ingeniero Agrónomo de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Caldas, Manizales.

* Asistente de la Sección de Fitopatología del Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé, Chinchiná, Caldas, Colombia.

** Jefe de la Sección de Fitopatología del Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé, Chinchiná, Caldas Colombia.

INTRODUCCION

El mal rosado del cafeto, causado por el hongo *Corticium salmonicolor* Berk y Br, es una enfermedad de importancia económica, debido especialmente, a los daños causados en las plantaciones tecnificadas, las cuales representan el 22^o/100 del área cafetera y contribuyen con el 60^o/100 de la producción nacional.

El primer registro del mal rosado en los cafetales colombianos data de 1933 (1). En 1953, se presentó en la zona cafetera del Quindío causando daños severos. En el departamento de Caldas, también se ha presentado en forma más o menos generalizada.

Los cafetos enfermos resaltan a distancia porque en las partes terminales aparecen ramas con el follaje amarillento y marchito (3, 4). Algunas ramas aparecen con las hojas secas como si hubieran sido quemadas y por eso el nombre vulgar de brasa (1).

La infección se presenta en los verticilos con frutos tiernos y en la parte basal de la rama, donde se presenta un tejido pálido de hifas del hongo, las cuales se extienden por toda la rama y partes basales adyacentes de las demás ramas. El hongo crece en forma envolvente, tomando primero un color blanco, luego rosado y por último un color salmón rojizo. En el verticilo los frutos se amarillan prematuramente; en el fruto atacado se observa un abundante crecimiento de hifas que lo van rodeando en forma de telaraña (1, 4). Posteriormente, aparecen unos puntos blancos conectados entre sí por una fina red de micelio. Dichos puntos son una aglomeración muy compacta de hifas que pueden actuar como motas infecciosas. En el fondo de cada mota infecciosa se inicia la destrucción del tejido de la pulpa que luego se necrosa; varias de estas áreas necróticas se unen y forman una depresión con bordes redondeados. El fruto se torna de color café oscuro a negro, se momifica y finalmente se cae (4).

Rodríguez (4), encontró que *C. salmonicolor* crece mejor en PDA que en medios como agar zanahoria, agar nutriente y agar café. Ferreira (2), estableció que PDA es un medio moderado para el crecimiento del hongo y afirma que crece rápidamente en medio de harina de maíz agar. También uso otros medios como arroz, zanahoria y papa, en los cuales obtuvo poco crecimiento del hongo. Concluye que *C. salmonicolor* crece mejor y abundantemente en cáscara esterilizada de *Hevea* sp.

Rodríguez (4) en Costa Rica, logró infección en plantas de cafeto bajo condiciones de campo durante períodos lluviosos. Para tal fin colocó en el interior de un verticilo con frutos, unas porciones de cultivo del hongo. En condiciones de laboratorio no logró reproducir los síntomas de la enfermedad.

Ferreira (2) y Sujan (5) han hecho inoculaciones en eucalipto, reproduciendo los síntomas típicos de la enfermedad.

El presente estudio se realizó en Cenicafé con los siguientes objetivos:

Conocer el desarrollo de *Corticium salmonicolor* Berk y Br, en diferentes medios de cultivo; determinar el efecto de tres períodos diarios de luz sobre el desarrollo del hongo; seleccionar un sistema de inoculación artificial en condiciones de campo, y estudiar el proceso infectivo del hongo en frutos verdes de café.

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento del hongo.

Se recolectaron ramas de cafeto con síntomas y signos de la enfermedad, se cortaron en pequeños trozos, se lavaron con agua destilada estéril y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5^o/o. Para el aislamiento del hongo se utilizaron dos fuentes de inóculo: micelio del hongo en estado de telaraña y porciones del hongo en estado de costra rosada, los cuales se sembraron en cajas de petri con PDA y agar jugo V-8 previamente acidificados.

Prueba y selección de medio de cultivo.

Con el fin de seleccionar el mejor medio de cultivo para el desarrollo del hongo, se probaron los siguientes medios: malta agar, PDA, zanahoria agar, café agar y jugo V-8 agar. De cada medio se utilizaron por tratamiento siete cajas con 20 ml de medio.

En el centro de cada caja con el medio, se sembró una proporción igual de crecimiento micelial de *C. salmonicolor* de siete días de edad, cultivado en PDA. Para la obtención del inóculo se utilizó un sacabocado de 7 mm de diámetro.

Efecto de la luz.

Para cuantificar el efecto de períodos diarios de luz (3, 6, 9 horas), sobre el crecimiento del hongo, se utilizó una cámara de crecimiento, marca Percival, modelo PGW-132, con control de temperatura, luz y humedad relativa. La cámara se calibró a 22 °C de temperatura constante.

Para el suministro de luz, se contó con un juego de 14 lámparas fluorescentes de 215 vatios y 12 lámparas de luz incandescente de 100 vatios. La bandeja interior sobre la cual se dispusieron las cajas de petri sembradas con el hongo, estaba localizada a un metro de distancia de las lámparas.

Se empleó un diseño de bloques al azar, con un arreglo factorial para cinco medios de cultivo y tres periodos de luz (3, 6, 9 horas diarias de luz), con siete replicaciones.

Pruebas de patogenicidad.

Para probar la patogenicidad de *C. salmonicolor* se inocularon 16 cafetos en el campo y cuatro en el laboratorio. Se utilizaron ramas de la parte media, seleccionando verticilos con frutos de cinco meses de formados y ramas lignificadas con y sin herida previa.

Se utilizaron dos métodos de inoculación: por aspersión y localizada. La inoculación localizada se hizo con una porción de crecimiento micelial obtenido en medio de cultivo a base de PDA, utilizando un sacabocado de 7 mm de diámetro. La inoculación por aspersión se realizó con una suspensión de crecimiento micelial en PDA, licuado en agua de lluvia estéril y aplicada con un aspersor manual Debilbis N° 127. La cantidad utilizada fue una caja de petri con PDA y 25 ml de agua.

Después de realizada la inoculación, se envolvió con algodón humedecido con agua destilada estéril y se protegió con un plástico transparente para evitar pérdida de humedad, amarrando sus extremos (Figura 1). Quince días después se iniciaron las observaciones con base en la siguiente escala de calificación:

- 0 = No infección.
- 1 = Estado de telaraña.
- 2 = Motillas infecciosas.
- 3 = Lesiones necróticas.
- 4 = Costra rosada.

Cortes histopatológicos.

El hongo *C. salmonicolor* afecta especialmente cafetos en producción. Para observar su proceso infectivo se hicieron cortes de frutos infectados naturalmente y no infectados, los cuales se clasificaron de acuerdo al grado de ataque, así:



FIGURA 1.- Método de inoculación de *Corticium salmonicolor* en cafetos en producción bajo condiciones de campo.

- 0 = fruto no infectado
- 1 = fruto infectado, con presencia de micelio
- 2 = fruto enfermo con presencia de esclerocios
- 3 = fruto enfermo con inicio de necrosamiento
- 4 = fruto necrosado totalmente

Para los cortes histopatológicos se utilizó un micrótopo de congelación, marca Kryomat, modelo 1210, regulado a -15°C y se hicieron cortes de 20 micras de la epidermis del fruto, en los diferentes grados de ataque, los cuales se tiñeron con lactofenol azul de algodón al 20/0 y se observaron a través del microscopio.

RESULTADOS

En la Tabla 1, se presenta el diámetro de las colonias de *C. salmonicolor* en los diferentes medios de cultivo probados. De acuerdo con el análisis estadístico, durante los primeros

TABLA 1.- CRECIMIENTO DE *Corticium salmonicolor* EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO EN CAJAS DE PETRI EN CAMARA DE CRECIMIENTO. PROMEDIO DE LECTURA PARA SEIS CAJAS. 1".

Medios	Lecturas					
	1	2	3	4	5	6
	Diámetro de la colonia en milímetros					
Agar café	17,722 a	32,611 a	46,222 b	58,444 c	71,661 c	80,888 c
P.D.A.	16,000 b	32,055 a	47,333 b	60,777 bc	76,166 b	83,555 b
Extracto de malta	16,055 b	32,722 a	48,333 ab	64,888 a	80,055 a	86,666 a
Agar zanahoria	17,000 ab	33,833 a	49,388 ab	63,055 ab	75,333 b	81,500 c
V-8 jugo agar	16,777 ab	33,666 a	49,500 a	63,666 ab	77,944 ab	86,666 a
Tukey 0,05	1,465	1,878	2,814	4,005	2,982	1,616
Tukey 0,01	1,774	2,275	3,408	4,850	3,612	1,957

1" = Los promedios seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente entre sí, por la prueba de Tukey al 1%.

seis días no hubo diferencias de crecimiento del hongo en los medios. Sólo se presentaron diferencias en crecimiento, a partir del séptimo día.

Ferreira (2) encontró que en PDA se obtiene un crecimiento moderado y Rodríguez (4) afirma que es un medio apropiado. Estos autores también anotan que en agar zanahoria y agar café se obtiene poco crecimiento, lo cual fue confirmado en el presente trabajo.

La Tabla 2 presenta los datos correspondientes al crecimiento alcanzado por las colonias de *C. salmonicolor* expuestas a tres períodos diarios de luz. A medida que se aumenta el número de horas diarias de luz aumenta el crecimiento del hongo (Figura 2), presentándose una significancia de tendencia cuadrática.

El efecto de interacción entre medios de cultivo y el número de horas diarias de exposición a la luz, en cuanto a crecimiento del hongo, se obtuvo a mayor horas de luz diarias en los medios a base de agar zanahoria, PDA y agar café.

En los diferentes medios de cultivo, exceptuando agar jugo V-8, después de cinco o seis días de crecimiento del hongo, se presentaron pequeñas aglomeraciones de hifas (esclerocios), que dan la apariencia de motas, parecidas a las que se forman sobre los frutos cuando son afectados por el hongo. La formación de esclerocios en los medios de cultivo no había sido registrada anteriormente en la literatura. El fenómeno se presentó a nivel de laboratorio, en condiciones de medio ambiente y de cámara de crecimiento.

TABLA 2.- DIAMETRO PROMEDIO DE LAS COLONIAS DE *Corticium salmonicolor* SOMETIDAS A TRES PERIODOS DIARIOS DE LUZ.

Horas de luz diarias	Diámetro de la colonia en milímetros*					
	Lecturas					
	1	2	3	4	5	6
3	18,80	30,97	44,97	59,40	74,24	82,50
6	18,87	31,50	47,97	60,50	76,27	83,14
9	12,47	36,47	52,24	66,50	78,20	85,94

* Promedio de 30 cajas.

En los medios se encontraron diferencias significativas entre el tamaño acumulado de los esclerocios en extracto de malta y en agar café.

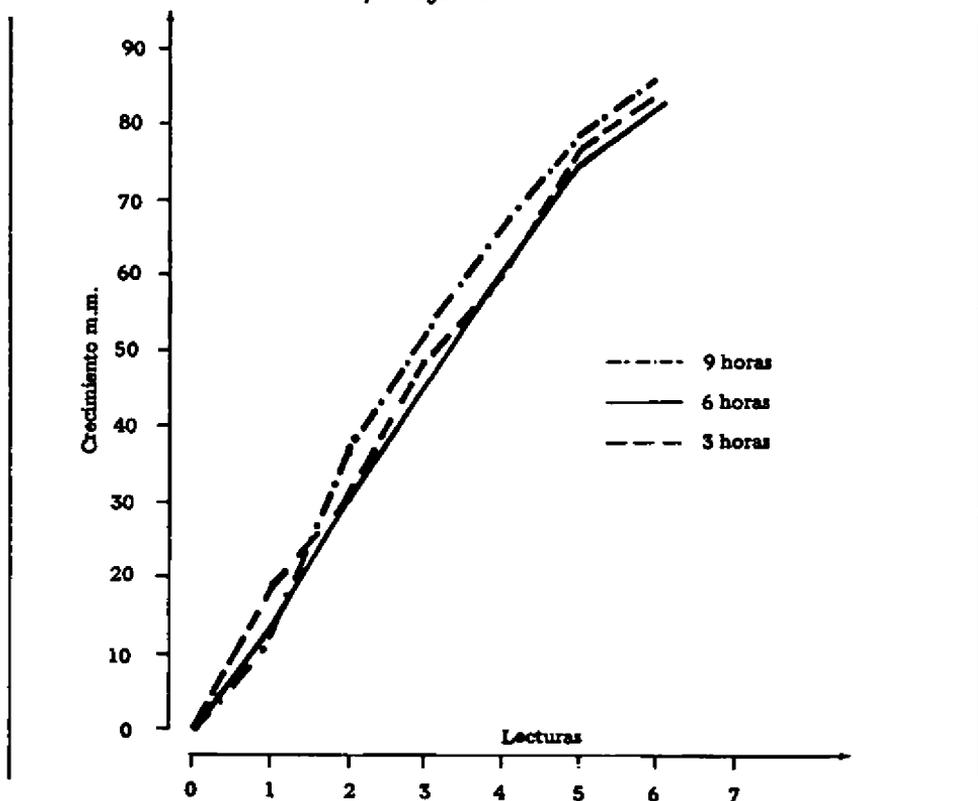


FIGURA 2.- Crecimiento de *Corticium salmonicolor* en el promedio de todos los medios de cultivo y períodos diarios de exposición a la luz.

En la Tabla 3 se presentan los datos correspondientes al tamaño promedio acumulado de los esclerocios formados en los diferentes medios y su relación con el número de horas diarias de luz a que estuvieron expuestas las colonias del hongo. De acuerdo con estos datos se observó que el número promedio y el tamaño promedio acumulado de los esclerocios fue menor cuando la colonia estuvo expuesta a nueve horas de luz diarias.

TABLA 3.- TAMAÑO PROMEDIO ACUMULADO DE LOS ESCLEROCIOS DEL HONGO *Corticium salmonicolor* EN TRES PERIODOS DE LUZ.

Horas de luz diarias	Tamaño promedio acumulado de los esclerocios (mm)
3	63,47
6	54,90
9	32,00

En la Figura 3, se presenta el número de esclerocios formados en cada uno de los medios de cultivo probados y su relación con los períodos diarios de luz. En los medios de agar zanahoria y extracto de malta se vio favorecida la formación de esclerocios por la disminución del tiempo de exposición a la luz, siendo mayor el número de esclerocios cuando el período fue solo de tres horas. En el medio de PDA el mayor número de esclerocios se formó cuando el hongo estuvo expuesto a la luz durante seis horas y no se presentó variación, en los otros dos períodos de luz. En el medio agar café, no se formaron esclerocios con períodos de nueve horas diarias de luz, pero si con tres y seis horas diarias de luz, entre los cuales no se presentaron diferencias.

Bajo las condiciones del experimento en el fitotrón, se observó la ocurrencia de crecimiento zonado del hongo, en los distintos medios de cultivo probados.

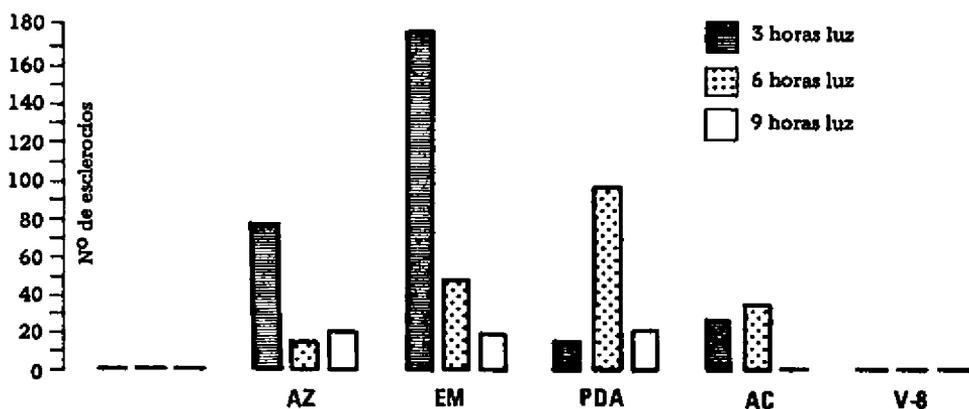


FIGURA 3.- Número promedio de esclerocios formados por caja en los diferentes períodos diarios de exposición a la luz.

En el laboratorio la zonación fue menor. El mayor número de zonas de crecimiento se presentó en agar zanahoria. En relación con las horas de exposición a la luz, se observó que independiente del medio empleado, siempre fue mayor el número de zonas de crecimiento en los tratamientos expuestos a menor número de horas de luz (Tabla 4). Las zonaciones corresponden a agrupaciones de micelio producidas por estímulos físicos.

Los estudios histopatológicos realizados, permitieron conocer el proceso infectivo del hongo *C. salmonicolor* a partir de la formación de esclerocios sobre frutos verdes de café con cinco meses de formados.

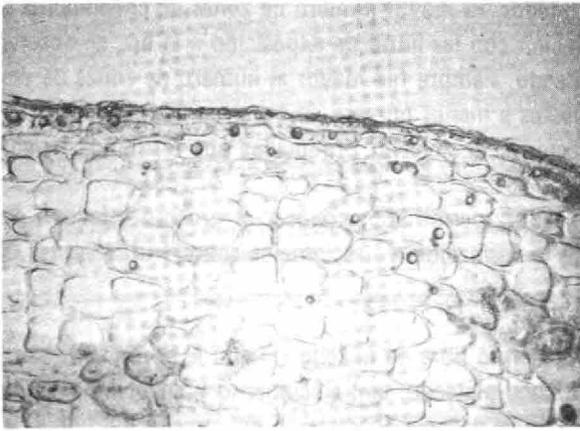
En el estado 0, presenta capas de epicarpio libre de micelio (Figura 4.1). En el estado 1 hay presencia de micelio de color blanco plateado, con crecimiento y envolvimiento del fruto por parte de *C. salmonicolor*. No se observa penetración del micelio del hongo en los tejidos interiores del fruto (Figura 4.2). En el estado 2, las hifas del hongo empiezan a entrelazarse y agruparse para iniciar formación de esclerocios. Las primeras capas del tejido epidérmico aparecen incipientemente colonizadas (Figura 4.3). En el estado 3, los esclerocios toman su forma característica y a partir de ellos, el micelio del hongo penetra en el mesocarpio del fruto. Hay células necrosadas por acción del hongo (Figura 4.4). En el estado 4, las células del epicarpio han perdido su contenido celular, presentándose un desarreglo celular y su necrosamiento. Corresponde al estado final del ataque del hongo en los frutos de café (Figura 4.5).

De acuerdo con las observaciones histopatológicas en los frutos de café, se puede deducir que la formación de esclerocios es un estado previo a la verdadera colonización de los frutos por parte del hongo *C. salmonicolor*.

En la prueba de patogenicidad de *C. salmonicolor* con los diferentes métodos aplicados se obtuvo infección en un 82^o/_o de las inoculaciones localizadas en verticilos con frutos en

TABLA 4.- NUMERO PROMEDIO DE ZONACIONES DE *Corticium salmonicolor* EN LOS DISTINTOS MEDIOS PROBADOS EN CAMARA DE CRECIMIENTO DURANTE NUEVE DIAS.

Horas de luz diarias	Medios				
	A.C.	A.Z.	P.D.A.	E.M.	V-8
	Número de zonaciones				
9	5	4,6	4,3	5	4,1
6	5	4,8	4,6	4,3	3,0
3	6,5	7,5	6,8	4,6	6,5



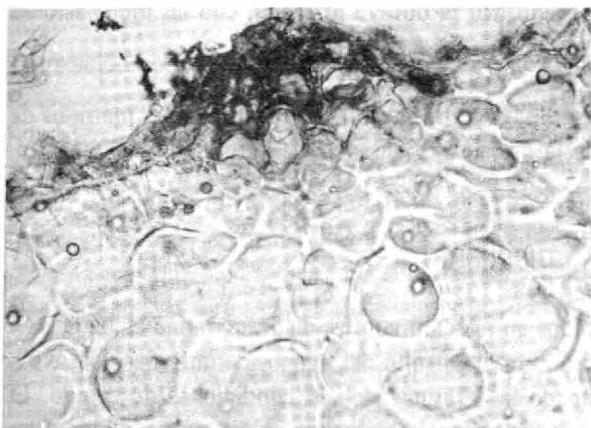
4.1- Epicarpio de un fruto sano.



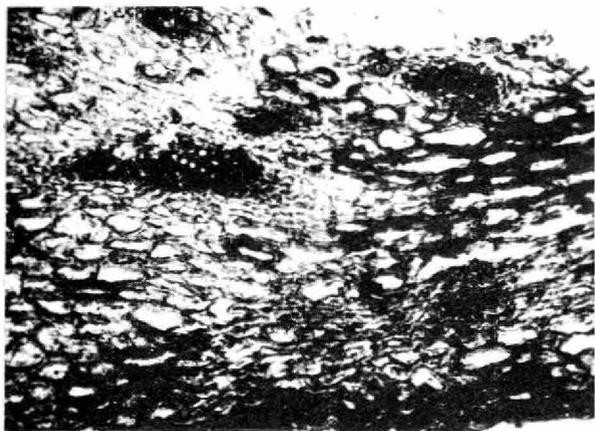
4.2- Presencia de micelio sobre la epidermis del fruto.



4.3- Entrelazamiento y agrupación de hifas. 200x.



4.4- Esclerocio totalmente formado sobre la superficie del fruto y colonización del tejido.



4.5- Estado final del ataque de *C. salmonicolor*. Nótese las células necrosadas y el desarreglo celular.

FIGURA 4.- Proceso infeccioso de *C. salmonicolor* sobre frutos de café .

condiciones artificiales de humedad y oscuridad. En ellas se obtuvo crecimiento micelial, esclerocios y necrosamiento del fruto. Por el método de aspersión, se obtuvieron infecciones en un 18,90/0 del total de las inoculaciones. Únicamente se observó crecimiento micelial, el cual se detuvo unos días después, debido a condiciones climáticas adversas. El éxito del avance de la enfermedad se debe especialmente a las condiciones ambientales favorables para el desarrollo del patógeno. No se obtuvo infección con las inoculaciones realizadas en ramas lignificadas.

Se comprobó que el establecimiento del hongo es posible, con los distintos métodos de inoculación, independientemente de la presencia o ausencia de heridas en el susceptible.

DISCUSION

El conjunto de los resultados obtenidos en relación con las distintas variables tenidas en cuenta respecto al efecto de la luz sobre el desarrollo del hongo, permite dar una explicación biológica al comportamiento de la enfermedad bajo condiciones de campo. El Mal Rosado es prevalente en cafetales densamente sembrados en los cuales debido a las distancias cortas entre plantas y al vigor de las mismas, se presenta una condición de escasa luminosidad o penumbra. Igualmente los signos típicos de la enfermedad se presentan principalmente en la parte inferior de las ramas productivas. Esto está indicando que el establecimiento de *C. salmonicolor* se ve favorecido no solo por las condiciones de alta humedad sino además por condiciones de baja intensidad lumínica o menor número de horas de luz diaria. Esto se comprobó en los estudios del hongo "in vitro" en los cuales aunque el crecimiento vegetativo fue estimulado por un mayor número de horas de luz diarias, por el contrario la formación de esclerocios, que como se comprobó en los estudios histopatológicos son las estructuras infectivas, fue favorecida bajo condiciones de menor número diario de horas de luz. Igualmente, el número de zonas fue mayor cuando el hongo estuvo expuesto a un régimen lumínico menor. Las zonaciones, que corresponden a agrupaciones rítmicas de micelio como consecuencia de estímulos físicos externos, son especialmente sensibles al efecto del estímulo lumínico y están indicando la forma como el hongo, a través de este estímulo, es favorecido tanto para colonizar externamente los tejidos como para iniciar su proceso infectivo.

En relación con la metodología de inoculación probada como efectiva para el establecimiento de la enfermedad, se comprobó, en forma indirecta, la dependencia del hongo de una condición óptima de disponibilidad de humedad como limitante principal para su sobrevivencia bajo condiciones de campo y desde luego para iniciar sus relaciones parasíticas con el hospedante. Cuando la inoculación se realizó por aspersión, el hongo inició su colonización pero una vez las condiciones de clima fueron adversas (falta de humedad) el hongo no sobrevivió más allá del crecimiento micelial (estado de "telaraña"). En cambio,

cuando se realizó por el método localizado y las condiciones de clima fueron favorables (alta humedad, período lluvioso), el hongo se estableció y llegó hasta la formación de esclerocios y posterior necrosamiento de los frutos. Esto explica en parte por qué razón las epidemias del Mal Rosado se manifiestan principalmente durante las épocas de lluvia en la zona cafetera y la razón por la cual en años con períodos lluviosos más prolongados o más intensos que lo normal, la severidad del ataque del Mal Rosado es mayor.

En relación con los estudios histopatológicos, se comprobó que estas estructuras que corresponden a agrupaciones miceliales más o menos compactas, entrelazadas por medio de hifas, juegan un papel muy importante en el proceso infectivo del hongo. De acuerdo con lo observado en los cortes finos de los frutos de café en las distintas etapas, el hongo necesita para iniciar la colonización de los tejidos del pericarpio, de la previa formación de los esclerocios. A partir de ellos se inicia el necrosamiento de los tejidos subyacentes como consecuencia bien sea de la acción física o bioquímica del organismo que parece concentrarse en esas agrupaciones miceliales.

El conocimiento de este proceso infectivo permite diseñar una estrategia de manejo de la enfermedad, basada en la observación de los signos de la enfermedad, de tal manera que las aspersiones de productos fungicidas se realicen cuando el hongo todavía no haya formado esclerocios o sea previamente a la colonización de los tejidos.

Los resultados obtenidos en esta investigación no solo proporcionan un mejor conocimiento acerca de la biología de *Corticium salmonicolor* y su relación parasítica con el café, sino que permiten continuar las investigaciones sobre esta importante enfermedad enfocadas hacia la búsqueda de soluciones prácticas que faciliten su manejo bajo condiciones de campo, mediante estudios epidemiológicos, control cultural, químico y prueba de germoplasma en búsqueda de fuentes de resistencia genética.

BIBLIOGRAFÍA

1. CASTAÑO A., J. J. y BERNAL E., G. Un método práctico para combatir el "Mal Rosado" del café. *Revista Cafetera de Colombia* 11(125):4010-4012. 1953.
2. FERREIRA, F. A. e ALFENAS, A. C. A enfermidade rosado do eucalipto causada por *Corticium salmonicolor* Berk & Br. no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 2(2):109-115. 1977.
3. PRINCIPALES enfermedades de los cafetos y manera de prevenirlas y combatirlas. *El café de El Salvador* 22(252-253):727-736. 1952.
4. RODRIGUEZ M., R. A. Estudios sobre la enfermedad rosada del café. San José, C. R., Ministerio de Agricultura y Ganadería, 1964. 35 p. (Boletín Técnico no. 46).
5. SUJAN SINGH, S. K. et al. Pink disease of eucalyptus in India. *Eur. J. Fer. Path.* (Alemania) 8:200-216. 1978.