

monospórico identificado como 1-D; 2) Suspensión concentrada de esporas del cultivo monospórico 2-E; 3) Suspensión concentrada de esporas del cultivo monospórico 2-F; 4) Suspensión concentrada de esporas del cultivo monospórico hecho a partir del aislamiento de lesiones en el hipocótilo e identificado como No.10, y 5) Agua destilada estéril (Testigo).

Reaislamientos. De las plantas inoculadas que presentaron los síntomas característicos, se procedió a hacer, por el método corriente ya descrito, el reaislamiento de organismos para compararlos con los aislamientos originales.

Reinoculaciones. Para probar la patogenicidad de los reaislamientos se inocularon grupos de plantas siguiendo el método ya explicado. Nuevamente se procedió a hacer reaislamientos a partir de los síntomas producidos.

Identificación del organismo patógeno.

Un total de 38 cultivos monospóricos fueron enviados para su identificación en Wageningen, Holanda, Dept. of Phytopathology State Agricultural University, como parte del proyecto sobre especies patogénicas y saprofíticas de Colletotrichum presentes en Coffea arabica L. en América del Sur y América del Centro que

adelanta el doctor Van Der Vossen (15), en la Estación de Investigaciones de Café de Ruiru, Kenya, en colaboración con Colombia y otros países.

Patogénesis.

Para observar los aspectos de prepenetración, penetración, establecimiento y desarrollo de la infección, se hicieron preparaciones permanentes y semipermanentes de cortes de hojas tomadas a partir de las 48 horas de la inoculación. En general se siguieron los métodos descritos por McClung (9) Sass (11) y por Lu-
na (8) en cuanto a microtecnica se refiere.

Proceso de prepenetración. Para estudiar la formación de estructuras del hongo sobre el susceptible, se hicieron en hojas de afeto inoculadas con el cultivo 2-E, observaciones inicialmente cada 2 horas hasta las 6 horas y luego cada 4 horas hasta las 72 horas después de la inoculación.

Las observaciones incluyeron el estudio bajo el microscopio de las gotas de la suspensión tomadas del susceptible inoculado, de porciones de la cutícula de la epidermis inferior y de impresiones de la misma epidermis tomadas con metacrilato, así: con la ayuda de un pincel se extiende sobre la epidermis una fina capa de

metacrilato y se deja secar por espacio de una hora. Se remueve entonces la película formada con esa sustancia y se observa directamente al microscopio compuesto.

Histopatología. Con el fin de hacer observaciones de la anatomía de la hoja, de los cloroplastos, del contenido celular, del desarrollo y crecimiento del patógeno en los tejidos de este órgano, se hicieron cortes transversales y longitudinales en hojas de plantas que mostraban síntomas apenas iniciales y en otras con ataque avanzado.

Los tejidos se mantuvieron para su fijación en una solución fijadora FAA, muy utilizada para propósitos anatómicos y morfológicos, preparada así: Alcohol etílico del 95%, 50 ml; ácido acético glacial, 5 ml; formaldehído del 37 - 40%, 10 ml; agua 35 ml.

El proceso de deshidratación se hizo siguiendo la serie de alcoholes etílico y butílico terciario que se señala en el Cuadro 2.

La infiltración se hizo a través de tres cambios de parafina, de dos horas cada uno, a 60°C, en un "dispensador de parafina" Lipshaw (Vacuum infiltrator and paraffin dispenser), modelo 224.

Para imbibición se colocaron los trozos de tejido en pequeñas

TABLA 2. Serie de alcoholes utilizada en el proceso de deshidratación de tejidos de hoja.

| Serie | TBA* | Etanol 95% | Agua | Tiempo |
|-------|-------|------------|-------|--------|
| 50 | 10 ml | 40 ml | 50 ml | 1 hora |
| 70 | 20 | 50 | 30 | 1 |
| 85 | 35 | 50 | 15 | 1 |
| 95 | 55 | 40 | - | 1 |
| 100 | 75 | 25 | - | 2 |
| TBA | 100 | - | - | 2 |

* Alcohol butílico terciario.

cajas de papel que contenían parafina derretida (punto de fusión 57 - 58°C), suministrada por el dispensador. Las piezas se orientaron convenientemente dentro de los cubos los cuales se dejaron endurecer suficientemente para proceder luego a seccionarlos.

Los cortes, de 5 micras de espesor, fueron hechos en un micrótopo rotativo Spencer, modelo 820 y pasaron inmediatamente a un recipiente con agua a 60°C. Las secciones se sacaron de allí con la ayuda de portaobjetos a los cuales debían quedar adheridas. Con este fin, a los portaobjetos se les agregó albúmina preparada tal como lo indica Luna (8).

Después de montadas las cintas o secciones en las placas, éstas se colocaron en una gradilla y pasaron a una estufa Napco graduada a 60°C para su deparafinización y se empezó entonces con las series de xiloles como preparación para la tinción.

Con el fin de estudiar los desórdenes que podrían ocurrir en la anatomía de la hoja y para tratar de detectar en esos mismos tejidos estructuras de un posible patógeno, se usaron dos tipos de tinciones: Hematoxilina-Eosina y Safranina-verde rápido (fast-green). El procedimiento empleado para tinción correspon-

de al indicado por Luna (8), con algunas modificaciones. Un esquema del mismo y la descripción correspondiente se presenta en el Apendice.

Después de colorear las placas por medio de las dos técnicas expuestas anteriormente, se estudiaron bajo un microscopio compuesto y se tomaron fotomicrografías de los aspectos más interesantes observados.

Reacción de cinco variedades comerciales de café al agente causal de la enfermedad.

Para este fin se emplearon las variedades Catuay, amarillo Chinchiná, Mundo Novo, Caturra y Typica como testigo susceptible. Las plantas de esta última variedad eran provenientes de semillas de árboles afectados por la enfermedad.

Por cada variedad se inocularon por aspersion al follaje ocho plantas, así: cuatro con el cultivo monospórico 2-E y las cuatro restantes con el 2-F.

Transmisión por semilla.

Se colocaron 250 semillas obtenidas de árboles infectados naturalmente, en suelo estéril en un invernáculo de la Escuela

de Graduados en Tibaitatá y se observaron cuidadosamente cuando germinaron. Después la prueba se repitió en dos oportunidades, con mayor número de semillas, bajo las condiciones de Cenicafé.

4. RESULTADOS

Aislamiento del agente causal.

De las hojas y frutos afectados se aislaron los géneros Colletotrichum y Pestalotia. De las lesiones del hicotilo se obtuvo además de los anteriores el género Fusarium.

De cada uno de estos géneros se obtuvo el siguiente número de cultivos monospóricos: 38 de Colletotrichum spp., 4 de Fusarium spp. y 2 de Pestalotia spp.

Prueba de patogenicidad.

Hojas.- Los síntomas empezaron a aparecer entre los 14 y 16 días después de la inoculación y sólo en las hojas más jóvenes de la planta en el momento de la inoculación. Únicamente los cultivos identificados como 1-D, 2-E y 2-F, correspondientes al género Colletotrichum, lograron inducir la aparición de síntomas.

Cabe anotar que una de las plantas inoculadas con el cultivo 1-D mostró una sintomatología especial al momento de retirar la cámara húmeda había en las hojas puntos necróticos que fueron creciendo y aumentando en número rápidamente; a los 8

días podían verse los síntomas de mancha mantecosa alrededor de estos puntos, pero con diámetros hasta de 8 y 10 mm, coalescentes, que terminaron causando una verdadera "quemazón" y ocasionaron la caída de las hojas afectadas. Esta quemazón alcanzó la parte superior del tallo destruyendo gran parte del mismo. Aunque más tarde emitió algunos brotes, éstos también fueron afectados hasta el punto de causar la muerte de la planta. Las plantas del tratamiento testigo permanecieron sanas.

En todos los casos se logró reaislar el patógeno a partir de las lesiones producidas y se hicieron nuevas reinoculaciones y reaislamientos. Cada vez el patógeno recuperado se comparó con el aislamiento original encontrándose igual al mismo.

El reaislamiento correspondiente al cultivo monospórico 1-D, al ser reinoculado mostró los mismos síntomas especiales ya descritos para el aislamiento, aunque con un poco menos de severidad.

Hipocótilo. Las pruebas de patogenicidad dieron resultados positivos para el cultivo monospórico identificado con el No.10, correspondiente al género Colletotrichum y proveniente de aislamientos hechos a partir de lesiones producidas naturalmente. Estos resultados pueden apreciarse en la Tabla 3.

TABLA 3. Pruebas de patogenicidad de 3 géneros de hongos aislados de lesiones del hipocótilo.

| Inóculo | No.de plantas inoculadas | Tratamiento | Resultados |
|---------------------------|--------------------------|-------------------|---------------------------|
| <u>Colletotrichum</u> sp. | 20 | Aspersión | Síntomas desde los 7 días |
| | 8 | Mota de Algodón * | Síntomas a los 15 días |
| | 4 | Mota más herida. | Síntomas a los 3 días |
| <u>Fusarium</u> sp. | 20 | Aspersión | Sin síntomas |
| | 8 | Mota de algodón | Sin síntomas |
| | 4 | Mota más herida | Sin síntomas |
| <u>Pestalotia</u> sp. | 20 | Aspersión | Sin síntomas |
| | 8 | Mota de algodón | Sin síntomas |
| | 4 | Mota más herida | Sin síntomas |
| Coll. + Fus. + Pestal. | 20 | Aspersión | Síntomas a los 15 días |
| | 8 | Mota de algodón | Sin síntomas |
| | 4 | Mota más herida | Síntomas a los 3 días |
| Testigo | 20 | Aspersión | Sin síntomas |
| | 8 | Mota de algodón | Sin síntomas |
| | 4 | Mota más herida | Sin síntomas |

* Se refiere a una mota de algodón impregnada de inóculo y colocada en el hipocótilo.

Los síntomas inducidos, que coinciden con los observados en infecciones naturales consisten en lesiones alargadas, necróticas, húmedas y deprimidas que al ir aumentando de tamaño terminan por rodear completamente el hipocótilo en su parte superior, causando la muerte de la planta, pero con la particularidad de que la parte inferior del mismo queda erecta aún después de muerto. La figura 5 permite ver aspectos generales de esta situación.

Las plantas que recibieron como inóculo Colletotrichum solo o en mezcla, a través de una mota de algodón impregnada de la suspensión y colocada en el hipocótilo previamente herido, mostraron los síntomas cuando se retiraron de la cámara húmeda a los 3 días, con tal severidad que la parte superior de la planta fué incapaz de mantenerse erguida. Las plantas menos atacadas fueron aquellas que recibieron el inóculo a través de la mota de algodón pero sin que el hipocótilo hubiera sido herido. Cuatro plantas del tratamiento por aspersión, mostraron síntomas de mancha mantecosa en las hojas cotiledonales. En todos los casos las plantas de café de la variedad caturra incluídas permanecieron sanas. De la misma manera, el grupo del tratamiento testigo tampoco presentó síntomas de la enfermedad. El estado que presentaba el ex-

perimento a los 30 días de iniciado puede apreciarse en la Tabla No.4

TABLA 4. Infección obtenida a los 30 días mediante la inoculación de plántulas de café con 3 géneros de hongos aislados de lesiones del hipocótilo.

| Inóculo | % de plantas con síntomas * |
|------------------------|-----------------------------|
| <u>Colletotrichum</u> | 78 |
| <u>Fusarium</u> | 0 |
| <u>Pestalotia</u> | 0 |
| Coll. + Fus. + Pestal. | 37 |
| Testigo | 0 |

* % de 32 plantas observadas en cada tratamiento.

Frutos. No fué posible reproducir los síntomas típicos de la enfermedad en los frutos en ninguno de los tratamientos utilizados. Sin embargo, puede anotarse que en el primer tratamiento, donde la cámara húmeda estuvo constituida por un plato plástico, recubierto interiormente de papel absorbente húmedo, la pudrición de los frutos fué más rápida en los granos inoculados que en el testigo.

Inoculación cruzada. Los resultados obtenidos en el ensayo realizado para observar la relación existente entre la mancha mantecosa de la hoja y la lesión del hipocótilo, pueden observarse en la Tabla 5.

TABLA 5. Inoculación cruzada de plántulas de café con tres aislamientos inductores de mancha mantecosa en la hoja y con un aislamiento causante de las lesiones del hipocótilo.

| Inóculo | Plantas con síntomas en | | | Plantas sanas |
|---------------|-------------------------|-------|------------------|---------------|
| | Hipocótilo | Hojas | Hipocót. y hojas | |
| 1-D | 20 | 0 | 4 | 8 |
| 2-E | 12 | 16 | 4 | 0 |
| 2-F | 4 | 2 | 2 | 24 |
| No.10 | 12 | 1 | 6 | 13 |
| Aguas estéril | 0 | 0 | 0 | 32 |

Como puede observarse en el cuadro anterior, los aislamientos 1-D, 2-E y 2-F produjeron síntomas de mancha mantecosa en las hojas y lesiones en el hipocótilo. Así mismo, el cultivo monospóricó No.10, produjo los dos tipos de síntomas.

Es de anotar que las lesiones en el hipocótilo se producen desde los tres días después de la inoculación, mientras que las manchas en la hoja sólo se producen unos 15 días después. Por tanto, y teniendo en cuenta que la primera de las lesiones puede llegar a matar la planta antes de esos 15 días, es posible que muchas plantas hayan muerto antes de la manifestación de síntomas en sus hojas.

En todos los tratamientos el total de plántulas incluidas de café de la variedad caturra permaneció sano. De igual manera el grupo testigo no mostró síntomas de ninguna de las dos lesiones.

Identificación del organismo patógeno.

De 38 cultivos monospóricos del género Colletotrichum enviados a Holanda, cuatro habían inducido la producción de síntomas de mancha mantecosa pero hasta el momento no se ha logrado la identificación de la especie por parte de los científicos del Departamento de Fitopatología del State Agricultural University, en Wageningen.

En PDA, los aislamientos fungosos patogénicos presentan un micelio septado de crecimiento rápido, profuso; producen conidias en conidióforos libres. Sus colonias son de color gris oscuro y

a veces verdosas. Los cultivos más viejos forman escasas masas gelatinosas de conidias rosadas en estromas sin setas. Las conidias tienen en promedio 4.5 x 20 micras y a veces dan la apariencia de ser biceldadas.

Patogénesis

Proceso de prepenetración. La observación al microscopio de gotas de la suspensión tomadas del susceptible inoculado permiten ver que las conidias empiezan a germinar, emitiendo un tubo, entre las dos y las cuatro horas después de la inoculación. En este tiempo el porcentaje de germinación es más bien bajo (20%).

El estudio de porciones de la cutícula de la epidermis inferior solamente mostró algunas conidias emitiendo su tubo germinativo.

El mejor método para observar la formación de estructuras del hongo sobre el susceptible, como proceso de prepenetración fué la impresión de la epidermis inferior de la hoja tomada con metacrilato. Como resultado se observa que entre las dos y las cuatro horas después de la inoculación, las conidias emiten un tubo germinativo que alcanza en este tiempo una longitud hasta 6 veces el largo de las mismas. La germinación detectada

por este método alcanzó hasta el 60% en cuatro horas.

Normalmente las conidias emiten un solo tubo germinativo pero no es raro ver algunas que emiten un tubo germinativo en cada uno de sus extremos. La formación de apresorios ocurre con frecuencia según puede verse en la Figura 2 y no necesariamente éstos se forman en el sitio preciso de penetración que parece ser el estoma. Los tubos se desarrollan sobre la lámina foliar sin ninguna orientación aparente hacia los estomas y sólo los alcanzan por casualidad según se aprecia en la Figura 3.

Impresiones tomadas a las 24 horas de la inoculación dejan ver que el porcentaje de germinación no aumenta considerablemente y que más bien es el tubo germinativo el que continúa alargándose hasta alcanzar longitudes que pueden llegar a representar 20 veces el largo de la conidia, si es que no ha encontrado el punto adecuado para penetrar en el tejido.

Histopatología. Los cortes de la hoja, debidamente coloreados según las técnicas de Safranina - verde rápido y Hematoxilina-Eosina, permitieron observar tejido sano con sus componentes adecuadamente diferenciados, comparándolos con las descripciones que sobre anatomía de la hoja hacen Dedecca (4) y Esau (5). Esto dió por resultado entonces, el reconocimiento de algunas lesiones