

# IDENTIFICACION Y PATOGENICIDAD DE ESPECIES DE ROSELLINIA ASOCIADAS A CAFÉ Y OTRAS ESPECIES FORESTALES EN LA ZONA CENTRAL CAFETERA DE COLOMBIA<sup>1</sup>

## IDENTIFICATION AND PATHOGENICITY OF SPECIES FROM ROSELLINIA ASSOCIATED TO COFFEE AND OTHER FOREST SPECIES IN THE COFFEE CENTRAL ZONE OF COLOMBIA

Darío Alejandro Ortega M.<sup>2</sup>; Bertha Lucia Castro C.<sup>3</sup>; Álvaro L. Gaitán B.<sup>4</sup>

### RESUMEN

Esta investigación se realizó en fincas de los departamentos de Caldas, Risaralda y Quindío, y tuvo como objetivo identificar las especies de Rosellinia asociadas a café, y otras especies forestales, además de evaluar su patogenicidad en chapolas de café. Para esto se inició con la caracterización molecular y posterior caracterización patogénica en chapolas de variedad Caturra sembradas en vasos de icopor de 7 oz., inoculando el patógeno que fue multiplicado en arroz parbolizado, en dosis de 0, 0.6, 0.9, 1.2 y 1.5 gramos/vaso, siendo la unidad experimental la chapola, con 10 repeticiones por dosis, en un diseño completamente aleatorio, evaluando la muerte de plantas durante 35 días después de la inoculación. En café se identificaron 36 focos, con ataque desde 3 hasta 200 plantas, encontrándose además en raíces de cacao (*Theobroma cacao*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), guamo (*Inga edulis*), caucho (*Ficus soatensis*), nim (*Azadirachta indica*), plátano (*Musa paradisiaca*), yuca (*Manihot esculenta*), aguacate (*Persea americana*), guayaba (*Psidium guajava*), guanábana (*Annona muricata*), gmelina (*Gmelina arborea*), árbol de la cruz (*Brownea ariza*) y eucalipto (*Eucalyptus globulus*). Se obtuvieron un total de 115 aislamientos que molecularmente se clasificaron en dos grupos, ***Rosellinia bunodes* (*R. bunodes*)** y ***Rosellinia pepo* (*R. pepo*)**, coincidiendo con la identificación macroscópica de signos sobre las raíces. Con 23 de dichos aislamientos se realizaron pruebas de patogenicidad evaluando

---

<sup>1</sup>Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Agroforestal por parte del primer autor. Universidad de Nariño. Pasto. Colombia.

<sup>2</sup> Estudiante de Pregrado. Programa de Ingeniería Agroforestal. Universidad de Nariño. Pasto. Colombia

<sup>3</sup> Investigador Científico II. Centro Nacional de Investigación del Café, CENICAFE. Chinchiná. Caldas

<sup>4</sup>Investigador Principal. Centro Nacional de Investigación del Café, CENICAFE. Chinchiná. Caldas

la mortalidad hasta el día estipulado. Tres de los aislamientos no causaron mortalidad, nueve causaron más del 50% de mortalidad y con 11 de éstos se obtuvo una mortalidad menor al 50%. Independientemente de cualquier especie fueron determinados los aislamientos de mayor patogenicidad, por lo que se concluyó, que existe un amplio rango de agresividad entre los aislamientos patogénicos de *Rosellinia* evaluados en las chapolas, independientemente de la dosis utilizada y su procedencia, además que la llaga estrellada (*R. pepo*) en las zonas muestreadas tiene un amplio rango de hospedantes en comparación con la llaga negra (*R. bunodes*).

**Palabras claves:** Llagas radicales, patogenicidad, *Rosellinia*, aislamiento, chapola, café.

#### ABSTRACT

This research was made in the departments of Caldas, Risaralda and Quindío, in order to identify the species of *Rosellinia* which were associated to coffee, and other forest species, besides to test its pathogenicity in plants of coffee. For this reason, it was begun a molecular characterization and previously a pathogenic characterization in plants of Caturra variety which was sowed in icopor pods of 7 ounces, inoculating the pathogen that was multiplied in processed rice, in dose of 0, 0.6, 0.9, 1.2 and 1.5 grams/glass, being the experimental unit the plant, with 10 repetitions by dose, in a completely random design, evaluating the death of plants during 35 days after the inoculation. In coffee was identified 36 centers, with attack from 3 to 200 plants, it was also found in roots of cocoa (*Theobroma cacao*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), guamo (*Inga edulis*), rubber (*Ficus soatensis*), nim (*Azadirachta indica*), banana (*Musa paradisiaca*), cassava (*Manihot esculenta*), avocado (*Persea americana*), guava (*Psidium guajava*), soursop (*Annona muricata*), gmelina (*Gmelina arborea*), tree of the cross (*Browgnea ariza*) and eucalyptus(*Eucalyptus globulus*). A total of 115 isolations were gotten that molecularly were classified in two groups, *Rosellinia bunodes* (*R. bunodes*) and *Rosellinia pepo* (*R. pepo*), coinciding with the macroscopic identification of signs on the roots. With 23 of these isolations they were made pathogenicity tests evaluating mortality until the stipulated

day. Three of the isolations did not cause mortality, nine caused more of 50% of mortality and with 11 of these a smaller mortality to 50% was gotten. Independently of any species the isolations of greater pathogenicity were determined, so it was concluded, that it exists an ample range of aggressiveness among the pathogenic isolations of *Rosellinia* evaluated in the plants, independently of the used dose and their origin, Moreover, the sore shatter (*R. pepo*) in the sampled zones has an ample rank of host in comparison with the black sore (*R. bunodes*).

Key words: Radical sores, pathogenicity, *Rosellinia*, isolation, chapola, coffee.

## INTRODUCCION

La importancia del café en la economía Colombiana hoy en día, a pesar de no contar con la importancia relativa de los años 50, 60 y 70, sigue siendo un sector estratégico de la sociedad en términos de tejido social, cultural, institucional, empleo y desarrollo para las regiones productoras. En Colombia la superficie apta para producción de café es de 7.300.000 hectáreas. De acuerdo con el último Censo Cafetero realizado por la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia en 1997, alrededor de 563 municipios son productores de café en todo el país. El promedio por finca es alrededor de 1.5 hectáreas, cifra muy inferior comparada con la del Censo Cafetero de 1981, que mostró una extensión de 4.6 hectáreas por finca. El total de las hectáreas que se encuentran sembradas en café es de 869.157,9; distribuidas así: 260.009 hectáreas en Café Típica, y 609.149,9 en Café Caturra y Variedad Colombia (ASOEXPORT, 2009).

Como cualquier otro cultivo, el café es susceptible a una serie de enfermedades de diversa importancia económica, que afectan la rentabilidad del cultivo cuando no se toman las medidas de control adecuadas para prevenirlas o tratarlas.

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

Duque (1952), reconoció la gravedad de la enfermedad en Colombia así como la persistencia de los ataques, en trabajos de campo realizados entre los años 1931 y 1938 en varios departamentos del país.

En la zona cafetera de Colombia, el incremento de ataques de llagas radicales causadas por el hongo *Rosellinia* spp., tanto en café como en los cultivos asociados, es motivo de interés dentro de los proyectos prioritarios de investigación, especialmente en cuanto a la búsqueda de herramientas que en forma temprana permitan detectar y cuantificar el patógeno en el suelo y aplicar las medidas pertinentes de manejo, o más adelante explorar la posibilidad de tolerancia o resistencia al patógeno en germoplasma de café; la incidencia de esta enfermedad, se ha incrementado en los últimos años hasta un 62% por año (Castro *et al.*, 2003).

Los focos de infección, se extienden debido al contacto de raíces infectadas, con raíces sanas de las plantas, ocasionando la pérdida del área de siembra, ya que existe gran posibilidad de infección, si se plantan nuevamente en estos sitios donde se presenta el hongo (Ibarra *et al.*, 1999).

El patógeno crece de manera ascendente, atacando inicialmente la superficie de la raíz, y luego penetrando en ésta, hasta ocasionar la pudrición de la corteza, y en el leño se manifiesta con la aparición de estrías en forma de rayas y puntos negros para la **Llaga Negra** o en forma de estrella o abanicos, en el caso de **Llaga Estrellada** (Fernández y López, 1964).

El ataque de esta enfermedad, es muy difícil de conocer, debido a que los síntomas externos únicamente se manifiestan, cuando el hongo ya ha invadido la mayor parte de la raíz, hasta haber alcanzado parte del cuello de ésta (López, 1965).

Saccas (1956), según un estudio realizado sobre diferentes especies de *Rosellinia* en Oubangui- Chari como causantes de diferentes enfermedades que atacan a raíces de los cafetos, encontró que estos patógenos pueden invadir los árboles a cualquier edad y los síntomas externos se manifiestan por medio de un amarillamiento del follaje, desecación de las ramas, produciendo finalmente la muerte de la planta, una vez el micelio haya alcanzado el cuello de la raíz.

Por lo tanto este proyecto pretende contribuir al conocimiento de las llagas radicales en café y especies forestales asociadas, causadas por especies del género *Rosellinia*, mejorando metodologías para su posible diagnóstico y prevención a futuro, identificando las especies existentes y evaluando su patogenicidad en chapolas de café.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Localización:**

El material vegetal con *Rosellinia* se recolectó en los departamentos de **Caldas**, municipios Manizales, Chinchina, Aguadas, Risaralda y Palestina; **Risaralda**, municipio de Pereira; y **Quindío**, municipios de Armenia, Quimbaya, Circasia y Buenavista .

La identificación de las especies se hizo en el laboratorio de la Disciplina de Fitopatología en Cenicafé; y las pruebas de patogenicidad en plantas de almácigo, en la Granja de este mismo centro, en Chinchiná – Caldas a una altitud aproximada de 1378 msnm y una temperatura promedio de 21°C.

### **Fase 1. Identificación y Recolección de especies de *Rosellinia*:**

Se seleccionaron aleatoriamente las fincas cafeteras las cuales presentaban focos de llagas radicales ya sea en café o en plantas forestales, según la información suministrada por los comités de cafeteros de los tres Departamentos,

En cada foco de plantas infectadas, se tomaron al azar tres árboles con signos del patógeno; de cada árbol, las cuales se depositaron en bolsas plásticas etiquetadas, designando un código (aislamientos), por departamento, finca, sistema, planta y la posible especie de *Rosellinia*, de acuerdo a estudios previos (Fernández y López, 1964; López, 1965; Castro *et al.*, 2003).

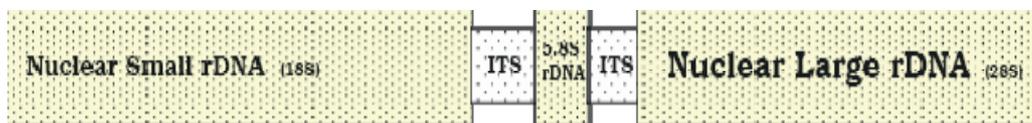
Cada bolsa, fue la primera unidad de muestreo. Luego éstas fueron llevadas al laboratorio de Fitopatología de CENICAFÉ, para cultivar el hongo encontrado en cada uno de ellos artificialmente, utilizando diferentes metodologías las cuales fueron aplicadas en forma integral y unificada de diversos protocolos consultados (López, 1965; Bermúdez y Carranza, 1992; Esquivel *et al.*, 1992; Realpe, 2001; Castro *et al.*, 2003).

Además del procedimiento normal de recolección de muestras, a cada uno de los focos encontrados, se le realizó, un respectivo análisis de suelo, donde se encontró que los rangos de pH estaban entre 4.4 y 5.8; Materia orgánica entre 5.3% y 13.8% y la textura entre Franca, Franco – Arcillosa, y Franco – Arcillosa – Arenosa, lo que demuestra que el hongo se adapta muy bien a cualquier tipo de suelo, independientemente, de las condiciones que éste presente.

Se escogieron aleatoriamente una caja petri con aislamiento puro del hongo, por cada uno de los aislamientos, para realizar la respectiva caracterización molecular de éstos. El micelio se dividió en ocho cuadros de 1 cm, los cuales fueron cultivados en medio líquido Sabouraud, durante 8 días, para luego ser filtrado, obteniendo el micelio del cual se hizo la extracción de ADN genómico, de acuerdo con el protocolo de Lee y Taylor (1990).

Una vez se obtuvo el ADN genómico, se procedió a la amplificación de los fragmentos conservados de los genes ribosomales, para proceder a la identificación taxonómica. El procedimiento de la amplificación, se realizó, partiendo del análisis de secuencias espaciadoras internas (ITS) (Fig. 1) del ADN ribosomal (ADNr), con el fin de confirmar el género y especie de cada aislamiento, realizando estos análisis mediante la amplificación por PCR de estas regiones mediante los protocolos de (Hillis *et al* 1996; López 2004).

**Fig. 1** Región de ADN Ribosomal.



La amplificación de las regiones ITS, se realizó mediante la utilización de los *primers* ITS (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'), los cuales son primers universales para hongos y generan un fragmento de ADNr que incluye las regiones 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 y 28S (Rodríguez, 2007).

La eficiencia de cada reacción de amplificación se monitoreó tomando 10 µL de la PCR (probando diferentes diluciones) de ésta y realizando electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 65 V durante 1 hora y media en Buffer TBE 1X. Los productos amplificados se detectaron por coloración con bromuro de etidio (adición 1µl / gel de una solución 10 mg/ml) y su peso se estimó por comparación, con el marcador de peso molecular ó X174 DNA-Hind III Digest.

Una vez se obtuvo los fragmentos amplificados del ADNr, se enviaron a **Macro Gen Inc.** (Corea) para su secuenciación, con base en lo cual se realizó la identificación de las especies de *Rosellinia*, mediante estos protocolos metodológicos (Efron, 1996; Hillis *et al.*, 1996; Bridge *et al.*, 1998).

Todos los aislamientos puros, fueron crioconservados, para utilizarlos posteriormente en las pruebas de patogenicidad y para otros experimentos (Hoopen *et al.*, 2004). Igualmente, el ADN de cada aislamiento fue adecuadamente almacenado en tubos Eppendorf de 0.6 ml, guardados en nevera a -20°C, llevando previo registro.

Con base en la agrupación de los aislamientos dada por el ADN, se tomó de cada grupo, aquellos aislamientos que representaron la diversidad genética del mismo, de acuerdo con

el criterio de las distancias genéticas (los más distantes en cada grupo), hasta completar 23 aislamientos, para proceder a su evaluación de patogenicidad (Fase 2).

## **Fase 2. Determinación de la patogenicidad de las especies identificadas:**

Una vez seleccionados los aislamientos, se los reactivó a partir de los ya preservados. Cuando estos lograron los 15 días de edad en medio de cultivo, los trozos de micelio se transfirieron a bolsas plásticas autoclavables conteniendo arroz parbolizado esterilizado en dos ocasiones. Las bolsas se dejaron en oscuridad a temperatura de laboratorio durante 30 días hasta que hubo colonización completa del arroz, para así realizar la inoculación en chapolas de café (Ibarra *et al.*, 1999).

Por aislamiento se pesaron 5 dosis: **0, 0.6, 0.9, 1.2 y 1.5** gramos de arroz por vaso con suelo estéril. La unidad experimental fue conformada por una chapola de café variedad Caturra, sembrada, en un vaso plástico de 7 onzas con suelo esterilizado. Por cada dosis, se realizaron 10 repeticiones, en cada uno de los aislamientos. Luego, en invernadero, se ubicaron aleatoriamente, las unidades experimentales de los aislamientos y las dosis, de acuerdo con el diseño experimental completamente aleatorio, en arreglo factorial N x 5 (N aislamientos y 5 dosis).

Una semana, después de sembradas las chapolas se inoculó el hongo, colocando las dosis de arroz infectado, en contacto con la raíz. Cada día, hasta los 35 días después de la inoculación, se registró el estado de cada unidad experimental (viva o muerta), identificando el número de días de mortalidad de las chapolas (variable de respuesta).

El criterio de selección de los aislamientos más patogénicos se realizó, debido a que la interacción (Aislamiento x Dosis) no fue significativa, al igual que el efecto de las dosis, así que se procedió a evaluar el efecto de los aislamientos, donde se aplicó una prueba de Tukey al 5%, para diferenciarlos por menor tiempo promedio de sobrevivencia, y con mortalidad mayor al 50%.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se recolectaron un total de 152 muestras en cultivos de café, como en otras especies forestales en los tres departamentos, presentándose en éstos tanto *R. bunodes*, y *R. pepo*, en focos que oscilaban con ataques de 3 hasta las 200 plantas por cada uno de ellos (Tab.1).

Estos focos fueron identificados macroscópicamente, por medio de los síntomas externos que presentaron los árboles, además de los síntomas presentados por las raíces de éstos, independientemente para cada una de las especies de *Rosellinia*. En el caso de *R. pepo* con estrías en forma de abanico o estrella, y para *R. bunodes*, estrías y puntos negros.

La especie que se presentó atacando la mayor variedad de especies, fue *Rosellinia pepo*, la cual fue encontrada en el 97,1% de las muestras recolectadas, incluidas las de café, en cambio la especie que se encontró en mayor cantidad en una sola especie, fue *Rosellinia bunodes*, la cual se presentó atacando café en un 78.8% de las muestras, de las 113 recolectadas igualmente de café.

Cabe recalcar, que esta especie (*R. bunodes*) fue encontrada únicamente en café, y Eucalipto, por lo cual podría decirse, que *R. Pepo*, es la más diversa y a su vez más problemática por su amplia cantidad de hospederos (Tab.1), pero sin dejar a un lado que la *R. bunodes* fue la que más atacó entre todo el material recolectado en los tres departamentos, así haya sido únicamente en dos hospederos (Tab.1), lo cual corrobora lo dicho por Castro y Esquivel (1991) quienes afirman que en las zonas cafeteras prevalece, la llaga negra.

**Tabla 1:** Especies muestreadas Vs. Tipo de especies de Rosellinia y N° de plantas/Foco, en los Departamentos de Caldas, Risaralda y Quindío (2008 – 2009).

Especie	Especies de Rosellinia (Muestras Recolectadas)		Plantas/Foco
	<i>R. bunodes</i>	<i>R. pepo</i>	
<i>Café</i>	89	24	1-200
<i>Cacao</i>		6	10
<i>Macadamia</i>		9	10
<i>Caucho</i>		5	5
<i>Nim</i>		2	5
Aguacate		3	3
Plátano		4	3
<i>Gmelina arborea</i>		2	3
Yuca		2	2
Guamo		2	2
Eucalipto	1		1
Guayaba		1	1
Arbol de la cruz		1	1
Guanabana		1	1

Al recolectar las muestras en una región netamente cafetera, se podría asumir, que los resultados encontrados son acordes con los datos expresados en la tabla, ya que hay un mayor porcentaje de ataque en café que en las otras especies, lo que se refleja en la disminución de los rendimientos en esta plantación (Gálvez, 1990), sin embargo, Castro (1992), observó niveles de incidencia hasta del 80% en varias fincas de esta misma zona, con pérdidas millonarias, no solo en café, sino también en cítricos y macadamia, lo que hace presumir que en otras regiones con una producción masiva, diferente a la de café, y

con presencia de *Rosellinia*, se podría encontrar variación en cuanto a los rangos de ataque, como sucede en el cultivo de papa en países de Perú, Ecuador y Colombia cuya enfermedad es muy importante porque ocasiona pérdidas que oscilan entre 20 y 80% de los rendimientos, pero, si el agricultor practica el monocultivo y siembra en campos de cultivo infestados, al tercer o cuarto año las pérdidas pueden alcanzar el 100% (Orellana, 1978; Ayala, 1987).

Luego de la siembra de las muestras en el laboratorio, se obtuvo un total de 115 muestras que fueron purificadas para el respectivo proceso de identificación molecular. Dichas muestras, fueron procedentes igualmente de los tres departamentos y de diferentes especies seleccionadas.

Con relación a la identificación macroscópica del hongo, en el medio de cultivo, la coloración del micelio de las colonias de *R. pepo* inicialmente fue de color blanco, a medida que este crecía y cubría la mayor parte de la superficie del medio se tornaba de color gris ahumado a café o negro al final. El micelio de las colonias desde su inicio fue de aspecto algodonoso, pero a medida que envejecía se volvió de consistencia quebradiza. También se observó la presencia de sectores que se diferenciaban unos de otros en el color y la apariencia, formando halos concéntricos blancos sobrepuestos al micelio negro (Fig. 2, 3, 4, 5, 6) similares a las descripciones realizadas por Fernández y López (1964). Con lo que se manifestó, que el crecimiento de este hongo en laboratorio, es muy distinto a su crecimiento en campo.

**Fig. 2** Café



**Fig. 3.** Macadamia



**Fig. 4.** Cacao



**Fig. 5** Aguacate



**Fig. 6** Caucho



Con respecto a la crioconservación de las cepas puras, estos aislamientos arrojaron un tiempo estimado de viabilidad del hongo entre 4 y 5 meses, siendo reactivados mediante choque térmico a temperatura de 34 a 37 °C, lo cual hace necesario una reactivación constante, lo que puede causar la pérdida de patogenicidad del hongo (Fernández y López 1964), por lo que es fundamental, ensayos de conservación y permanencia del hongo, en otros medios, como el arroz parbolizado, o sorgo (Castro *et al.*, 2003).

En cuanto a los análisis moleculares de los aislamientos de *Rosellinia*, se obtuvo un total de 52 aislamientos con ADN puro, lo que fue validado por una prueba de electroforesis, siendo estos utilizados para las pruebas de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), y los cuales fueron enviados a Macro Gen (Corea) para su secuenciación. Las 100 muestras restantes, se perdieron durante el proceso de crecimiento en laboratorio, debido a que este hongo es muy susceptible a diversos tipos de contaminación, lo cual provocó que se debiera realizar varias replicas por cada aislamiento, para disminuir el riesgo de pérdida por contaminantes.

Se obtuvo finalmente un total de 28 secuencias, de las 52 enviadas, que en un 100% resultaron ser muestras de *Rosellinia*, el resto de las muestras, debido a que indicaron algún tipo de contaminación o presentaron ser otro tipo de hongo como, *Flavodon flavus*, *Marasmius cladophyllus*, *Rhizotocnia s.p*, *Penicillium grisetulum*, entre otros contaminantes comunes de laboratorio, fueron desechadas, ya que no aportaban ADN puro, para cualquier tipo de prueba.

Es importante aclarar, que estas otras especies de hongos, debieron presentarse ya que a la hora de la amplificación se utilizaron *primers* universales para cualquier otro tipo de hongo, lo que ocasionó que sí existiera ADN dentro de las pruebas, pero que éste fuera de alguno de los otros hongos y no de *Rosellinia*, lo cual es muy difícil de identificar a la hora de realizar las pruebas de electroforesis, pero que se detecta únicamente al momento de su secuenciación.

Para este análisis molecular se añadieron 43 secuencias de especies de *Rosellinia* reportadas en la base de datos del Gen Bank, (Tab. 2) y con estas se elaboró el respectivo dendrograma, el cual fue construido en el programa BOSQUE: Phylogenetic Tool (Fig. 7), utilizando *Hypoxylon intermedium* como grupo externo, y con un bootstrap de 1000 repeticiones.

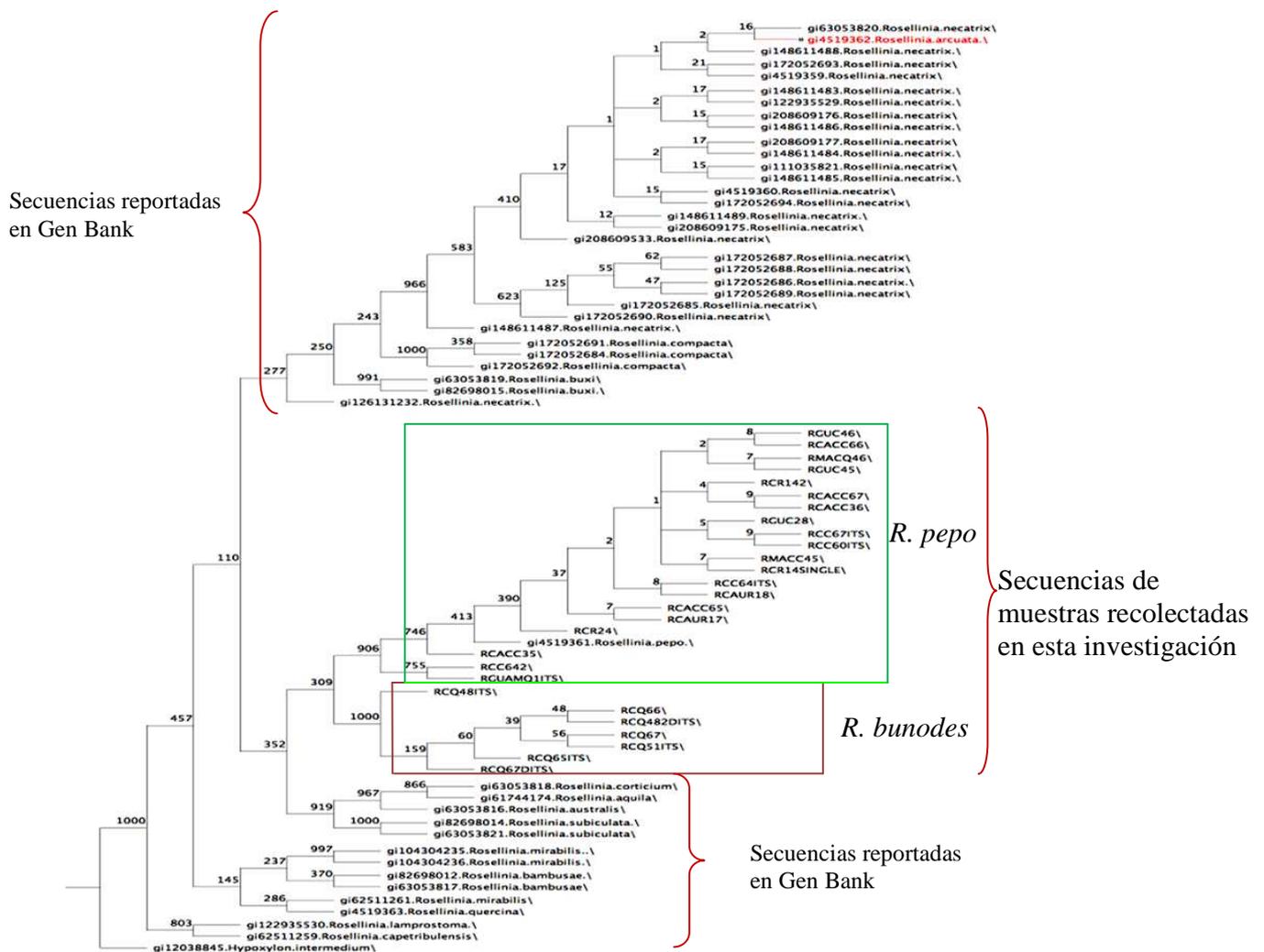
**Tabla 2:** Especies de *Rosellinia* reportadas en el Gen Bank, las cuales fueron agregadas para la construcción del dendrograma:

<b>ESPECIES DE ROSELLINIA EN GEN BANK</b>	
<i>R. necatrix</i> :	<b>25</b>
<i>R. mirabilis</i> :	<b>3</b>
<i>R. compacta</i> :	<b>3</b>
<i>R. bambusae</i> :	<b>2</b>
<i>R. subiculata</i> :	<b>2</b>
<i>R. buxi</i> :	<b>2</b>
<i>R. pepo</i> :	<b>1</b>
<i>R. corticium</i> :	<b>1</b>
<i>R. quercina</i> :	<b>1</b>
<i>R. aquila</i> :	<b>1</b>
<i>R. lamprostoma</i> :	<b>1</b>
<i>R. arcuata</i> :	<b>1</b>

**Fuente:** Gen Bank

Esta comparación tuvo como objeto, saber realmente con que especie aparte de las ya conocidas actualmente, se estaba tratando en la región cafetera colombiana, debido a que la mayoría de las reportadas en este banco de germoplasma, no se encuentran registradas en esta zona del país.

**Fig. 7** Dendrograma construido con las 28 secuencias de *Rosellinia*, más las reportadas en el Gen Bank:



El dendrograma arrojó, que las secuencias de ADN fueron exitosamente alineadas con las otras especies del género *Rosellinia*, incluidas en este análisis, lo cual es muy favorable, ya que se puede afirmar, que realmente se está trabajando con especies del género *Rosellinia*.

La especie que inicialmente se identificó macroscópicamente por medio de la sintomatología que presentaba, como *R. pepo*, se alineó correctamente con la misma especie, identificada ya molecularmente en el Gen Bank, lo que permite decir que realmente se trata de *R. pepo*. En cambio, la especie que fue identificada en campo como *R. bunodes*, si se alineó con las del género *Rosellinia*, pero al momento de separarse entre especies, no se agrupó con ninguna. Esto se debió a que en el banco de germoplasma, no existe reporte alguno de otra *R. bunodes*, lo cual hace que estas muestras no tengan con quien agruparse, lo que puede dar certeza de que ésta especie realmente se trata de la identificada macroscópicamente como *R. bunodes* por muchos autores como Chardón y Toro (1930) o Castaño(1953) .

Por este hecho y esperando resultados de posteriores trabajos a éste, los cuales están siendo realizados por CENICAFE, se incluirá entre los datos del Gen Bank a *R. bunodes*, como una especie ya identificada, para poder ser utilizada como comparativo en otras investigaciones moleculares.

Para las pruebas de Patogenicidad, se seleccionaron 23 aislamientos de diferente procedencia y hospedante, de los 28 obtenidos después de la identificación molecular (Tab.3). Luego de su inoculación en chapolas de café, se encontró que la muerte de éstas, se inicia al séptimo día, lo cual muestra lo agresivo del patógeno.

**Tabla 3. Aislamientos de *Rosellinia* spp. utilizados en las pruebas de patogenicidad en chapolas de café variedad Caturra. Y sus respectivos hospedantes originales.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Código aislamiento</b>	<b>Identificación molecular</b>	<b>Hospedante</b>
1	RCQ 48	<i>R. bunodes</i>	Café
2	RCQ57	<i>R. bunodes</i>	Café
3	RCQ53	<i>R.bunodes</i>	Café
4	RCR15	<i>R. pepo</i>	Café
5	RCC64	<i>R.pepo</i>	Café
6	RCAUR18	<i>R. pepo</i>	Caucho
7	RGUAMQ1	<i>R.pepo</i>	Guamo
8	RCQ67	<i>R.bunodes</i>	Café
9	RMACC 45	<i>R.pepo</i>	Macadamia
10	RCACC 37	<i>R.pepo</i>	Cacao
11	RCACC 65	<i>R.pepo</i>	Cacao
12	RGUC 45	<i>R.pepo</i>	Guayaba
13	RCC73	<i>R.bunodes</i>	Café
14	RMACC36	<i>R. pepo</i>	Macadamia
15	RCR 24	<i>R. bunodes</i>	Café
16	RMACC 57	<i>R. pepo</i>	Macadamia
17	RCQ 60	<i>R.bunodes</i>	Café
18	RCC 77	<i>R. bunodes</i>	Café
19	RCC60	<i>R.bunodes</i>	Café
20	RMACC 47	<i>R.pepo</i>	Macadamia
21	RCCAC37	<i>R.pepo</i>	Cacao
22	RCQ71	<i>R.bunodes</i>	Café
23	RCQ64	<i>R.bunodes</i>	Café
24	Testigo sin hongo		

El análisis de varianza no mostró efecto de la interacción aislamiento x dosis, ni efecto de las dosis por separado, pero sí de los aislamientos (Tab 4).

**Tabla 4. Porcentaje de mortalidad de las chapolas, por aislamiento evaluado y día promedio de muerte hasta el fin de las pruebas (día 35) .**

<b>AISLAMIENTO</b>	<b>% DE MORTALIDAD</b>	<b>DIA PROMEDIO DE MUERTE</b>
<b>1</b>	77.5	28,475dc**
<b>2</b>	100	22,5dc
<b>3</b>	77.5	29,525dc
<b>4</b>	27.5	59,9a
<b>5</b>	15.0	67,125a
<b>6</b>	10.0	69,925a
<b>7</b>	10.0	69,525a
<b>8</b>	60.0	41,275cd
<b>9</b>	*	*
<b>10</b>	10.0	70,35a
<b>11</b>	12.5	68,15a
<b>12</b>	12.5	68,5a
<b>13</b>	60.0	41,05cd
<b>14</b>	25.0	61,825a
<b>15</b>	*	*
<b>16</b>	17.5	63,6a
<b>17</b>	52.5	44,575bc
<b>18</b>	72.5	30,9cd
<b>19</b>	7.5	71,025a
<b>20</b>	*	*
<b>21</b>	15.0	68,9a
<b>22</b>	100	29,05cd
<b>23</b>	100	35,125cd
<b>TESTIGO</b>	*	*

\* Al momento de terminar el experimento todas las chapolas estaban sanas.

\*\* Datos con letras diferentes indica diferencias significativas entre aislamientos, según prueba de Tukey ( 0.5%).

Hasta el día treinta y cinco (35), se determinó que tres (3) de estos aislamientos no causaron mortalidad alguna en las chapolas; en 11 de ellos, menos del 50% de las unidades experimentales murieron y en 9 murieron más del 50% de las unidades experimentales. Cabe resaltar que no hubo influencia de la procedencia de la muestra, ni de la especie de *Rosellinia* inoculada (Tab. 4).

El número de unidades experimentales muertas (chapolas), con respecto a las dosis de inoculación, fue muy heterogénea en el rango de tiempo establecido para esta prueba. La dosis de 0.6 gr. tuvo una fluctuación en cuanto al porcentaje de unidades experimentales muertas entre el 50% hasta un 90% (aislamientos 3 y 23); la dosis de 0.9, fluctuó entre el 50% (aislamientos 8, 13 y 17) y un 100% (aislamientos 22 y 23), y la dosis 1.5 un 100% (aislamiento 2).

En la tabla 5, se presentan los aislamientos más agresivos, con un 100% de mortalidad a los 35 días y dentro de ellos el de menor tiempo de mortalidad en diferentes dosis.

**Tabla 5. Aislamientos de *Rosellinia* spp. que causaron 100% de mortalidad en chapolas de café variedad Caturra en el menor tiempo después de la inoculación.**

<b>Aislamiento</b>	<b>Dosis</b>	<b>Tiempo medio de mortalidad (días)</b>	<b>Error de estimación</b>
2 (RCQ57)	1.5	13.0b*	0.97
22 (RCQ71)	0.9	26.4 a	0.56
22 (RCQ71)	1.2	26.3a	0.51
22 (RCQ71)	1.5	26.3a	0.26

23 (RCQ64)	0.9	28.1a	0.57
------------	-----	-------	------

\* Promedios con letras no comunes indican diferencias significativas entre tratamientos, según prueba de Tukey al 5%

El aislamiento más patogénico fue el RCQ57 que corresponde a *R. bunodes* (Tab. 5), el cual fue extraído de café, en él murieron el 100% de las unidades experimentales, con el menor tiempo mortalidad (13 días), en la dosis de 1.5.

Sin embargo, otros aislamientos como el RCQ71 y RCQ64 presentaron el doble del tiempo medio de mortalidad, respecto del más patogénico (Tab. 5).

## CONCLUSIONES

- Las especies *R pepo*, y *R bunodes* son las únicas encontradas en las plantas evaluadas en la zona central cafetera, tanto en café, como en otras especies forestales asociadas a éste.
- La llaga estrellada (*R. pepo*) en las zonas muestreadas tiene un amplio rango de hospedantes en comparación con la llaga negra (*R. bunodes*), lo cual se demostró al ser encontrada en la mayor parte de las muestras recolectadas.
- En los tres departamentos se encontraron 72 focos o sitios afectados por llagas radicales, en un amplio rango de hospedantes además del café.
- La secuenciación en el género *Rosellinia*, es muy importante para la clasificación entre las especies ya que únicamente utilizando ésta, se pudo separar entre las especies encontradas en este estudio, debido a que no se trabajó con *primers* específicos.
- Se determinó que existen diferencias en la patogenicidad de los aislamientos de *Rosellinia* evaluados en chapolas independientemente de la dosis utilizada y su procedencia.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ASOEXPORT, 2009. Asociación de Exportadores de Café de Colombia. [www.asoexport.org](http://www.asoexport.org)
2. AYALA, L. Resistencia varietal, rango de hospedantes e identificación del agente causal de la "lanosa" de la papa. Tesis, Lic. Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 1987. 89 pp.
3. BERMUDEZ, M.; CARRANZA, M. Estado anamórfico de *Rosellinia bunodes* (Berk. & Br.) Sacc. y *Rosellinia pepo* Pat. (Ascomycotina: Xylariaceae). Revista de Biología Tropical (Costa Rica) 40(1):43-46. 1992.
4. BRIDGE, P.; COUTEAUDIER, Y.; CLARKSON, J. Molecular variability of fungal pathogens. CABI International. Wallingford. United Kindom. 1998. 319p.
5. CASTAÑO, J. Algunas observaciones sobre la "Llaga negra" radicular del cafeto. Agricultura tropical (Colombia) 9(2): 41-47. 1953.
6. CASTRO, B. Manejo y control de la Llaga Radical Negra. In: CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ. CENICAFÉ. Informe anual de labores de la Disciplina de Fitopatología. Chinchiná (Colombia), 1992.
7. CASTRO, B.; DUQUE, H.; MONTOYA, E. Incidencia de Llagas radicales (*Rosellinia* sp.), en el sistema Café – Yuca en el Departamento del Quindío. In: CONGRESO de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines, 24. Armenia (Colombia), Junio 25-27, 2003. Memorias. Armenia (Colombia), ASCOLFI, 2003. p. 32-33.

8. CASTRO, B; ESQUIVEL, H. Las Llagas Radicales del cafeto. Avances Técnicos Cenicafé (Colombia) No. 163. 1991. 4p.
9. CHARDON, C.; TORO, R. Mycological exploration of Colombia. Journal of agriculture of the University of Puerto Rico (puerto Rico) 14(4): 272. 1930.
10. DUQUE, J. La podedumbre negra de la raíz del cafeto. Comisión Nacional del Café, Mexico (Mexico) 1952. 107 p.
11. ESQUIVEL, H.; LEGUIZAMON, E.; ARBELAEZ, G. Búsqueda y evaluación de antagonistas a *Rosellinia bunodes* agente causante de la Llaga Negra del cafeto. Cenicafé (Colombia) 43(2):33-42. 1992.
12. EFRON, B. Bootstrapping methods: Another look at jackknife. Annals of Statistics No. 7 1982. p. 1-26. In: Hillis, D.; Moritz, D.; Mable, B. Molecular Systematics. Second Edition. Snauer Associates Publishers, United States of America. 1996.
13. FERNADNEZ, O.; LOPEZ, S. Las Llagas Radiculares Negra (*Rosellinia bunodes*) y Estrellada (*Rosellinia pepo*) del cafeto. I. Patogenicidad e influencia de la clase de inóculo en la infección. Cenicafé (Colombia) 15(3):126-144. 1964.
14. GÁLVEZ, G. Enfermedades en el cultivo del cafeto.(Recopilación de trabajos). Turrialba (Costa Rica).1990.v. 119 p.
15. GUTIERRES, A.; CASTRO, B.; RIVILLAS, C. Manejo de la llaga negra del cafeto. Cenicafé (Colombia) 57(4): 299-311. 2006.

16. HILLIS, D.; MORITZ, C.; MABLE, B. *Molecular Systematics*, Second Edition. Sinauer Associates Publishers United States of America. 1996.
17. HOOPEN, G.; ORTIZ, J.; AGUILAR, M.; KRAUSS, U. Preservation methodology for *Rosellinia* species. *Mycological Research* 108(3): 274-282. 2004.
18. IBARRA, N.; CASTRO, B.; PONCE, C. Estudio del proceso infectivo de *Rosellinia bunodes* Berk y Br. Sacc. en café. *Fitopatología Colombiana (Colombia)* 23(1-2):59-64. 1999.
19. LEE S.; TAYLOR J. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores . In: *PCR protocols : A guide to methods and aplicaciones*. Ed. By Innis, M.A.; Gelfand, D.H. ; Sninsky, J.J.; White T. J. Accademic . USA. 482p. 1990.
20. LOPEZ, S. Estudio sobre la llaga negra radicular del cafeto causada por *Rosellinia bunodes* (Berk & Br.) Sacc. Manizales (Colombia), Universidad de Caldas. Facultad de Agronomía, 1965. 60p. (Tesis: Ingeniero Agrónomo).
21. LOPEZ, Q. Determinación de la variabilidad genética entre aislamientos de *Rosellinia* sp.; *Rosellinia bunodes* y *Rosellinia pepo* Mediante la técnica de amplificación aleatoria de polimorfismos de DNA (RAPD) y análisis de los espaciadores de transcritos internos (ITSS). Trabajo de grado. Biología. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Biología. Sede Bogotá. 152p. 2004.
22. MERCHAN, V. Experiencias en el manejo de *Rosellinia*. *ASCOLFI Informa (Colombia)* 19(3): 23-24. 1993.

23. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.(NCBI).  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) ( On line).
24. ORELLANA, H. 1978. Estudio de la ''Lanosa'' de la papa en Ecuador.  
Fitopatología 13: 61-66.
25. REALPE, C. Estudios biológicos de *Rosellinia pepo* Pat. causante de la Llaga  
estrellada en la macadamia. Manizales (Colombia), Universidad de Caldas. Facultad  
de Ciencias Agropecuarias, 2001. 88 p. (Tesis: Magister en Fitopatología).
26. RODRIGUEZ, A. Caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum* spp.  
Asociadas a coffee Aràbica en Colombia y su aplicaciòn en el diagnóstico en el  
CBD. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de  
Microbiología Industrial, 2007. 126 p. ( Tesis: Microbiologo Industrial).
27. SACCAS, A. Les Rosellinia de cafeirs en Oubangui – Chari. Agronomie Tropicalé  
(Francia) 11 (5): 551 – 595; 11 (6): 687 – 706. 1956.