

BIOLOGIA Y PATOGENESIS DE *Rhizoctonia solani* EN CAFE

Alvaro L. Gaitán-B^a; Jairo E. Leguizamón-Caycedo*

RESUMEN

GAITAN B., A.L.; LEGUIZAMON C., J.E. Biología y patogenesis de *Rhizoctonia solani* en Café. Cenicafé (Colombia):45(1): 14-24. 1994.

Dos cepas de *Rhizoctonia solani* aisladas de plantas cotiledonares de café con síntomas de volcamiento fueron caracterizadas. Microcultivos de estas cepas presentaron células multinucleadas (5-8 núcleos), hifas principales con diámetro 5-8 μm y anastomosis con el grupo 4 (AG4). En PDA y sobre cubreobjetos se obtuvo el heterocarionte. La tasa de crecimiento en agar extracto de levadura y dextrosa bajo luz constante y 22°C fue en promedio 0,16 cm/h. Seis metodologías probadas fallaron en la inducción del estado perfecto (*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk). Cambios en la histología e histoquímica (lignina y suberina) del hipocotilo de café (*Coffea arabica* L.) fueron observados durante las fases de susceptibilidad y resistencia. El proceso infectivo mostró exteriormente 3 fases: Crecimiento hifal a lo largo de las paredes celulares, agrupamiento de hifas y formación de cojines de infección. Interiormente en el hipocotilo es notorio el debilitamiento de las paredes celulares. La dosis 50% (ED50) se obtuvo mediante transformación PROBIT, y se encontró que, en las cepas estudiadas, ésta varía entre 0,3 y 0,9 g de micelio/100 g de suelo.

Palabras claves: Volcamiento, infección, *Coffea arabica*, microcultivos, *Thanatephorus cucumeris*

ABSTRACT

Two *Rhizoctonia solani* strains from coffee seedlings with Damping-off symptoms, were characterized. Microcultures indicated multinucleate cells (5-8 nuclei), and hyphal diameters 5-8 μm . The strains fused with AG4. The heterokaryon was obtained on cover glasses over PDA. The growth rate had average of 0.16 cm/h in Yeast Extract Dextrose Agar, under continuous illumination at 22°C. Six methodologies were unsuccessful to induce the perfect stage (*Thanatephorus cucumeris* (Frank) (Donk). In coffee (*Coffea arabica* L.) changes in histology and histochemistry (lignin and suberin) of the hypocotyl were observed throughout the susceptible and resistant stages. The infective process outward the hypocotyl exhibited three stages: hyphal growth along cell wall junctions, grouping of the hyphae and formation of infection cushions. In the inside of the hypocotyle, is notorious the weakening of the cells walls. The effective dose 50% (ED50) was obtained by using PROBIT transformation, and in the strains studied it was between 0.3 and 0.9 g of mycelium per 100 g of soil.

Keywords: Damping off, infection, *Coffea arabica*, microcultures, *Thanatephorus cucumeris*

Auxiliar IV e Investigador Principal I, respectivamente. Fitopatología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFE, Chinchiná, Caldas, Colombia.

Durante la germinación de la semilla y la aparición de las hojas cotiledonares, la planta de café es susceptible a la enfermedad conocida como "Volcamiento", "Mal del tallito" o "Damping-off" cuyo agente causante es el hongo *Rhizoctonia solani* Kühn. (4, 9). Esta enfermedad se presenta en forma de focos, atacando la semilla 15 días después de sembrada, o el hipocotilo, donde se aprecia una mancha húmeda, hundida, que va rodeando y necrosando el cuello hasta provocar el volcamiento. Las pérdidas por volcamiento se caracterizan por: 1. Destrucción de plántulas, 2. Incremento de costos por resiembra, 3. Pérdidas por resiembra en épocas no favorables.

Rhizoctonia solani Kühn. pertenece a la subdivisión DEUTOROMYCOTINA, formaorden AGRONOMYCETALES (3) y es el anamorfo de *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk., el cual pertenece a la subdivisión BASIDIOMYCOTINA, orden Tulasnellales familia CERATOBASIDIACEAE (2). El concepto de Grupos Interespecíficos (IGs) se ha introducido en la taxonomía de *R. solani*, originado a partir de las observaciones de variación de la patogenicidad, morfología esclerocial, apariencia del micelio en el medio de cultivo, características fisiológicas y otras. Actualmente se registran 11 IGs (AG-1, 2-1, 2-2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y BI -Bridging Isolates-), sin embargo es muy posible que puedan existir más grupos (21).

La carencia de métodos confiables para obtener el estado perfecto de *R. solani* en cultivo puro, es un problema importante en estudios de taxonomía, genética y variabilidad del hongo. Varios métodos han sido utilizados para inducir el estado perfecto (24, 25, 28). La heterocariosis se refiere a la reunión por anastomosis de 2 o más núcleos genotípicamente diferentes en los interceptos del micelio. En *R. solani* el micelio es normalmente multinucleado y en un talo heterocariótico la mayoría de ellas parecen ser heterocarióticas también. (23).

El hipocotilo es la parte del eje caulinar afectado por el hongo, el cual se halla debajo de la inserción de los cotiledones. Su histología se ha descrito en fases embrionarias y está conformada por una epidermis, una corteza no diferenciada, el periciclo y la médula (12). Se han adelantado estudios histológicos en ciertas combinaciones Hospedante-*Rhizoctonia* (11, 13) con los que se ha obtenido información acerca de los procesos de pre-penetración y penetración de *R. solani*. Básicamente se han descrito 3 formas de penetración: la formación de cojines de infección, la formación de apresorios lobulados y la penetración estomatal (13).

Muchos hospedantes exhiben resistencia con el incremento de la edad. Además, en muchos casos, *R. solani* ataca al hospedante el cual causa una lesión pequeña y definida que no progresa con el tiempo. La naturaleza de esa resistencia, que se desarrolla con la edad en tejidos sanos o infectados, puede estar relacionada con varios mecanismos (7).

El propósito de este trabajo fue estudiar algunos aspectos de la biología de *Rhizoctonia solani* y del proceso patogénico en hipocotilos de *Coffea arabica* var. Colombia.

MATERIALES Y METODOS

Origen del hongo. Como material biológico se utilizaron dos cepas de *Rhizoctonia*, aisladas de plantas cotiledonares de café que presentaban los síntomas del "Mal del tallito", colectadas de los germinadores de CENICAFE (Chinchiná, Caldas). Estas fueron codificadas como CENICAFE 042 y CENICAFE 043. Adicionalmente se obtuvieron, por intermedio del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 6 cepas de referencia de *Rhizoctonia solani* que tenían grupo de anastomosis conocido (AGs 1, 2, 3, 4 y 5).

Las cepas fueron mantenidas en PDA, Agar Extracto de Levadura Dextrosa (ELDA) y en agua destilada estéril según el método descrito por Castellani (14).

Descripciones morfológicas. Las descripciones morfológicas de los aislamientos se hicieron a partir de cultivos crecidos en los medios antes citados, de 20 a 30 días, a una temperatura de 22-28 °C y con períodos alternos de luz y oscuridad de 12 h. Para los estudios microscópicos se utilizaron microcultivos en Agar Agua 1,5% o Dextrosa Malta Agar y montajes con la técnica de "lámina limpia" (Clean slide) descrita por Kronland (20), incubando a 22°C y con luz constante durante 2-3 días. Para la tinción de núcleos se utilizaron 2 colorantes: a. Safranina O, preparada según las indicaciones de Bandoni (6), y b. Anilina azul 1% en glicerina 50% ligeramente acidificada con HCL (26). Se midieron los diámetros de 10 hifas principales en tres puntos, provenientes de microcultivos con hifas maduras sin teñir.

Grupos de anastomosis. Para determinar el grupo de anastomosis se utilizó el método de microcultivo sobre agar agua 2%, a partir de colonias crecidas en PDA (25). Luego de incubarlo éstos a 22°C en condiciones de luz constante, se esperó entre 16 y 24 horas hasta cuando las hifas hicieron contacto. Inmediatamente se efectuó la tinción con anilina azul y se observó al microscopio.

Para detectar la anastomosis se procedió a localizar una hifa principal y hacer un rastreo a lo largo de ésta con el fin de encontrar ramificaciones sin estrechamiento y sin septo cercano al punto de ramificación (fusión hifal). Para eliminar una posible reacción de auto-anastomosis, se hizo un seguimiento de la hifa fusionada hasta determinar si pertenecía o no al mismo micelio de la hifa principal. Finalmente, se realizó un examen microscópico a 800X para verificar disolución de la pared celular y fusión de citoplasma (plasmogamia).

Tasa de crecimiento. Se siguió la metodología de Crecimiento Radial Acumulativo para determinar la tasa de crecimiento lineal de las cepas de *R. solani*. Se colocaron segmentos de 0,5 x 0,5 mm de PDA con crecimiento micelial, de cara a la superficie del medio de cultivo ELDA en cajas de petri, con 12 repeticiones. Las cajas se incubaron a 22°C, luz constante y humedad relativa entre 60 y 68%. Luego de 20 horas de incubación se hicieron lecturas periódicas del diámetro de la colonia sobre dos líneas perpendiculares marcadas previamente en la caja, cada 3 horas.

Obtención del heterocarionte. Se enfrentaron dos porciones de micelio, tanto de la misma cepa como de dos cepas diferentes, tomadas a partir de PDA y se colocan en los extremos de las cajas de petri con los siguientes medios: PDA, con laminillas cubre-objetos en el espacio central, PDA con carbón activado 1% (8), NDA (Nitrato Dextrosa Agar) según Vest (27). Los medios se incubaron a una temperatura de 22-28 °C y con períodos alternos de luz y oscuridad de 12 horas.

Inducción del estado perfecto. Se probaron las siguientes metodologías.

- Cultivo en PDA a luz continua.
- Cultivo en PDA y paso a Agar Agua 1,5%, luz continua u oscuridad continua.
- Cultivo en suelo estéril.
- Estrés fungistático, según el procedimiento descrito por Kangathanlingam (19), y probando las soluciones al 5% de los siguientes fungicidas. Aliette, Bavistin, Benlate, Dithane, Manzate, Monceren, Topsin, Fusan (5 y 10%), y como testigo Agua destilada. Se incubaron bajo 2 condiciones: 22°C en oscuridad continua, y 22°C en luz continua durante 1 mes.

- Cultivo en ODMA (marmita dextrosa agar modificado), utilizándose extracto de levadura a cambio de marmita, y paso a TWA (agar agua) 2%.
- Cultivo en Agar Nutritivo preparado con extracto de suelo aluvial.
- Cultivo en ELDA al que posteriormente al crecimiento micelial se le añadió suelo aluvial estéril (pH=8) incubado en oscuridad y libre aireación (25).

Estudios histológicos. Para los cortes en frío, se utilizó un Cryomat Leitz a las temperaturas, tanto para platina como para cuchilla, de -20, -17 y -5°C. Los tejidos se redujeron a bloques no mayores de 0,5 cm de alto y se adhirieron a la platina con una gota de gelatina al 12,5%. Se realizaron cortes de 20, 50, 80 y 100 μm de grosor. Las secciones se suspendieron en agua para retirar la gelatina y luego se montaron en láminas portaobjetos, sobre las cuales se efectuaron las tinciones.

Para los cortes en parafina se procedió a fijar las secciones de tejido en una solución FAA (formol 5 ml, ácido acético 5 ml y alcohol etílico 70% 90 ml) durante 48 horas. Posteriormente se lavaron y deshidrataron las muestras sumergiéndolas por 1 hora en soluciones de concentraciones crecientes de etanol (50, 60, 70, 80, 90, 95 y 100%), y finalmente Xilol. Luego se embebieron pasando los tejidos 3 veces por parafina (punto de fusión 56-58°C) durante 1 hora. Los bloques se cortaron en un micrótopo SPENCER LENS, en secciones de 8, 10 y 15 μm de grosor.

Para las tinciones se usaron: Anilina azul, Bismarck brown (18) y Auto-florescencia con luz U.V. (395-425 nm). Las láminas se sellaron con el medio sintético Entellant para evitar interferencias con la iluminación fluorescente.

Pruebas histoquímicas. Se estudiaron hipocotilos de 1, 2 y 5 meses de post-emergencia. Para la detección de lignina se siguió la metodología del test de Wiesner o Floroglucinol-HCL. Un color rojo púrpura revela la presencia de lignina (18). En la detección de suberina, se iluminó la muestra con luz U.V. (395-425 nm), utilizándose un microscopio ZEISS para epifluorescencia, filtro barrera FT 425, BP 38 y lámpara HBO 50. (17).

Pruebas en suelo. Con el fin de obtener una fuente de inóculo constituida exclusivamente por el micelio, se procedió a incrementar el hongo en un medio líquido sin agitación. Como medio de cultivo se utilizó caldo ELD (Extracto de Levadura Dextrosa), 120 ml, servido en botellas de vidrio de dimensiones 9 x 6 x 22,5 cm incubadas en posición horizontal, obteniendo así un área efectiva de crecimiento de aproximadamente 200 cm^2 , bajo luz constante o aún en períodos alternos de luz-oscuridad de 12 horas, a una temperatura de 22°C durante 10 días.

Una vez crecido el micelio en ELD se procedió a separarlo del medio de cultivo mediante filtrado en embudo de Buchner. Con la ayuda de una espátula se extrajo la mayor cantidad de líquido posible, y la masa así obtenida se pesó inmediatamente. A continuación se separaron los gramos necesarios para aplicar concentraciones de 25, 50, 100 y 200 mg/100 mg de suelo y se diluyeron en agua destilada estéril conservando la proporción micelio: agua destilada 1:9 p/p (Dilución 10^{-1}). La mezcla se licuó durante 3 minutos a baja velocidad y 1 minuto a alta.

De ésta, se tomaron 9 ml para cuantificación, lo cual se hizo con la técnica de recuento en placa profunda en medio Extracto de Malta Agar (Malta Agar Sintético, Merck) sin acidificar (pH = 5,6), realizándose diluciones 1:9 hasta alcanzar 10^{-4} para sembrar en caja y por duplicado a partir de la dilución 10^{-5} . Las

cajas se incubaron a temperatura ambiente, períodos de luz-oscuridad de 12 h durante 2 días, al cabo de los cuales se hicieron los recuentos.

El suelo a inocular se esterilizó en cajones de madera de 55 x 25 x 15 cm a 121°C, 15 lb de presión, durante 15 min. Una vez esterilizado y frío, se pesó la cantidad necesaria para cada dosis en un recipiente plástico lavado y seco, y allí mismo se añadieron los ml de dilución 10^{-1} requeridos para alcanzar la concentración de micelio deseada.

Para cada cepa se utilizó una misma bandeja, teniendo el cuidado de comenzar el procedimiento siempre con la menor dosis y terminando con la mayor. El suelo, una vez homogeneizado, se depositó en 5 vasos plásticos desechables (para cada dosis) de 9,5 cm de altura y 7,5 cm de diámetro en la abertura. El micelio incorporado a la tierra permanecía así, de 17 a 20 horas, para luego sembrar 7 plántulas por vaso. Inmediatamente se trasladaron los vasos a una caseta con techo de guadua y a partir del tercer día se efectuaron las lecturas calificando según una escala similar a la propuesta por CASTRO *et al.* (10) que se ilustra en la Tabla 1.

Estos ensayos se realizaron en la Estación Experimental CENICAFE, localizada en el

municipio de Chinchiná (Caldas), 4°59' de latitud Norte, 75°36' de longitud Oeste y altura sobre el nivel del mar de 1.310 m. (15).

Para cada plántula se determinó el grado de ataque, y para cada dosis se estimó el Índice Ponderado (IP) de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$IP = \frac{A(0) + B(1) + C(2) + D(3) + E(4)}{T(4)}$$

Donde A, B, C, D y E corresponden al número de plántulas que presentaron el correspondiente grado de ataque, y T es el número total de plántulas usadas en cada repetición.

Determinación de la ED50. Para determinar la ED50, se siguió el procedimiento para el análisis PROBIT descrito por Finney (16) usando los valores de IP y el logaritmo natural de la dosis (se adicionó el valor de 1 a todas las dosis para evitar el valor de 0 en la transformación logarítmica). Las dosis efectivas fueron los valores del anti-logaritmo de la dosis correspondiente en la curva de Regresión lineal al 50% de enfermedad (PROBIT = 5).

TABLA 1. Escala de calificación del ataque de *Rhizoctonia solani* en hipocotilos (modificado a partir de CASTRO *et al.* (10))

0	=	Hipocotilo sano
1	=	Afección al 33% de la circunferencia del hipocotilo o menos.
2	=	Afección que varía entre el 33 y el 66% de la circunferencia del hipocotilo.
3	=	Afección en más del 66% de la circunferencia del hipocotilo.
4	=	Volcamiento del hipocotilo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Descripciones morfológicas. Macroscópicamente, el crecimiento de *R. solani* en PDA es diferente en las cepas estudiadas. Durante los primeros cinco días de desarrollo presentan un micelio blancuzco, de textura algodonosa, que se va pigmentando con un color café claro y, en algunos puntos, café oscuro.

El medio de cultivo se torna ligeramente café en la cepa CENICAFE 042 y muy pigmentado en la 043. Ninguna de las dos cepas presentó crecimiento zonificado ni produjo esclerocios visibles en las condiciones estudiadas.

En cuanto al crecimiento en trozos de zanahoria, es igual para las dos cepas: Se inicia con un micelio blanco que al cabo de 10 días se torna café claro, con numerosas puntuaciones más oscuras, que microscópicamente se observan como marañas de micelio sin diferenciación en corteza o médula (Figura 1b), que corresponden a microesclerocios (2). En el medio de cultivo ELDA el crecimiento fue muy denso, y con una escasa producción de pigmento.

Microscópicamente, el micelio presentó las características descritas para el género (Figura 1a), como son: Ramificación cercana al septo distal en la hifas jóvenes vegetativas, formación de un septo en la ramificación cercana al punto de origen, constricción en la ramificación, septo doliporo y ausencia de conexiones en grapa (21, 22). En la cepa CENICAFE 042 se observaron hifas ramificadas rectas y largas, y en la CENICAFE 043 ramificaciones cortas y numerosas (Figura 1a).

Las hifas maduras presentaron un diámetro promedio de $7,7\ \mu\text{m}$ en la cepa CENICAFE 042 y de $5,5\ \mu\text{m}$ en la CENICAFE 043. En la determinación del número de núcleos, se verificó la condición multinucleada del micelio en las cepas variando entre 5 y 8 núcleos

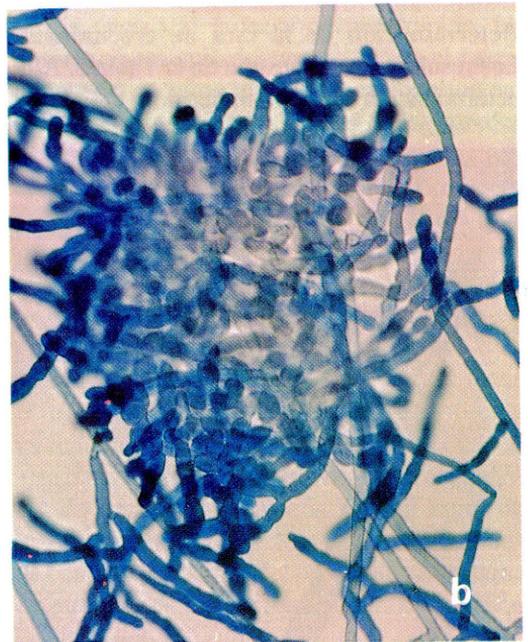
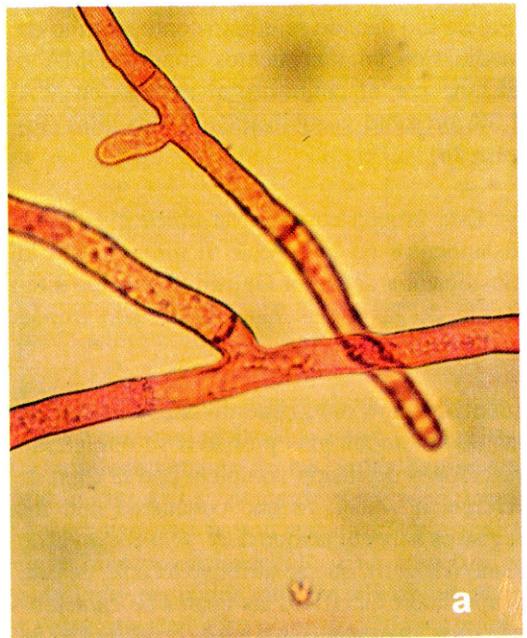


Figura 1. (a). Morfología característica del estado vegetativo de *Rhizoctonia solani* asociado a café (Tinción con Safranina, 400X). (b). Microesclerocios (Tinción con anilina azul 400X).

(Figura 2a) cuando se utilizó como sustrato un medio rico en nutrientes como ODMA o ELDA; por el contrario, el micelio en WA 1,5% presentó vacuolización en las hifas (Figura 2b).

Esta prueba confirma la ubicación de los aislamientos en la especie *R.solani* según la clasificación dada por Ogoshi (21), y los diferencia de las cepas binucleadas con estado perfecto *Ceratobasidium sp.*

Identificación del grupo de anastomosis. En las dos metodologías probadas se obtuvieron reacciones de fusión completa con la cepa de referencia AG4, lo que concuerda con los registros sobre el ataque de *R. solani* a nivel de suelo (epígeo), que se atribuye a cepas de este grupo interespecífico, las cuales se caracterizan por la poca o ninguna producción de esclerocios (22).

Determinación de la tasa de crecimiento. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Esta determinación da una indicación del creci-

miento del hongo y podría estar relacionada con factores de patogenicidad con la ayuda de los ensayos en suelo, siempre y cuando más aislamientos sean evaluados.

Obtención del heterocarionte. Al enfrentar las dos cepas estudiadas, utilizando el método de laminillas cubre objetos sobre PDA se obtuvo, luego de 1 mes de incubación, un micelio blanco algodonoso (Tuft) que microscópicamente presentaba una alta frecuencia de fusión hifal. En los medios PDA+CA y NDA no se obtuvo este tipo de micelio, pero se apreciaron bien las reacciones de incompatibilidad descritas por Vest y Anderson (27), especialmente en el medio de PDA+CA. Según esto, los aislamientos son homocariontes, y contienen diferentes factores H, que son los que controlan este tipo de interacciones.

Inducción del estado perfecto. En ninguna de las metodologías probadas se pudo verificar microscópicamente la presencia de esterigmas en los metabasidios, o de basidiosporas. Utilizando el estrés fungistático y el crecimiento en

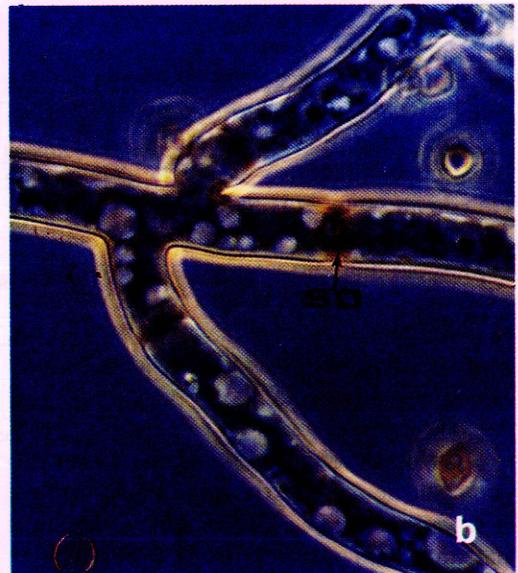
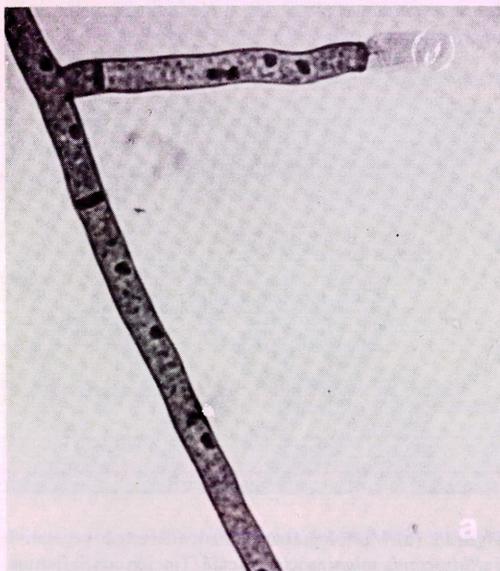


Figura 2. (a). Condición multinucleada de hifas de *R. solani* (Tinción con Safranina O, 400X). (b). Vacuolización en hifas crecidas sobre WA 1,5%. sd = septo doliporo. (Contraste de fases, 400X).

TABLA 2. Tasa de crecimiento de dos cepas de *Rhizoctonia solani* asociadas a café, y de cepas de referencia con grupo de anastomosis conocido.

CEPA	CENICAFE 042	CENICAFE 043	AG1	AG2	AG3	AG4	AG5
TASA (cm/h)	0,166 a	0,152 a	0,164 a	0,094 bc	0,110 b	0,137 a	0,124 ab

Números acompañados por las mismas letras no difieren estadísticamente al nivel de significancia del 5%

medio con suelo (soil-over culture) se presentaron algunas reacciones caracterizadas por cambios en la morfología normal de las células. Cabe anotar que por observación directa de hipocotilos atacados no se evidenció la presencia de la fase perfecta del hongo.

Estos resultados sugieren que los aislamientos estudiados son homocariontes auto-estériles o que requieren condiciones ambientales más estrictas, referentes a niveles de CO₂ atmosférico, humedad, luz o nutrimentos (1, 28). Dadas las dificultades en la inducción del estado perfecto, la obtención del heterocarionte puede ser un método apropiado con el fin de generar material para estudios de la genética del hongo y de la resistencia del hospedante.

Estudios histológicos. En la metodología de cortes en frío, la temperatura de corte más apropiada fue de -5°C. Con relación al estado de desarrollo del hipocotilo, en los cortes realizados se identificaron a la edad de 1 mes, la médula, el xilema primario, la corteza (parénquima con espacios intercelulares) y la epidermis (figura 3a). A partir del estado de planta cotiledonar (2 meses) se observó un proceso de diferenciación especialmente en la zona de la corteza, con la aparición de dos tejidos: Un clorénquima adyacente al cinturón vascular, y la endodermis rodeando el clorénquima (Figura 3b). Posteriormente no aparecen nuevos tejidos pero sí maduración de los ya existentes no solo mediante un aumento en el número de células sino también mediante un cambio en la composición de las paredes celulares y se detecta una acumulación de

lignina y suberina en el xilema y en el parénquima cortical.

En el hipocotilo, esta maduración se lleva a cabo transversalmente de adentro hacia afuera y longitudinalmente de las partes baja y alta hacia la zona central. Las secciones deshidratadas no fueron aptas para los estudios de epifluorescencia debido a un aumento en autofluorescencia que impedía determinar alguna especificidad. Esto no ocurrió con los tejidos cortados en frío.

En cuanto al proceso de penetración, las observaciones episcópicas mostraron el crecimiento del micelio a lo largo del eje longitudinal del hipocotilo, sobre los bordes de las paredes de las células epidérmicas. En algunos lugares se observó la acumulación de hifas (Figura 4a), que es el evento previo a la formación de domos o cojines por parte de hifas modificadas; estos domos presentan engrosamiento y componen un tejido compacto que va aumentando en altura, más no en el área ocupada sobre la epidermis (Figura 4b). La formación de estos cojines puede ser múltiple a lo largo de la circunferencia del hipocotilo. Finalmente, se aprecia el debilitamiento de las paredes celulares de los tejidos ubicados bajo el cojín de infección y resulta difícil la detección de hifas de penetración dentro del parénquima. Aunque en este tipo de ataque parece primar la acción enzimática (posiblemente pectinasas y celulasas), cabe anotar que no se observan modificaciones a nivel de la capa de cutina de la epidermis, es decir, no hay acción de cutinasas, lo que coincide con lo descrito por Bateman (7).

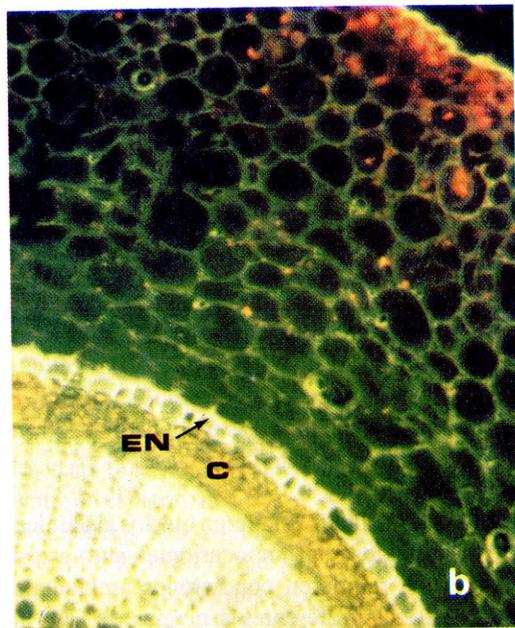
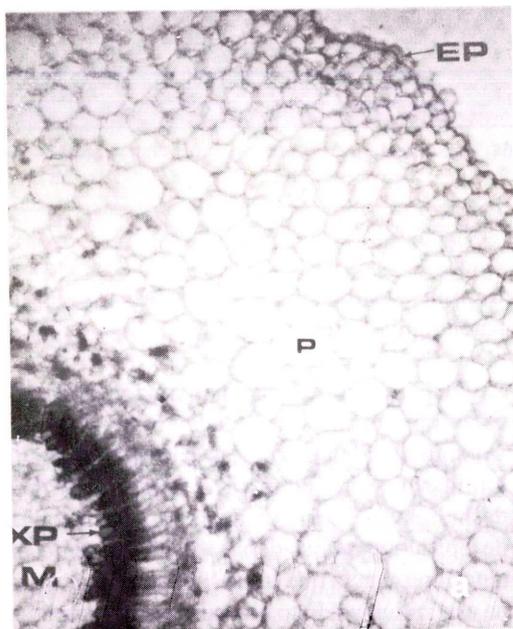


Figura 3. (a). Constitución histológica de hipocotilos de 3 meses de edad (Tinción con Floroglucinol HCl). (b). Definición de clorénquima y la endodermis (Iluminación con luz UV, 100X). m = médula, xp = xilema primario, p = peridermo, c = clorénquima, ed = endodermis y ep = epidermis.

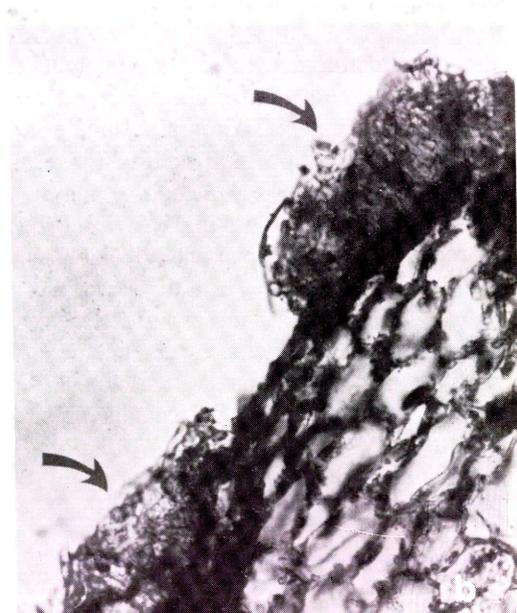


Figura 4. (a). Acumulación de hifas sobre células de la epidermis (Iluminación episcópica luz UV, 400X). (b). Cojines de infección de *R. solani* sobre hipocotilos de café; obsérvese el debilitamiento de las paredes celulares. (Anilina azul, 400X).

En hipocotilos que toleran el ataque, se desarrolla un tejido suberizado en el peridermo, de varias capas de grosor alrededor del punto de infección (Figura 5). El proceso infectivo tiene una duración aproximada de 5 días en las condiciones probadas. El conocimiento de los procesos de penetración del parásito es básico para los estudios de mecanismos de resistencia en el hospedante.

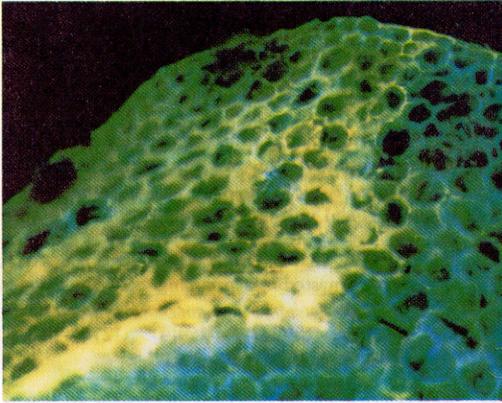


Figura 5. Formación de tejido suberizado en el peridermo de un hipocotilo que resistió al ataque de *R. solani*. (Iluminación luz UV).

Ensayos en suelo. Según el método de inoculación utilizado, la única cepa de referencia patogénica en café fue AG4. Esta cepa, junto con los aislamientos CENICAFE 042 y 043, fue evaluada en la prueba de patogenicidad. Los recuentos realizados en el laboratorio indicaron que, usualmente, cada mg de micelio, medido como peso fresco, proveniente del micelio ELD contiene 8×10^2 propágulos. Esto permite calcular un valor aproximado en propágulos/gramo de suelo que refleja la ED50. Los valores reales de la ED50 en suelo estéril pueden ser menores dado que se está asumiendo un 100% de supervivencia del inóculo. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Según los valores de la ED50, la cepa CENICAFE 042 es la más patogénica de las tres estudiadas. La ED100 indicaría la mínima concentración de inóculo que muy probablemente resulte en máxima incidencia y severidad en condiciones similares a las usadas durante estos experimentos. Estas concentraciones pueden ser usadas como guías para la evaluación de fungicidas o productos biológicos que ayuden al control de la enfermedad.

TABLA 3. Valores para la regresión lineal log (DOSIS + 1) vs Valor PROBIT, para la interacción en suelos de las cepas CENICAFE 042, 043 y cepa referencia AG4 con plántulas de *Coffea arabica* var. Colombia.

Cepa	A	B	r	Log ED50	ED50		ED100
					mg micelio	Propágulos	mg micelio
					100g suelo	mg suelo	100 g suelo
AG4	1,22	2,22	0,88	1,697	49,7	398	3116
CENICAFE 042	0,75	2,79	0,91	1,523	33,3	266	903
CENICAFE 043	0,85	2,09	0,89	1,978	95,1	760	7736

A= constante, B= pendiente, r= coeficiente de correlación.

LITERATURA CITADA

- ADAMS, G.C. Jr.; BUTLER, E.E. Environmental factors influencing the formation of basidia and basidiospores in *Thanatephorus cucumeris*. Phytopathology (Estados Unidos). 73:152-155. 1983b.
- AINSWORTH, G.C.; SPARROW, F.K.; SUSSMAN, A.S. The fungi, an advanced treatise. New York (Estados Unidos), Academic Press, 1973. 501 p. (V. IVB).

3. ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. Introductory mycology. 3ª Ed. New York (Estados Unidos) John Wiley & Sons, 1979. 632 p.
4. ALVARADO, J.A. Mal negro de los talluelos (Enfermedades del Café). El Café de El Salvador (El Salvador) 7(79):291-294. 1937.
5. BAKER, R. Inoculum potential. In: HORFALL, J.; COWLING, E. Eds. Plant disease. New York (Estados Unidos), Academic Press. Inc, 1978. 436 p.
6. BANDONI, R.J. Safranin O as a rapid nuclear stain for Fungi. Mycologia (Estados Unidos), 71(4):873-874. 1979.
7. BATEMAN, D.F. Pathogenesis and disease. In: PARMETER JR., Jr. *Rhizoctonia solani* Biology and Pathology. Berkeley (Estados Unidos), University of California Press, 1970. 225 p.
8. BUTLER, E.E.; BOLKAN, H. A medium for heterocaryon formation in *Rhizoctonia solani*. Phytopathology (Estados Unidos), 63(4):542-543. 1973.
9. CASTAÑO, J.J. Podredumbre del cuello radicular de plántulas de café en el semillero, causada por el hongo del género *Rhizoctonia*. Cenicafé (Colombia) 7(78): 192-197. 1956.
10. CASTRO, C.; DAVIS, J.R.; WIESE, M.V. Quantitative estimation of *Rhizoctonia solani* AG-3 in Soil. Phytopathology, (Estados Unidos), 78(10):1287-1292. 1988.
11. CHRISTOU, T. Penetration and host-parasite relationships of *Rhizoctonia solani* on the bean plant. Phytopathology (Estados Unidos) 52(5):381-389. 1962.
12. DEDECCA, D.M. Anatomia e desenvolvimento ontogenico de *Coffea arabica* L. var. Typica Cramer. Bragantia (Brasil) 16(22):315-366. 1957.
13. DODMAN, R.L.; BAKER, K.R.; WALKER, J.C. A detailed study of the different modes of penetration by *Rhizoctonia solani*. Phytopathology (Estados Unidos). 58(9):1271-1276. 1968.
14. ELLIS, J.J. Preserving fungus strains in sterile water. Mycologia (Estados Unidos), 71(5):1072-1075. 1979.
15. ESPINAL, L. Formaciones de vegetales de Colombia. Bogotá, (Colombia), Instituto Geográfico Agustín Codazzi, 1963. 126 p.
16. FINNEY, D. Statistical method in biological assay. 3ª. Ed. New York (Estados Unidos), Mac Millan Publishing Co., 1978. 508 p.
17. GAHAN, P.B. Plant histochemistry and cytochemistry; an introduction. Londres (Inglaterra), Academic Press, 1984. 301 p.
18. JOHANSEN, D.A. Plant microtechnique. New York (Estados Unidos), Mc. Graw-Hill Book Comp, 1940. 523 p.
19. KANGATHARANLINGAM, N.; CARSON, M.L. Technique to induce sporulation in *Thanatephorus cucumeris*. Plant Disease (Estados Unidos), 72(2):146-148. 1988.
20. KRONLAND, W.C.; STANGHELLINI, M.E. Clean slide technique for the observation of anastomosis and nuclear condition of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology (Estados Unidos), 78(6):820-822. 1988.
21. OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intra-specific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. Annual Review of Phytopathology. (Estados Unidos). 25:125-143. 1987.
22. PARMETER, J.R.Jr.; SHERWOOD, R.T.; PLATT, W.D. Anastomosis grouping between isolates of *Thanatephorus cucumeris*. Phytopathology (Estados Unidos), 59(9): 1270 - 1278. 1969.
23. PARMETER, J.R.Jr.; SNYDER, W.C.; REICHLER, R.E. Heterocaryosis and variability in plant-pathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology (Estados Unidos), 1:51-76. 1963.
24. STRETTON, H.M.; MCKENZIE, A.R.; BAKER, K.F.; FLENTJE, N.T. Formation of the basidial stage of some isolates of *Rhizoctonia*. Phytopathology (Estados Unidos), 54 (9): 1093 - 1095. 1964.
25. TU, C.C.; ROBERTS, D.A.; KIMBROUGH, J.W. Hyphal fusion, nuclear condition and perfect stages of three species of *Rhizoctonia*. Mycologia (Estados Unidos), 61(4):775-783. 1969.
26. TU, C.C.; KIMBROUGH, J.W. A rapid staining technique for *Rhizoctonia solani* and related fungi. Mycologia (Estados Unidos), 65(4):941-943. 1973.
27. VEST, G.; ANDERSON, N.A. Studies on heterocaryosis and virulence of *Rhizoctonia solani* isolates from Flax. Phytopathology (Estados Unidos), 58(6):802-807. 1968.
28. WHITNEY, H.S. Sporulation of *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) in the light and in the dark. Phytopathology (Estados Unidos), 54(7):874-975. 1964.