

ARTÍCULO TÉCNICO

María José Botero¹ y Germán Franco²

ABSTRACT

Identification and characterization of the leaf necrotic spot of blackberry (*Rubus glaucus*) in the municipality of Trujillo (Valle del Cauca, Colombia)

The blackberry crop in the Chuscales and Monteloro regions of the municipality of Trujillo (Valle del Cauca, Colombia) generates 100% of the familiar income. To improve productivity and income of these communities, a diagnostic and development of disease control practices project was undertaken on blackberry cropping systems during a two year period. Frequently, necrotic spots in the foliage were found that did not correspond to symptoms of previously described diseases for the crop; these spots coalesced to completely cover the foliar area resulting in leaf total necrosis. In addition, tissue disintegration was observed in the presence of high humidity. Under field conditions, a 30% incidence was found, though the effects on production were not evaluated. In the laboratory, using culture in selected media, biochemical tests and morphological identification, the presence of non-fluorescent *Pseudomonas* was determined in samples of blackberry leaves of different ages with necrotic lesions. Additionally, pathogenicity tests were performed in greenhouse and laboratory, using a bacterial at 10^8 bacterium/mL and sterile distilled water as control, that reproduced the lesions found in the field and allowed re-isolation of the bacterium.

Key words: foliar diseases, *Pseudomonas*, high Andean fruits species.

Identificación y caracterización preliminar del agente causal de la mancha necrótica de las hojas de la mora (*Rubus glaucus*) en el municipio de Trujillo (Valle del Cauca, Colombia)

RESUMEN

El cultivo de la mora en las veredas Chuscales y Monteloro del municipio de Trujillo (Valle del Cauca) genera el 100% de los ingresos familiares. Con el objeto de mejorar la productividad y beneficiar la economía de estas comunidades, a lo largo de dos años se llevó a cabo un proyecto de diagnóstico y desarrollo de prácticas agronómicas y manejo sanitario, en arreglos agroforestales en el cultivo de la mora. Con frecuencia se hallaron manchas necróticas en el follaje que no correspondían a síntomas de enfermedades descritas previamente; éstas coalescían hasta cubrir totalmente el área foliar y necrosar la hoja; además, se observó desintegración de los tejidos en presencia de alta humedad. En campo se encontró una incidencia del 30% aunque no se evaluaron los efectos sobre la producción. En laboratorio, mediante cultivo en medios selectivos, pruebas bioquímicas e identificación morfológica, se determinó la presencia de *Pseudomonas* no fluorescentes procedentes de muestras de hojas de mora de diferentes edades con lesiones necróticas. Así mismo, se realizaron pruebas de patogenicidad en invernadero y laboratorio utilizando una concentración de 10^8 bacterias/mL y agua destilada estéril para los testigos, procedimiento que logró reproducir las lesiones encontradas en campo y que permitió reaislar de nuevo la bacteria.

Palabras clave: enfermedades foliares, *Pseudomonas*, frutales altoandinos.

INTRODUCCIÓN

DESDE LA DÉCADA DE 1990 el cultivo de la mora (*Rubus glaucus*) ha adquirido gran importancia por la demanda de la fruta, los precios que alcanza en los mercados, su gran aceptación en la agroindustria y el incremento del consumo en fresco. Además, por ser un cultivo que se adapta bien al clima frío moderado, la mora se convierte en una alternativa económica y social para aquellas zonas de ladera marginales demasiado altas para producir café y para predios de economía campesina y minifundios (CORPOICA, 1997).

La mora primordialmente es cultivada por pequeños y medianos productores. Se reporta que en el año 2001, Colombia tenía un área sembrada de 8.000 ha de mora, con una producción total de 67.000 toneladas y un precio promedio de \$950 por kg (MINAGRICULTURA, 2002). En el Valle del Cauca existen alrededor de 1.000 ha sembradas en 23 municipios con rendimientos promedio de $3,9 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ (URPA, 2001).

Dentro de la problemática fitosanitaria del cultivo se destaca el Moho gris de los frutos causado por el hongo *Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr. una enfermedad limitante

en las diferentes zonas productoras de mora en Colombia (Forero, 1993; Cadavid y Rivas, 1994; Arias, 1995; Castro *et al.*, 1995; Rondón, 1998). También tienen incidencia significativa sobre los rendimientos la Antracnosis (*Colletotrichum* sp.), el Mildeo vellosa (*Peronospora* sp.), el Mildeo polvoso (*Oidium* sp.) y la Roya (*Gerwasia* sp.) (Tamayo, 1995, 2000).

Dentro del proyecto 'Sistemas Agroforestales en el Cultivo de la Mora en la Microcuenca Chuscales y Playa Alta del Municipio de Trujillo dirigido a Pequeños Productores' realizado por la Unidad Local Eje Cafetero de CORPOICA y la Fundación Smurfit Cartón de Colombia en los años 2003 y 2004, se hizo un reconocimiento de enfermedades en el cultivo encontrándose con frecuencia una sintomatología en hojas consistente en manchas necróticas que no correspondían a otras enfermedades descritas en la mora. La enfermedad se manifestaba inicialmente mediante la aparición de pequeñas manchas oscuras que luego coalescían llegando a cubrir toda el área foliar y produciendo necrosis total; adicionalmente, se observó desintegración de los tejidos en presencia de alta humedad. En campo se encontró una inci-

Recibido: septiembre 19 de 2007
Aceptado: diciembre 7 de 2007

1. Investigadora master asistente, Unidad Local Eje Cafetero (Manizales), CORPOICA, e-mail: mjbotoero24@hotmail.com
2. Investigador especialista asistente, Centro de Investigación La Selva, Rionegro (Antioquia), CORPOICA, e-mail: gfranco@corpoica.org.co

dencia estimada del 30%. En el mes de marzo de 2005 se detectó la misma sintomatología en cultivos de mora ubicados en la vereda La María del municipio de Palmira (Valle del Cauca).

En el área de estudio, las veredas Monteloro y Chuscales del municipio de Trujillo (Valle), existen cerca de 100 ha de mora cultivadas por agricultores de economía campesina, actividad de la cual esta comunidad deriva el 100% de sus ingresos; los cultivos presentaban bajo nivel tecnológico, rendimientos de 3,6 t·ha⁻¹ y se ubicaban en zonas de amortiguación.

El presente estudio tuvo como objetivo principal identificar y caracterizar el agente causal de la Mancha necrótica de las hojas de mora, tal como se manifestaba en cultivos de las veredas Chuscales y Monteloro del municipio de Trujillo (Valle del Cauca).

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se inició con la ubicación y recolección de material foliar afectado que presentara los síntomas descritos anteriormente. El material enfermo se recolectó en las fincas El Caracol, La Eliana, El Barragancito y La Loma, localizadas en la vereda Chuscales, y en la finca La Camelia de la vereda Monteloro en el municipio de Trujillo. Los predios están localizados a una altura de 2.300 m.s.n.m., con una temperatura promedio de 12°C, precipitación anual superior a 2.000 mm; según georreferenciación, los cultivos se ubican entre las coordenadas 4° 11' 21" de latitud norte, 76° 26' 21" de longitud oeste y 4° 13' 57" de latitud norte, 76° 23' 35" de longitud oeste.

La identificación del patógeno tuvo lugar en el Laboratorio de Fitopatología de la Unidad Local Eje Cafetero de CORPOICA en Manizales. El reconocimiento del agente causal de la enfermedad bacteriana en el campo se efectuó en los meses de diciembre de 2003 y enero de 2004 con muestras pocedentes de 23 predios productores de mora cuyos cultivos fueron inspeccionados. El estimativo de incidencia de la enfermedad en lotes se obtuvo de plantas tomadas al azar dentro de cultivos sintomáticos sin cuantificar la población de planta afectadas por lote.

El material utilizado para el aislamiento del patógeno consistió en hojas de plantas de mora de Castilla (*Rubus glaucus*) que presentaban síntomas característicos de la enfermedad. Así, de las plantas afectadas por la enfermedad en los lotes se tomaron hojas que se empacaron en bolsas plásticas nuevas y se rotularon (municipio, finca, ubicación y fecha). Una vez tomadas las muestras, se almacenaron en nevera isotérmica y se transportaron al Laboratorio de Fitopatología de CORPOICA en Manizales (Caldas) donde se describieron y registraron los síntomas. Para la caracterización del patógeno se procedió a determinar las características culturales, morfológicas y bioquímicas de los aislamientos.

Una parte de las hojas enfermas se guardó como material de reserva en bolsas selladas refrigeradas a una temperatura de 4°C por 15 días.

Las muestras de hojas con las lesiones foliares se colocaron en cámara húmeda para acentuar los síntomas; transcurridos cuatro días las lesiones se tornaron aceitosas y con presencia de exudado. En el laboratorio se realizó una prueba simple de flujo bacterial para diagnosticar la presencia de bacterias; ésta consistió en realizar finos cortes longitudinales a través de las lesiones colocando las tiras de tejido foliar en un tubo de ensayo con agua limpia para observar, al cabo de unos minutos, la formación de un hilo continuo de aspecto lechoso.

Posteriormente se aplicaron técnicas microbiológicas comunes para identificar a las bacterias (Schaad, 1980; Fahy y Persley, 1983; Koneman, 1983; Oxoid, 1981; Merck, 1985; Goto, 1992). A tal fin se seccionaron las hojas en porciones pequeñas (1 a 2 mm²) siguiendo el procedimiento descrito por French, Teddy y Herbert (1980) y por Agrios (1995), según el cual las muestras se colocan en hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto y luego se enjuagan dos veces con agua destilada estéril; las pequeñas porciones maceradas en agua estéril se sembraron en agar nutritivo (AN) y se incubaron a 24°C. Las colonias que crecieron se separaron, purificaron y sembraron mediante técnicas convencionales; una vez purificadas en AN, a las colonias con 24 horas de crecimiento y provenientes de muestras con

síntomas de manchas necróticas y aceitosas, se les determinaron las características culturales (forma, opacidad, superficie, bordes, color y pigmento de las colonias) en agar Cetrimide, agar MacConkey, agar King-B (KB), agar P y agar F.

También se establecieron las características morfológicas de las bacterias a través de la reacción de Gram y su confirmación mediante solubilidad en KOH (3%); así mismo, se observó bajo microscopio la forma de las bacterias. En todos los casos las cajas de Petri se incubaron a una temperatura entre 24 y 26°C durante 96 h.

Las pruebas bioquímicas realizadas fueron: oxidasa, catalasa, fermentación de carbohidratos en agar triple azúcar-hierro (TSI), prueba de oxidación-fermentación (O-F) en el medio Hugh y Leifson (OF), prueba de indol - movilidad - ácido sulfhídrico (SIM) y licuación de la gelatina.

Una vez purificadas, las cepas con 72 horas de crecimiento provenientes de muestras foliares que presentaron manchas necróticas y aceitosas se usaron para realizar las pruebas de patogenicidad. La comprobación de la patogenicidad de la bacteria aislada se hizo por medio de inoculaciones en material foliar sano, tanto en laboratorio como en invernadero. En el primer caso se usaron hojas, las cuales se dejaron en cámaras húmedas, con servilleta de papel, algodón estéril y 1 mL de agua destilada, para generar humedad a temperatura ambiente. En el segundo caso se emplearon plántulas de mora de tres meses de edad las cuales fueron inoculadas, inyectando en cada lóbulo de la hoja 0,05 mL (50 microlitros) de la suspensión bacteriana. Se dejaron los correspondientes testigos, los cuales fueron sometidos al mismo tratamiento pero usando agua destilada estéril. Las inoculaciones se realizaron empleando una suspensión de 1 x 10⁸ bacterias/mL, la cual se cuantificó con la escala de opacidad de McFarland (Sánchez, 1989). Luego de constatar los síntomas de la enfermedad se procedió a reaislar el patógeno y a compararlo con los aislamientos originales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La incidencia promedio de la enfermedad en las veredas Chuscales y Monteloro del

municipio de Trujillo (Valle del Cauca), asumida como el número de predios con cultivos de mora afectados por la mancha necrótica de las hojas, fue de 30% (Tabla 1).

Comprobación de la sintomatología foliar

Bajo condiciones de campo la enfermedad se manifestó especialmente en las hojas del tercio inferior de las plantas de mora mediante el surgimiento de manchas necróticas de color café oscuro con apariencia aceitosa. Las lesiones iniciaron como manchas pequeñas de color castaño que se van agrandando hasta coalescer y comprometer gran parte del área foliar de la hoja (Figura 1a). En las plantas inoculadas en laboratorio y en invernadero también se presentaron manchas necróticas de color café que, en presencia de alta humedad, provocaron la desintegración de los tejidos.

En la prueba de flujo bacterial, cuando se colocaron porciones de hojas afectadas en agua limpia y se presionaron suavemente, al cabo de unos minutos se pudo observar la producción de un exudado blanquecino. El período de incubación fue de cuatro días en laboratorio y de cinco días en invernadero.

Identificación del agente causal en hojas de mora

Considerando que el objetivo principal de este trabajo fue identificar y caracterizar la bacteria presuntamente relacionada con la enfermedad en el cultivo de mora, en el laboratorio se realizaron cultivos en medios selectivos, pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas estándar.

Al sembrar en agar nutritivo (AN) secciones de hoja procedentes de un cultivo de mora que presentaban manchas necróticas y aceitosas, después de 96 h de crecimiento se obtuvieron colonias cremosas, mucosas y de bordes bien definidos típicas de *Pseudomonas* (Figura 1b). Además, se observaron al microscopio con objetivo de inmersión (100X) bacilos Gram negativos con coloración rosada; característicamente las bacterias de este género se presentan individualmente y no forman agregados, lo cual puede verse en la Figura 1c.

Al analizar los resultados de las pruebas de laboratorio aplicadas a una colonia

de bacterias procedente del aislamiento en estudio, se concluyó que es una bacteria patógena del grupo de las *Pseudomonas* no fluorescentes, es decir, que no produce pigmentos difusibles en los medios selectivos. En la Tabla 2 se resume la batería de pruebas empleadas para la identifica-

ción del agente causal de la enfermedad. Es importante señalar que las pruebas culturales, morfológicas y bioquímicas llevadas a cabo para la caracterización de *Pseudomonas* sp. aislada de hojas de mora, se realizaron en el primer aislamiento del patógeno y, posteriormente, en el reaisla-

Tabla 1. Incidencia de la mancha necrótica de la hoja de mora en el municipio de Trujillo (Valle del Cauca).

Vereda	Finca	Incidencia %
Chuscales	El Caracol	50
Chuscales	La Eliana	20
Chuscales	Barragancito	20
Chuscales	La Loma	30
Monteloro	La Camelia	30

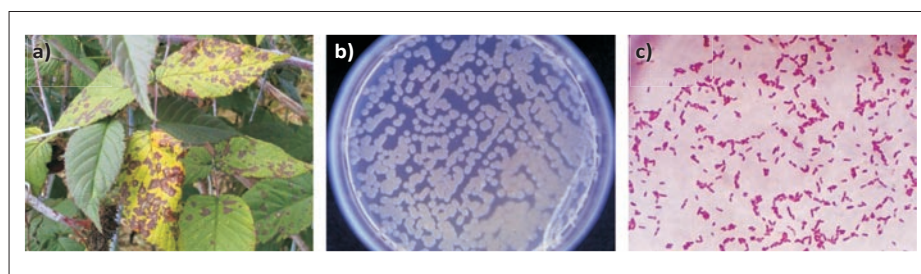


Figura 1. Identificación del agente causante de la mancha necrótica de las hojas de mora: a) hojas con lesiones típicas de aspecto necrótico y aceitoso; b) cultivo de agar nutritivo con colonias cremosas y mucosas de 96 h de crecimiento consistente con bacterias del género *Pseudomonas*; c) bacilos Gram negativos característicos de *Pseudomonas* (100X).

Tabla 2. Resultados de las pruebas culturales, morfológicas y bioquímicas realizadas para la caracterización de *Pseudomonas* sp. aislada de hojas de mora afectadas por mancha necrótica.

Prueba	Resultado
Características culturales	
Crecimiento en agar Cetrimide	Colonias cremosas sin fluorescencia.
Fluorescencia en agar P para <i>Pseudomonas</i>	Colonias de superficie lisa sin fluorescencia
Fluorescencia en agar F para <i>Pseudomonas</i>	Colonias de superficie lisa sin fluorescencia
Fluorescencia en King – B	Colonias de bordes enteros sin fluorescencia
Crecimiento en agar Mac Conkey	Colonias mucosas de color rosado claro
Características morfológicas	
Gram	–
Reconfirmación del Gram con KOH al 3%	+
Forma	Bacilo
Características bioquímicas	
Oxidasa	+
Catalasa	+
Agar triple azúcar-hierro (TSI)	K/K (alcalino/alcalino)
Crecimiento en oxidación-fermentación O-F (medio Hugh-Leifson)	Metabolismo oxidativo
Indol	–
Movilidad	+
Ácido sulfhídrico	–
Licuefacción de la gelatina	+

miento efectuado después de realizadas las pruebas de patogenicidad.

Mediante la comprobación de la relación íntima de *Pseudomonas* sp. con las plantas afectadas por la Mancha necrótica, el aislamiento en cultivo puro, su posterior inoculación en cámaras húmedas y en plántulas sanas, la reproducción de la sintomatología característica de la enfermedad y, finalmente, el reaislamiento del mismo patógeno en cultivo puro, es posible afirmar que *Pseudomas* sp. es el agente causal de la mancha necrótica de las hojas de mora en el entorno geográfico mencionado, cumpliéndose de esta forma con los cuatro postulados de Koch.

En la literatura fitopatológica consultada no se encontraron referencias sobre la enfermedad descrita con relación al género bacterial identificado, razón por la cual éste se considera como un reporte preliminar de esta enfermedad en plantas de mora (*Rubus glaucus*).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las pruebas culturales, morfológicas y bioquímicas realizadas al agente causal de la Mancha necrótica permitieron caracterizar e identificar el patógeno como una bacteria del género *Pseudomonas*. Por su parte, los síntomas observados en condiciones de campo fueron reproducidos mediante las pruebas de patogenicidad en laboratorio y en invernadero.

Las pruebas realizadas en este trabajo se deben complementar con estudios específicos de tipo microbiológico y molecular para determinar la especie del patógeno. Así mismo, con el objeto de instaurar un esquema de manejo integrado de esta entidad patológica, se recomienda determinar la forma de transmisión de *Pseudomonas* en los cultivos de mora. Así mismo, se deben hacer estudios de sobrevivencia de *Pseudomonas* en el suelo y residuos de cosecha con el fin de determinar su ciclo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a la Dra. Beatriz Eugenia Mejía, Directora Ejecutiva de la Fundación Smurfit Car-

tón de Colombia por la cofinanciación del proyecto; al Dr. Roberto Duque, Jefe de Protección Forestal de Smurfit Cartón de Colombia por su apoyo técnico, lo cual le permitió a CORPOICA llevar a cabo acciones de investigación en sistemas agroforestales para el cultivo de la mora. Así mismo, al Dr. Héctor Fabio Ospina del Programa de Apoyos Básicos y Divulgación de CENICAFÉ; a la Dra. Patricia Eugenia Vélez del laboratorio de Hongos del Trópico de CENICAFÉ; al Dr. Juan Jaramillo, Gerente del Plan de Frutales de CORPOICA en el C.I. Palmira y al Dr. Jorge Arturo Aristizábal, exdirector de la U.L. Eje Cafetero de CORPOICA en Manizales. Al Dr. José Luis Zapata, investigador del C.I. La Selva. Finalmente debemos reconocer el apoyo invaluable recibido de los productores de mora de las veredas Chuscales y Monteloro en el municipio de Trujillo (Valle del Cauca).

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Agrios, G.N. 1995. Enfermedades de las plantas causadas por Procariontes. En: Fitopatología. 2ª ed. Limusa, S.A. de C.V. México D.F. pp. 531-600.
- Arias, J.H. 1995. Producción y manejo de la Mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) en el Oriente Antioqueño. Boletín Actualidades Corpoica, No. 100. pp. 15-20.
- Cadavid, M.E. y L.D. Rivas. 1994. Determinación del área cultivada y volumen de producción en Mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) y su manejo en el Oriente cercano de Antioquia. Universidad Católica de Oriente. Rionegro (Antioquia). Tesis de grado. Tecnología Agropecuaria. 86 p.
- Castro, D., C. Márquez, O. Restrepo y G. Vélez. 1995. Evaluación del estado fitosanitario del cultivo de la Mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) en el Oriente Antioqueño. Universidad Católica de Oriente. Serie investigaciones, No. 7. Fundación de Fomento Agropecuario Buen Pastor. 15 p.
- CORPOICA. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. 1997. Transferencia de tecnología para el sistema mora dirigido a productores y asistentes técnicos de los departamentos de Caldas, Quindío y Risaralda. Manizales (Mimeografiado). pp. 1-6.
- Fahy, P.C. y G.J. Persley. 1983. Plant bacterial diseases: a diagnostic guide. Academic Press. Sydney (Australia). 222 p.
- Forero, C. 1993. Enfermedades de importancia económica en Mora de Castilla (*Rubus glaucus* L.). pp. 101. En: Resúmenes XIV Congreso Ascolfi. Fitopatología en el trópico. Santa Marta, Colombia. Agosto 25-27 de 1993. 122 p.

French, E., R. Teddy y T. Herbert. 1980. Métodos de investigación fitopatológica y aislamiento de fitopatógenos. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José (Costa Rica). pp. 142-186.

URPA. Unidad Regional de Planificación Agropecuaria. 2001. Gobernación del Valle del Cauca, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Estadísticas sobre frutales del Valle del Cauca. Cali. 187 p.

Goto, M. 1992. Fundamentals of bacterial plant pathology. Academic Press. Sydney, Tokyo, Toronto. pp. 307-308.

Koneman, E. 1983. Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. pp. 34-59.

Merck, E. 1985. Manual de medios de cultivos. Berlín (Alemania). 189 p.

MINAGRICULTURA - Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2002. Estadísticas de frutas y hortalizas 2000. Bogotá. 258 p.

Oxoid, L. 1981. Manual de medios de cultivo Oxoid. 4ª ed. Londres (Inglaterra). pp. 180-181.

Rondón, G. 1998. Moho gris (*Botrytis cinerea*) en mora: una visión sobre su manejo integrado en Colombia. pp 53-57. En: Memorias Segundo Seminario de Frutales de Clima Frío Moderado. Agosto 12-14. Medellín. 320 p.

Sánchez, M.P. 1989. Manual de procedimientos en bacteriología clínica. Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá. 173 p.

Schaad, N.W. 1980. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Department of plant pathology. University of Georgia. St Paul (Minnesota). pp. 1-48.

Tamayo, P.J. 1995. Muerte descendente de ramas y mildew veloso de la mora en Antioquia. Ascolfi Informa 21 (6): 72-73.

Tamayo, P. J. y A. Peláez. 2000. Caracterización de daños y pérdidas causadas por enfermedades de fruto de la Mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) en Antioquia. En: Memorias Tercer Seminario de Frutales de Clima Frío. Noviembre 15-17. Manizales. pp 174-179.