

ESTUDIO DE LA INCIDENCIA DE INFECCIONES QUIESCENTES DE *Colletotrichum* spp., EN FLORES Y FRUTOS DE MORA (*Rubus glaucus* Benth)

Impact study of infection quiescent *Colletotrichum* spp., flowers and fruits blackberry (*Rubus glaucus* Benth)

Andrea Abella Montaña¹, Erika Martínez Lemus².

¹ Ingeniera Agrónoma, Universidad de Cundinamarca.

² Bacterióloga, MSc. Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana.

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la presencia de *Colletotrichum* spp., en estado quiescente de flores y frutos de mora (*Rubus glaucus* Benth). Para ello, se realizaron colectas de flores y frutos asintomáticos de cultivos en etapa productiva de los departamentos de Cundinamarca, Santander y Antioquia, las cuales fueron procesadas y colocadas en cámaras húmedas con el fin de detectar infecciones quiescentes mediante la formación de acérvulos. Al cabo de ocho y 15 días (estados IV, V, VI; y I, II, III respectivamente) se identificaron los primeros síntomas de antracnosis y signos característicos del patógeno en todas las estructuras. Sin embargo, estadísticamente se observaron diferencias significativas en la incidencia de infecciones quiescentes en los seis estados fenológicos del botón floral de mora; además, se evidenció mayor presencia de la enfermedad en los dos primeros estados.

Se estableció una colección de estudio la cual se conformó con 63 aislamientos de *Colletotrichum* spp., obtenidos a partir de la siembra de acérvulos presentes en cada uno de los órganos. A cada colonia se le realizaron pruebas de identificación con medios selectivos para diferenciar entre especies de *Colletotrichum*; y posteriormente su respectiva caracterización morfológica a nivel macroscópico y microscópico, obteniendo como resultado la identificación de 61 aislamientos, los cuales posiblemente pertenecen al complejo de especies de *Colletotrichum acutatum* y dos a la especie *Colletotrichum gloeosporioides*.

La patogenicidad de los aislamientos seleccionados se evaluó inoculando discos de agar sobre los seis estados fenológicos del botón floral de mora, demostrando que todos los aislamientos causaron infección en esas estructuras; sin embargo, el aislamiento C4EF: V presentó mayor colonización de

acérvulos y por ende, necrosis del tejido con mayor rapidez con respecto a los demás tratamientos.

Palabras claves: *antracnosis, latencia, enfermedad.*

ABSTRACT

This research aimed to determine the presence of *Colletotrichum* spp., quiescent flower and fruit of blackberry (*Rubus glaucus* Benth). To do this, asymptomatic collections of flowers and fruits of crops in productive stage of Cundinamarca, Santander and Antioquia, which were processed and placed in humid chambers in order to detect quiescent infections by forming acervuli were made. After eight and 15 days (states IV, V, VI, and I, II, III respectively) the first symptoms of anthracnose and characteristic signs of the pathogen in all the structures were identified. However, statistically significant differences were observed in the incidence of quiescent infections in six growth stages of flower bud blackberry; also greater presence of the disease is evident in the first two states.

A collection of study which was made up of 63 isolates was established *Colletotrichum* spp., obtained from planting acervuli present in each of the bodies. Each colony was subjected to tests with selective identification to differentiate between species of *Colletotrichum* means; and subsequently to their respective morphological characterization macroscopic and microscopic level, resulting in the

identification of 61 isolates, which possibly belong to species complex *Colletotrichum acutatum* and two to the species *Colletotrichum gloeosporioides*.

The pathogenicity of selected isolates was evaluated by inoculating agar plates on the six phenological stages blackberry flower bud, demonstrating that all isolates caused infection in these structures; however, the isolation C4EF: V showed higher colonization of acervuli and thus tissue necrosis faster relative to other treatments.

Key words: *anthracnose, latency, disease.*

INTRODUCCIÓN

Los frutales tropicales se perfilan como una de las mejores opciones en la agricultura Colombiana por el crecimiento de la demanda a nivel nacional e internacional; la cual es suplida en la actualidad por importaciones. La especie *Rubus glaucus* Benth, conocida comúnmente como mora de castilla, ha sido identificada como uno de los frutales con mayor potencial de desarrollo en la zona andina colombiana (Marulanda *et al.*, 2007). Las estadísticas para 2011, reportadas por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, registraron una producción nacional de 94.303 t, procedentes de 11.673 hectáreas, cifras que, según proyecciones del Plan Frutícola Nacional para el 2026, presentarán un incremento equivalente a 20.631 ha, esto significa mayores oportunidades para los pequeños y medianos productores que abastecen el consumo tanto

en fresco como para la industria, ya que este incremento le permite al cultivo de mora constituirse como una alternativa agrícola rentable frente a otros cultivos del mismo piso térmico (Ayala *et al.*, 2013; Forero de la Rotta *et al.*, 2002).

En los últimos años el cultivo de la mora ha presentado numerosos problemas fitosanitarios, entre las más importantes se encuentra la antracnosis (*Colletotrichum* spp.), moho gris (*Botrytis cinerea*), mildew veloso (*Peronospora* spp.) y mildew polvoso (*Oidium* spp.). La antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum* spp., ha sido considerado como uno de los principales patógenos que ataca las plantaciones de frutales durante prefloración, y la enfermedad permanece asintomática hasta que el grado de maduración del fruto es tal, que el patógeno realiza una invasión intercelular y la enfermedad se expresa, conociéndose dicho fenómeno como infección quiescente (Montoya y Vargas, 2002); aunque no se reporta como la principal limitante en la producción del cultivo de mora, cada vez está cobrando mayor interés en el campo fitopatológico debido a que presenta incidencias superiores al 52%, severidad estimada del 25% y abandono de cultivos (Saldarriaga, 2007); siendo los tallos, brotes tiernos, inflorescencias, frutos en formación y en estados avanzados de desarrollo las partes más afectadas (Femenia, 2007).

La enfermedad causada por las diferentes especies del género *Colletotrichum* (*C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. boninense*)

(Saldarriaga, 2011), se manifiesta por la aparición de manchas oscuras en hojas y frutos, con formas redondeadas u ovaladas, con tamaños variables que pueden oscilar entre un diámetro de 1 o 2 mm hasta 5 cm; en algunas ocasiones, las lesiones se presentan ligeramente sumidas o poseen un contorno levemente elevado. En general, las lesiones producidas por la antracnosis se presentan con tonalidades negras o marrones; en otras ocasiones, las infecciones aparecen con coloraciones que van del rojo ladrillo al púrpura, y posteriormente cambian a coloraciones pardas oscuras, hasta adquirir tonalidades muy negras; por ende, el nombre de antracnosis hace alusión al aspecto visual de las manchas (Femenia, 2007).

Reportes indican que esta enfermedad ha ocasionado pérdidas entre 53% y 70% en cultivos de mora en Colombia (Marulanda *et al.*, 2007), 50% y 70% en tallos y un 5% en frutos tanto en precosecha como en postcosecha (Saldarriaga, 2007).

El presente trabajo tiene como propósito estudiar la incidencia de infecciones quiescentes de *Colletotrichum* spp., en flores y frutos de mora (*Rubus glaucus* Benth), como fuentes de inóculo que debe tenerse en cuenta para diseñar estrategias de manejo eficaces para el manejo preventivo de la antracnosis en mora.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Fitopatología de CORPOICA, Tibaitatá; ubicado en el municipio de

Mosquera (Cundinamarca), km 14 vía Bogotá, entre los meses de febrero y diciembre de 2014.

Colecta de material vegetal

La colecta del material vegetal en los diferentes estados fenológicos del botón floral de mora se realizó con base en la caracterización establecida por Forero de la Rotta (2004). Allí se identificaron seis estados fenológicos: I = botón floral cerrado; II = pétalo recto (inicio de apertura floral); III = flor abierta; IV = fruto en formación; V = fruto en desarrollo (frutos aún verdes); VI = fruto maduro (figura 1).



Figura 1. Clasificación de los seis estados fenológicos del botón floral de Mora (*Rubus glaucus* Benth)
Fuente: Forero de la Rotta (2004)

Se colectaron 10 unidades al azar por cada estado fenológico de plantas asintomáticas y aparentemente sanas, es decir, 60 unidades por finca, para un total de 50 fincas visitadas en la zona rural de los departamentos de Cundinamarca, Antioquia y Santander.

Desinfección del material vegetal

Las flores y frutos seleccionados se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% por un minuto, luego con alcohol al 70% por cinco minutos y por último se lavaron dos veces con agua destilada estéril. Se

colocaron sobre hojas de papel kraft permitiendo el secado para su posterior montaje.

Detección de infecciones quiescentes en flores y frutos asintomáticos de mora

Para determinar la presencia de infecciones quiescentes, las flores y frutos dispuestos en las cámaras húmedas, una vez incubados por ocho días para los estados fenológicos IV, V y VI y 15 días para los estados I, II y III, se realizaron observaciones a simple vista y con ayuda del estereoscopio.

Posteriormente, se realizó la siembra de los acérvulos presentes en el tejido vegetal de cada uno de los estados fenológicos con ayuda de una aguja de disección tomando una porción de masa de conidias y sembrando en cajas Petri con medio PDA (Papa-Dextrosa-Agar), por último, se llevaron a incubadora a 28°C durante 15 días en oscuridad.

Identificación de especies de *Colletotrichum* spp., mediante medios selectivos

Para determinar cual de los patógenos (*C. gloeosporioides* o *C. acutatum*) puede ser el agente etiológico de las infecciones quiescentes tanto en flores como frutos de mora, se realizaron pruebas preliminares de identificación con dos medios diferentes: un medio a base de Hidróxido de Cobre y el otro de Benomyl, las cuales permiten diferenciar especies de *Colletotrichum* de acuerdo a su

crecimiento y morfología en cada medio de cultivo.

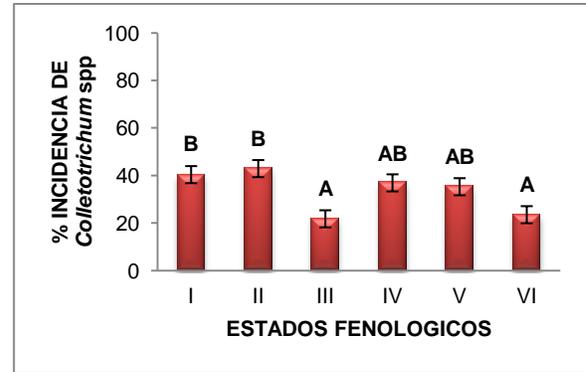
Prueba de patogenicidad sobre flores y frutos de mora

Con el propósito de comprobar si los hongos aislados se encontraban en estado patogénico se realizó un ensayo bajo un diseño de bloques completos no aleatorizados (DBC) sobre los seis estados fenológicos del botón floral de la mora, el cual consistió de siete tratamientos y un testigo, cada uno con tres repeticiones, para un total de 24 unidades experimentales por cada estado fenológico, las cuales se ubicaron en una cámara húmeda y se inocularon con disco de agar de 3mm de diámetro con micelio del hongo.

RESULTADOS

Incidencia de infecciones quiescentes en los seis estados fenológicos del botón floral de mora

De acuerdo con la metodología que se empleó en el muestreo y el registro de los datos, se realizó inicialmente una prueba de normalidad, lo cual permitió confirmar que según la distribución que presentaron los datos se rechazaba la hipótesis de normalidad de las muestras, ya que son de distribución libre. Por lo tanto, para obtener los resultados de la frecuencia de incidencia de infecciones quiescentes en los seis estados fenológicos del botón floral, fue necesario utilizar métodos estadísticos no paramétricos, en este caso, la prueba de Kruskal-Wallis.



Grafica 1. Porcentaje de infecciones quiescentes causada por *Colletotrichum* spp en los seis estados fenológicos del botón floral de mora.

Estadísticamente se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la incidencia de infecciones quiescentes causadas por *Colletotrichum* spp., entre los seis estados fenológicos del botón floral de mora (grafica 1). Además, biológicamente se evidenció mayor presencia de la enfermedad en los primeros estados. Estos resultados confirman la presencia de infecciones quiescentes causadas por *Colletotrichum* spp., en flores y frutos aparentemente sanos, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Saldarriaga (2011) indicando que la antracnosis se encuentra afectando en un 5% a frutos en pre y poscosecha.

El estado de quiescencia producida por el género *Colletotrichum* puede cambiar la estrategia de infección cuando coloniza diferentes tejidos hospederos, posiblemente se debe a que la morfología de los diferentes órganos, en este caso, las estructuras de los seis estados fenológicos presentan pequeñas modificaciones de un estado a otro obteniendo como resultado una variación en la incidencia de la enfermedad. Lo anterior,

probablemente coincide con Peres *et al.*, (2005), donde describió cuatro tipos de interacciones de infección que presenta *C. acutatum*: a) un predominante ciclo biotrófico de la enfermedad en hojas de cítricos; b) un ciclo necrotrófico de la enfermedad en fresa; c) una interacción hemibiotrófica que comprende la combinación principalmente de la fase biotrófica y ciclos necrotróficos de la enfermedad en frutas de arándanos; y d) una interacción hemibiotrófica con combinaciones de fase biotrófica y principalmente ciclos necrotróficos de la enfermedad en hojas y frutas de almendro. Lo anterior indica que diferentes tejidos de la planta en un hospedero dado pueden responder de manera diferente a los microorganismos invasores (Prusky *et al.*, 2013).

A nivel morfológico, los seis estados del botón floral exhiben diferentes estructuras en cada una de las etapas de desarrollo; como se observa en la gráfica, la preferencia del patógeno por establecer una relación quiescente se observa con mayor incidencia en los dos primeros estados donde las estructuras expuestas son: receptáculo floral y cáliz (figura 10), posiblemente se atribuye esta respuesta a que en botón floral cerrado y pétalo recto los sépalos permanecen aún verdes presentando un sustrato favorable para la presencia de un hongo como *Colletotrichum*, posiblemente a que entre más joven es el tejido, éste es más susceptible al ataque y posterior infección.

La disminución de la enfermedad en el estado III que corresponde a flor abierta,

posiblemente se debe a varios factores, entre los que se destaca: la pérdida de pétalos en el momento de la recolección y en el proceso de desinfección pudo haber generado una lectura errónea acerca de la presencia de la infección, ya que según un estudio en cítricos, en estado de flor la presencia de la enfermedad se evidencia en los pétalos generando necrosamiento del tejido y coloración café rojizo (INIFAP, 2006; Ulloa, 2008); síntomas similares se presentan en las inflorescencias del cultivo de mango, ocasionando secamiento desde la punta hacia la base adquiriendo un color oscuro y posterior defoliación (Galán, 1999); con base en lo anterior, la ausencia de estas estructuras en la mayoría de las flores colectadas no permitió evidenciar la presencia de la enfermedad, ya que en las demás estructuras como el cáliz o los carpelos, no se presentaron acérvulos ni pérdida del tejido. Otro factor que pudo determinar este comportamiento se relaciona con la presencia de jasmonatos y otros metabolitos secundarios, cuyos niveles se incrementan rápidamente en respuesta a perturbaciones mecánicas, ataques de insectos, o en este caso, infecciones por patógenos, ya que se ha podido justificar su papel en la maduración del polen y de los estambres (Aguilar *et al.*, 2012).

A nivel fenológico los últimos tres estados corresponden a la formación y desarrollo del fruto, donde se observa un incremento de la presencia de la enfermedad en el estado IV, el cual va descendiendo de manera progresiva conforme avanza de estado; se

podría sugerir que la fenología del fruto tiene un efecto en la incidencia de las infecciones quiescentes, siendo las frutas maduras menos susceptibles a adquirir estas infecciones. Cuatro mecanismos han sido postulados para explicar la presencia de *Colletotrichum* spp. como infección quiescente en frutos inmaduros: a) Requerimientos nutricionales del patógeno, b) Compuestos antifúngicos preformados presentes en frutos verdes que disminuyen a medida que el fruto madura por un aumento en la actividad de la enzima lipoxigenasa, cuya actividad es regulada por la presencia de flavan-3-ol, epicatequin (compuesto fenológico). Estos compuestos son el 1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-henicososa-12, 15-dieno y el 1-acetoxi-2,4-dihidroxi-n-heptadeca-16-eno., c) Presencia de fitoalexinas y compuestos preformados y d) Factores de patogenicidad que pueden ser activados solamente en frutos maduros (Prusky *et al.*, 1996).

Es importante destacar que la presencia de hongos saprofitos como *Botrytis cinérea* en frutos de mora del estado fenológico VI (Forero de la Rotta *et al.*, 2004), podría ser uno de los factores de disminución de la antracnosis en ese estado, ya que el moho gris cubrió la mayor parte del fruto dificultando la lectura. Por otro lado, se considera a *Botrytis cinerea* como una de las enfermedades más limitantes en frutos del género *Rubus* y de otros como fresas, uvas y frambuesa a nivel mundial (Tamayo & Peláez, 2000), (CIAT, 2010).

Identificación de especies de *Colletotrichum* spp

- **Prueba con medio selectivo**

De los 63 aislamientos que se sembraron en PDA + Cu(OH)₂, 13 aislamientos no crecieron en este medio debido a contaminación por bacterias; sin embargo, los 50 aislamientos restantes presentaron coloración verde oliva de los cuales 45 aislamientos evidenciaron un crecimiento lento y 5 crecimiento rápido.

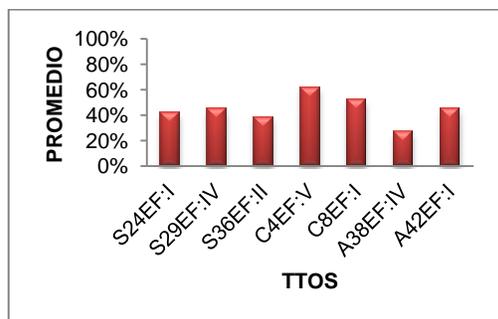
- **Sensibilidad al Benomyl**

En esta prueba que permite diferenciar especies del complejo *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* (Freeman, *et al.*, 1998), de los 63 aislamientos sembrados se observó tolerancia en 61 e inhibición en solo dos.

Pruebas de patogenicidad sobre flores y frutos de mora

Con respecto a la patogenicidad de cada uno de los aislamientos utilizados sobre los seis estados fenológicos del botón floral, se realizó un análisis exploratorio y descriptivo en Excel como se puede observar en la gráfica 2, se obtuvo que el aislamiento C4EF:V (departamento de Cundinamarca, estado fenológico V), con un valor del 62% de incidencia fue el tratamiento que en las diferentes repeticiones presentó mayor colonización de acérvulos y por ende, necrosis del tejido con mayor rapidez con respecto a los demás tratamientos, lo cual demuestra su poder de patogenicidad; a diferencia del tratamiento A38EF:IV

(departamento de Antioquia, estado fenológico IV) el cual registró el valor más bajo con un 27% de incidencia, siendo éste el menos patogénico. Es importante destacar que los dos aislamientos descritos posiblemente pertenecen al complejo de especies de *Colletotrichum acutatum*.



Gráfica 2. Porcentaje de la incidencia de los siete tratamientos utilizados en el ensayo de pruebas de patogenicidad sobre flores y frutos de mora.

CONCLUSIONES

Se identificaron infecciones quiescentes causadas por *Colletotrichum* spp., en los seis estados fenológicos del botón floral de mora, lo cual indica que el manejo integrado de la enfermedad debe ser permanente a lo largo de todo el ciclo del cultivo.

El manejo de fuentes de inóculo, material de propagación y residuos de podas y cosechas, inciden de forma directa en el establecimiento y propagación de la enfermedad.

La incidencia de infecciones quiescentes fue mayor en los dos primeros estados

fenológicos que corresponden a botón floral cerrado y pétalo recto, respectivamente.

Los aislamientos de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis en el botón floral de mora presentan características morfológicas y culturales intermedias entre las dos especies, aunque con mayor aproximación al complejo de especies de *C. acutatum*.

Las pruebas tanto de sensibilidad al Benomyl y crecimiento en medio selectivo para *Colletotrichum* spp., permitieron determinar que de los 63 aislamientos obtenidos de los seis estados fenológicos, 61 posiblemente pertenecen al complejo de especies de *Colletotrichum acutatum* y los dos restantes a la especie *Colletotrichum gloeosporioides*.

Mediante pruebas de patogenicidad en los seis estados fenológicos del botón floral de mora, se pudo determinar que los aislamientos seleccionados causaron infección y su presencia se evidenció mediante la observación de síntomas y signos sobre el tejido.

BIBLIOGRAFIA

Abang, M. M., Winter, S., Green, K. R., Hoffman, P., Mignouna, H. D., & Wolf, G. A. (2002). Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam anthracnose in Nigeria. *Plant Pathology* 51, 63-71.

Abang, M., Winter, S., Mignouna, H., Green, K., & Asiedu, R. (2003). Molecular taxonomic,

epidemiological and population genetic approaches to understanding yam anthracnose disease. *African Journal of Biotechnology* Vol. 2 (12): 486 – 496.

Agrios, G. (2005). *Plant pathology*. 5th ed. Nueva York: Elsevier Academic Press.

Bailey, J. A. y Jeger, M. J. (1992). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford, UK: CAB International. 388 p.

Femenia, M. (2007). Caracterización química de cepas de hongos del género *Colletotrichum*: síntesis de Gloeosporiol. Diseño y síntesis de modelos de agentes fungicidas. Universidad de Cádiz, Puerto Real.

Forero de La Rotta, M. C. (2001). Enfermedades de la mora de castilla. *Boletín de sanidad vegetal*. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Bogotá, 36 p.

Forero de La Rotta, M. C., Ávila, W., & González, R. (2002). Estudio sobre Antracnosis en mora de Castilla. *Memorias del cuarto seminario nacional de frutales de clima frío moderado: IV Seminario de Frutales de Clima Frio Moderado*. Medellín, Colombia, 220-228.

Freeman, S., Katan, T., Shabi, E. (1998). Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*. The Volcani Center, Bet Dagan, Israel.

Freire, V. H. (2012). Alternativas de mejora en el manejo poscosecha y comercialización de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) proveniente de la provincia de Tungurahua. Escuela Politécnica Nacional. Facultad de ingeniería química y agroindustria. Quito, Ecuador.

Galán, S. (1999). *El cultivo del mango*. Edición Mundi-Prensa, Madrid, 298 p.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) (2011). Manejo fitosanitario del cultivo de la mora (*Rubus glaucus* Benth). Medidas para la temporada invernal.

Martínez, A., Beltrán, O., Velastegui, G., Ayala, G., Jácome, R., Yáñez, W., & Luciano, E. (2007). Manual del cultivo de la mora de castilla. Convenio INIAP-UTA, Ambato-Ecuador, Primera Edición, 36 p.

Marulanda, M. Isaza, L. y Ramírez, A. (2007). Identificación de la especie de *Colletotrichum* responsable de la antracnosis en la mora de castilla en la región cafetera. *Scientia et Technica*, año XIII, No 37.

Menezes M. (2006). Aspectos biológicos e taxonómicos de especies do género *Colletotrichum*. *Academia Pernambucana de Ciencia Agronómica*, Recife, vol. 3, p. 170 – 179.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (2012). Anuario estadístico de frutas y hortalizas 2007 – 2011 y sus calendarios de siembras y cosechas, resultados evaluaciones agropecuarias municipales 2011. Bogotá.

Peres, N. A., Timmer, L. W., Adaskaveg, J. E., Correll, J. C. (2005). Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Dis.* 89:784–96

Prusky, D., Alkan, N., Mengiste, T., & Fluhr, R. (2013). Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. *Rev. Phytopathol*, 155-176.

Saldarriaga, A., Castaño, J., y Arango, R. (2008). Caracterización del agente causante de la antracnosis en tomate de árbol, manzano y mora. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.:* Volumen XXXII, número 123.

Saldarriaga, A. (2011). La antracnosis de la mora, estado actual y perspectivas para el manejo integrado. Rionegro, Antioquia.

Santacruz, C. (2013). Caracterización morfológica, patogénica y molecular de especies de *Colletotrichum* spp., causantes de la antracnosis del fruto de ají y pimentón *Capsicum* spp en el Valle del Cauca. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, escuela de posgrados, Palmira.

Tamayo M., y Peláez, A. (2000). Caracterización de daños y pérdidas causadas por enfermedades del fruto de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) en Antioquia. *Memorias del tercer seminario nacional de frutales de clima frío moderado: III Seminario de Frutales de Clima Frio Moderado. Manizales, Colombia*, 174 - 179.

Timmer, L., Brown, G. y Zitko, S (1998). The role of *Colletotrichum* spp., in postharvest anthracnose of citrus and survival of *C. acutatum* in fruit. *Plant Disease*, Vol 82: 415-418.