



ENFERMEDADES BACTERIANAS DE ALGUNAS LEGUMINOSAS
FORRAJERAS PROMISORIAS

Celina Torres G. y Jillian M. Lenné

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)

Apartado Aéreo 6713, Cali, Colombia 1986

Resumen

Las leguminosas forrajeras promisorias Centrosema, Leucaena y Zornia, poseen alto valor alimenticio como fuente de proteínas, minerales, vitaminas y además poseen alta productividad en suelos ácidos e infértiles de América tropical. En 1981 se realizaron varios reconocimientos en Colombia y se encontraron severas pudriciones en vainas de Leucaena leucocephala, manchas foliares y muerte descendente en accesiones de Centrosema sp. nov. y clorosis, atrofia, marchitamiento y en algunos casos, muerte de plantas jóvenes de Zornia glabra. Los agentes causales fueron identificados como Pseudomonas fluorescens Biotipo 2 en las leguminosas L. leucocephala y Centrosema sp. nov. y como Corynebacterium flaccumfaciens en Zornia glabra. Se han confirmado niveles de infección en semillas hasta del 100% en Zornia glabra y del 34% en semillas de Centrosema sp. nov. Debido a las reducciones en rendimiento, materia seca y la pérdida de semillas de estas leguminosas por las respectivas bacterias, se han buscado métodos de control efectivo como son las variedades resistentes, prácticas culturales y para las semillas, control químico con Carboxin 5,6 dihidro-2-Metil 1,4-oxatiino-3-Carboxanilido + (Triclorometiltio)-4-Cicloexano-1,2-dicarboximida al 1% y Oxido Cúprico al 1% y control combinado con los mismos fungicidas y a baja temperatura (-4°C) por 2 semanas.

Summary

The promising forage legumes Centrosema, Leucaena and Zornia possess high feed quality as a source of proteins, minerals, vitamins and besides possess high productivity in the acid infertile soils of tropical America. In 1981, various surveys were realized in Colombia and severe rotting of pods of Leucaena leucocephala, leaf spots and dieback of accessions of Centrosema sp. nov. and chlorosis, atrophy, wilting and, in some cases, death of young plants in Zornia glabra were found. The causal agents were identified as Pseudomonas fluorescens Biotype II in the legumes L. leucocephala and Centrosema sp. nov. and as Corynebacterium flaccumfaciens in Zornia glabra. Levels of seed infection up to 100% in Zornia glabra and 34% in seeds of Centrosema sp. nov. have been confirmed. Due to reductions in yield of both dry matter and seeds of these legumes by the respective bacterias, effective control methods were looked for such as resistant varieties, cultural practices and for the seeds chemical control with Carboxin 5,6 dihidro-2-Methyl 1,4-oxatine-3-carboxanilide + (Trichloromethyl)-4-Cyclohexane-1,2-dicarboximide at 1% and Cupric oxide at 1% and combined control with the same fungicides and at low temperature (-4°C) for two weeks.

INTRODUCCION

Leucaena leucocephala es una leguminosa nativa de los trópicos húmedos y subhúmedos de América Central (11), adaptada a suelos de moderada acidez y fertilidad. Posee alto valor proteínico en asociación con gramíneas. Su capacidad para reemplazar pasturas nativas, como también considerarla como banco de proteínas, se ha estudiado en América Central (9), Australia,

Hawaii y otros países (1).

El género Centrosema es un grupo de leguminosas que poseen unas 40-50 especies nativas de América tropical (2, 10, 14). C. pubescens está naturalizada en el sureste de Asia y está ampliamente distribuida a través de los trópicos y subtrópicos del mundo. Esta leguminosa tiene notable adaptabilidad a las condiciones de sequía y a suelos ácidos e infértiles (5). Su contenido proteínico es mayor de 20%, valor que supera al de especies forrajeras conocidas del género Stylosanthes.

Zornia glabra es una leguminosa forrajera promisoría para los ecosistemas de sabana de los trópicos. Tiene buena adaptación a suelos ácidos con niveles bajos de fósforo, potasio y magnesio y niveles altos de aluminio (15). Además su producción de materia seca digerible y contenido de fósforo es superior al de otras leguminosas forrajeras de alto valor nutritivo como Stylosanthes, Desmodium y Aeschynomene.

Hasta 1981 no se habían registrado enfermedades bacterianas de estas leguminosas en Colombia, pero a finales de este año se realizaron varios reconocimientos y se encontraron severas pudriciones en vainas de Leucaena Leucocephala, manchas foliares y muerte descendente en algunas accesiones de Centrosema sp. nov. y clorosis, atrofia, marchitamiento y en algunos casos muerte de plantas jóvenes de Zornia glabra. Por la importancia potencial de estas enfermedades, se hizo énfasis en realizar una investigación básica sobre sus identidades, distribución, síntomas, importancia y manejo.

SINTOMAS

En Leucaena leucocephala los síntomas se manifestaron como lesiones acuosas en las vainas alrededor de perforaciones hechas por insectos. Las lesiones se expandieron y se tornaron necróticas cuando las semillas empezaron a pudrirse. Bajo condiciones de humedad, la pudrición de las vainas fue general y la bacteria presentó un exudado alrededor de las perforaciones. Las vainas a menudo caían prematuramente y pocas semillas se obtuvieron de las vainas afectadas (4).

Los primeros síntomas observados en Centrosema sp. nov. fueron marchitamiento de terminales y hojas jóvenes y manchas cloróticas en hojas maduras. Las hojas jóvenes y los terminales se tornaron parcial o totalmente necróticas y desarrollaron muerte descendente. Sobre hojas maduras las manchas cloróticas se tornaron necróticas y a menudo se presentaron arrugadas y distorcionadas (13).

En Zornia glabra la bacteria produjo clorosis, posteriormente necrosis, atrofia, marchitamiento y en algunos casos muerte de plantas jóvenes. En secciones transversales de la base del tallo y raíz mostraron coloración café a través del tejido vascular (13).

IDENTIFICACION

Los aislamientos obtenidos de vainas de Leucaena leucocephala (Cuadro 1)

Cuadro 1. Características usadas comunmente para diferenciar géneros entre bacterias fitopatógenas*

Caracteres	Aislamientos de <u>Leucaena</u>	Aislamientos de <u>Centrosema</u>	Aislamientos de <u>Zornia</u>	Pseudomonas	Coryne- bacterium	Agrobacte- rium	Erwinia	Xantho- monas
Crecimiento en medio común	+	+	+	+	+	+	+	+
Tinción de Gram	-	-	+	-	+	-	-	-
Colonias naranja o amarillas en medios AN, YDC ^{a,b/}	-	-	+	-	+	-	V ⁻	+
Fluorescencia en K.B. ^{c/}	+	+	-	V ⁺ d/	-	-	-	-
Crecimiento anaeróbico	-	-	-	-	-	-	+	-

* Society of American Bacteriologists. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathologic Bacteria. St. Paul, Minnesota. 1980.

a/ AN: Agar Nutritivo.

b/ YDC: Medio con levadura y dextrosa.

c/ K.B.: Medio B de King.

d/ V⁺: resultado variable.

fueron gram-negativos, no produjeron esporas, las células fueron móviles con dos flagelos. Las colonias crecieron sobre AN después de 24 horas y a 28°C de temperatura. Estas fueron convexas con bordes regulares, blanco-cremosas, butirosas y produjeron pigmento verde fluorescente en medio B de King. Todos los aislamientos fueron aeróbicos, oxidasa positiva, catalasa positiva, formaron leván, causaron pudrición suave en papa, redujeron nitratos a nitritos y utilizaron meso-inositol, trehalosa, ethanol, propyleneglicol, sorbitol, ácido benzoico, L-arabinosa, D-arabinosa, β -alanina, L-valina y Lipasa. Produjeron ácido a partir de sucrosa e hidrolizaron almidón y gelatina. Los aislamientos no acumularon poly- β -hydroxibutirato, no produjeron reacción hipersensitiva en tabaco y no crecieron en AN a 41°C (6) (Cuadro 2).

La bacteria que ocasionó marchitamiento de terminales y hojas jóvenes en Centrosema sp. nov., presentó las mismas características morfológicas, culturales, fisiológicas y bioquímicas que los aislamientos de Leucaena. En base a estos resultados, se determinó que el agente causal de las pudriciones de vainas de Leucaena leucocephala y el marchitamiento de terminales y hojas jóvenes de Centrosema sp. nov. es la bacteria Pseudomonas fluorescens Biotipo 2 (6, 12) (Cuadro 3).

Después de realizar los postulados de Koch's con 16 aislamientos provenientes de plantas enfermas de Zornia glabra, se observaron las caracteris-

Cuadro 2. Especies fluorescentes del género Pseudomonas y su comparación con los aislamientos de Leucaena y Centrosema.

Caracteres	Aislamientos de <u>Leucaena</u>	Aislamientos de <u>Centrosema</u>	<u>P.fluorescens</u>	<u>P.aeruginosa</u>	<u>P.putida</u>	<u>P. syringae</u>	<u>P. cichorii</u>
Crecimiento a 41°C	-	-	-	+	-	-	-
Formación de Levan	+	+	d	-	-	d	-
Hidrólisis de Arginina	+	+	+	+	+	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	-	+
Denitrificación	+	+	d	+	-	-	-
Hidrólisis-gelatina	+	+	+	+	-	d	-
Hidr. almidón	-	-	-	-	-	-	-
Fuentes de carbón:							
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+
Trehalosa	+	+	+	-	-	-	-
2-Ketogluconato	+	+	+	+	+	-	-
Meso-Inositol	+	+	+	-	-	d	d
Geraniol	-	V	-	+	-	-	-
L-Valine	+	+	+	+	+	-	-
α-Alanine	+	+	+	+	+	-	-

Tomado del manual de Bergey. 8ª Edición.

Cuadro 3. Características de biotipos de P. fluorescens y de las cepas de Centrosema y Leucaena.

Biotipos de <u>P. fluorescens</u>	I	II	III	IV	Aislamiento de <u>Centrosema</u>	Aislamiento de <u>Leucaena</u>
No pigmento fluorescente	-	-	-	Azul	-	-
Formación de Levan con Sucrosa	+	+	-	+	+	+
Denitrificación	+	+	+	+	+	+
Fuentes de carbón para crecimiento						
α - Arabinosa	+	+	-	+	+	+
Sucrosa	+	+	-	+	+	+
Ethanol	-	+	d	+	+	+

Tomado del Manual de Bergey. 8ª Ed.

ticas culturales, bioquímicas y fisiológicas. Se encontró que era una bacteria gram-positiva, no produce esporas, varillas cortas y redondeadas al final. Las células fueron móviles por varios flagelos. Las colonias en AN después de 24 horas a 27°C fueron circulares, convexas, enteras y butirosas. En YDC las colonias presentaron un color amarillo cremoso.

Las características fenotípicas positivas de todos los aislamientos fueron producción de catalasa, hidrólisis de almidón, crecimiento a 37°C, crecimiento en TZC, colonias amarillas en NBY (7), producción de ácido a partir de Celobiosa, Rhamnosa, Mammosa, Ribosa, Mannitol, Sorbitol e Inulina. Las características fenotípicas negativas fueron las siguientes: oxidasa, reducción de nitratos a nitritos, producción de levan, producción de pigmento azul en YDC, reducción de sustancias de sucrosa, producción de ácido a partir de Melezitosa.

Al efectuar la comparación de las características presentadas por los cultivos bacterianos causales del marchitamiento en Zornia glabra con las observadas por otros géneros que contienen bacterias fitopatógenas, se aprecia claramente que el agente causal pertenece al género Corynebacterium (3). Las pruebas adicionales de caracterización efectuadas para determinar la especie a la cual pertenecía dicho agente causal, son comparadas con las observadas por Dye y Kemp para las distintas especies de Corynebacterium. Claramente se aprecia que esta bacteria pertenece a la especie Corynebacterium flaccumfaciens (Hedges) (7) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Pruebas fisiológicas y bioquímicas en cuatro especies patógenas de Corynebacterium y comparación con los aislamientos procedentes de Zornia glabra CIAT 7847*.

Características	<u>C. michiganense</u>	<u>C. ilicis</u>	<u>C. fasciens</u>	<u>C. flaccumfaciens</u>	Aislamientos de <u>Z. glabra</u> CIAT 7847
Movilidad	-	+	-	+	+
Oxidasa	-	-(1)	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+
Hidrólisis de almidón de papa	V	-	+	+	+
Producción de ácidos:					
Rhamnosa	-	+	-	+	+

* Dye, D. W. and W. J. Kemp. 1977.

(1) Mandel et al. (1961), registró oxidasa positiva.

DISTRIBUCION

La bacteria Pseudomonas fluorescens Biotipo 2 se ha encontrado en las sabanas isohipertérmicas bien drenadas y en los ecosistemas boscosos y afecta con mayor severidad a Leucaena leucocephala en el sureste de México, en Belize, Panamá y posteriormente en Colombia y el Centrosema sp. nov. en Carimagua y Santander de Quilichao, Colombia. Corynebacterium flaccumfaciens Hedges, es una enfermedad muy importante en Colombia, en el ecosistema de bosque estacional, específicamente en Santander de Quilichao.

IMPORTANCIA

a) Pérdidas

Pseudomonas fluorescens Biotipo 2 es una bacteria que invade los terminales de las plantas de Centrosema sp. nov., reduciendo su crecimiento. El rendimiento en peso seco se vio seriamente afectado por la presencia de la enfermedad; al producir 420.9 gr en inóculo natural, 487.7 gr en inóculo artificial y 798.0 gr en parcelas protegidas químicamente (8) (Cuadro 5). La producción de nitrógeno y proteína cruda, disminuyó aproximadamente en un 50% al ser comparada con la producción obtenida en las parcelas protegidas con químicos. La digestibilidad in vitro de la materia seca, no se afectó con la presencia de la bacteria.

Se pudo observar un drástico efecto del marchitamiento bacteriano en Zornia glabra 7847 ocasionado por Corynebacterium flaccumfaciens, encontrándose pérdidas del 81.4% con respecto al testigo (4).

La presencia de esta bacteria en los vasos xilemáticos, limita severamente

Cuadro 5. Rendimiento de materia seca (ton/ha) para Centrosema sp. cosechado en parcelas con diferentes tratamientos.

Tratamientos	Producción	
	Materia seca gr/muestra	Material seca ton/ha/6 meses
Inóculo natural ^{a/}	420.95	5.612
Inóculo artificial ^{b/}	487.75	6.370
Protección química ^{c/}	798.00	10.640

a/ Parcelas testigo, sin ningún tratamiento especial.

b/ Parcelas inoculadas artificialmente con la cepa bacterial

c/ Parcelas protegidas con hidróxido de cobre (Kocide).

el contenido de nutrientes y de agua y la expansión foliar manifestándose en una reducción de materia seca lo que probablemente causa pérdidas significativas en producción (Cuadro 6).

b) Transmisión por semilla.

En un ensayo realizado con semilla cosechada de vainas sanas de 14 accesiones de Leucaena leucocephala se encontraron 48-95% de semillas infectadas con la bacteria. Es posible que Pseudomonas fluorescens Biotipo 2 sea un componente natural de la microflora de las vainas y semillas de Leucaena y usualmente no cause enfermedad. Sin embargo, cuando los insectos hacen perforaciones, las heridas causadas pueden permitir la entrada de las bacterias y causar la pudrición de las semillas. Pseudomonas fluorescens Biotipo 2 también se encontró asociado a semillas de algunos ecotipos de Centrosema sp. Los niveles de infección tuvieron un rango entre 8-34%.

Con respecto a Corynebacterium flaccumfaciens se presentó infección por semillas con niveles tan altos como 100% en semillas provenientes de plantas enfermas de Zornia glabra CIAT 7847 y 75% en semillas provenientes de plantas sanas de Zornia glabra CIAT 7847 (16).

MANEJO

Debido a las reducciones en rendimiento, materia seca y la pérdida de semillas de estas leguminosas por estas bacterias, se han buscado métodos de control efectivo como son las variedades resistentes, prácticas culturales y para las semillas control químico y combinación de control químico y físico.

Cuadro 6. Efecto del marchitamiento bacteriano en el rendimiento de materia seca (gr/parcela) de Zornia glabra CIAT 7847.

Especie	Cepa 1	Cepa 2	Testigo
	<u>C. flaccumfaciens</u>	<u>C. flaccumfaciens</u>	
<u>Zornia glabra</u> CIAT 7847	464.4	349.8	1889.2

a) Resistencia

De las inoculaciones realizadas en vainas de algunas accesiones de Leucaena se encontró que de las especies de Leucaena leucocephala inoculadas, todas fueron susceptibles a la pudrición de las vainas, sin embargo L. diversifolia y L. shannoni fueron resistentes y L. esculenta y L. pulverulenta fueron moderadamente resistentes. Parece que graves ataques de marchitamiento y muerte descendente están restringidos a accesiones de Centrosema sp. nov. CIAT 5112, 5118, 5277 y 5278 por ser morfológicamente similares. Entre la colección de germoplasma de CIAT, hay ecotipos resistentes de estas especies y también C. brasilianum y C. macrocarpum tienen resistencia. Hasta la fecha, el marchitamiento bacteriano ocasionado por Corynebacterium flaccumfaciens está restringido a la especie Zornia glabra. Entonces, existen buenas fuentes de resistencia a las enfermedades entre los géneros de estas leguminosas promisorias que podemos usar como están o en programas de Fitomejoramiento.

b) Tratamiento de semillas

Se realizaron algunos tratamientos químicos tendientes a disminuir la incidencia de las bacterias sin reducir la viabilidad de la semilla especialmente para Z. glabra, se encontró que utilizando Hidróxido de cobre (Kocide) al 1%, Carboxin 5,6 dihidro-2-Metil 1,4-oxatiino-3-Carboxanilido + (Triclorometiltio)-4-Cicloexano-1,2-dicarboximida (Vitavax) al 1% y control combinado con los mismos fungicidas y a baja temperatura (-4°C) por 2 semanas se logró reducir el porcentaje de infección y no se alteró su viabilidad (16).

Cuadro 7. Efecto de tratamiento químico y combinación de tratamiento en el porcentaje de infección por Corynebacterium flaccumfaciens y porcentaje de germinación de semillas de Zornia glabra CIAT 7847.

Testigo		Aplic. de Vitavax		Aplic. de Kocide		Control Combinado	
% Infec.	% Germin.	% Infec.	% Germin.	% Infec.	% Germin.	% Infec.	% Germin.
65.3	21.7	1.0	35.0	6.0	38.3	1.7	48.3

CONCLUSIONES

1. Todos los aislamientos obtenidos de las muestras de L. leucocephala y Centrosema sp. nov. afectados por podredumbre de la vaina y muerte descendente y marchitamiento como los aislamientos obtenidos de muestras de Z. glabra CIAT 7847 afectadas con clorosis, atrofia, marchitamiento y muerte, los cuales se inocularon en plantas de 5 semanas de edad, demostraron ser patogénicos y responsables de la enfermedad.
2. Con base en las pruebas de caracterización realizadas, los patógenos se ubicaron taxonómicamente como Pseudomonas fluorescens Biotipo 2 y Corynebacterium flaccumfaciens respectivamente.
3. En el caso de Pseudomonas fluorescens Biotipo 2, esta invade los terminales de las plantas de Centrosema sp. nov. lo cual se ve claramente por los rendimientos en base a materia seca. La bacteria afecta significativamente el rendimiento de nitrógeno y de proteína cruda.
4. Corynebacterium flaccumfaciens (Hedges) Dows., es transmitido internamente en las células de empalizada que forman la testa de la semilla, lo cual constituye un método eficiente de diseminación del patógeno a otras áreas y países. Esta bacteria ocasionó pérdidas del 81% de materia seca.
5. Existen ecotipos y especies entre estos géneros de leguminosas con resistencia a las enfermedades.

6. El hidróxido de cobre (Kocide) al 1% y el Carboxin 5,6-dihidro-2-Metil 1,4-oxatiino-3-Carboxanilido + (Triclorometiltio)-4-Cicloexano-1, 2-dicarboximida (Vitavax) al 1% y el control combinado con los anteriores fungicidas y bajas temperaturas (-4°C) por 2 semanas redujeron significativamente el porcentaje de infección sin alterar la viabilidad de las semillas.

RECOMENDACIONES

- 1) Hacer uso de variedades resistentes, en zonas donde la presencia de la bacteria es considerada problema.
- 2) Erradicación, por arranque y quema in situ de los focos de infección.
- 3) En el caso de L. leucocephala, hacer estudios tendientes a encontrar controles efectivos de los insectos que diseminan la enfermedad.
- 4) Reconocimiento de la presencia de Corynebacterium flaccumfaciens en áreas de producción de otros cultivos como el frijol en Colombia.
- 5) Hacer estudios de epidemiología para seleccionar áreas donde las condiciones ambientales y las prácticas culturales sean adversas para el crecimiento y desarrollo de la bacteria.
- 6) Llevar a cabo diferentes métodos de control de la enfermedad como son: utilización de material nativo, control de malezas, control mecánico y químico.

BIBLIOGRAFIA

1. Anonymous, 1977. Leucaena, promising forage and tree crop for the tropics. National Academy of Sciences, Washington, D.C.
2. Bogdon, A. V. 1977. Tropical pasture and fodder plants (grasses and legumes). Longman, London and New York. 475 pp.
3. Brown, J. H. and Breen, L. 1968. Method for gram-positive and gram-negative bacteria. In: Luna, L. G. ed. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Division; McGraw-Hill. p.222-223.
4. Chavarro, C. Alvaro y López, G. César A. 1984. Estudios de las características y patogenicidad de Corynebacterium flaccumfaciens (Hedges) Dows. agente causal del marchitamiento bacteriano de Zornia spp. y su efecto en rendimiento en Zornia glabra CIAT 7847 y Phaseolus vulgaris. Tesis Ing. Agr. Universidad Nacional, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira.
5. Crowder, L. V. 1960. Gramíneas y leguminosas forrajeras en Colombia. Ministerio de Agricultura de Colombia. Boletín Técnico No. 8, Bogotá.
6. Doudoroff, M., Palleroni, N. Y. 1974. Genus Pseudomonas migula. 1894. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Buchanan. R. E. and N. E. Gibbons, eds. Williams, Co. Baltimore, MD. 217-243.
7. Dye, D. W. and Kemp, W. J. 1977. A taxonomic study of plant pathogenic Corynebacterium species. New Zealand Journal Agricultural Research 20: 563-582.

8. Guevara, G. Claudia, L. 1982. Etiología de la muerte descendente de Centrosema spp. y el efecto del patógeno en su rendimiento y calidad durante el tiempo del establecimiento de la leguminosa. Tesis de Grado, Universidad Nacional, Palmira. 86 pp.
9. Hutton, E. M. 1974. Tropical pastures and beef production. World Anim. Rev. 12:1-7.
10. Kiets Chmer, A. E. Jr. 1976. Growth and adaptability of Centrosema species in south Florida. Soil and Crop Sci. Soc. Fla. Proc. 136: 164-168.
11. Le Houérou, H. N. 1978. The role of shrubs and trees in the management of natural grazing lands. Proc. 8th Ann. World For. Cong. Jakarta, Indonesia.
12. Lenné, J. M., Torres, G. C. and Victoria, J. I. 1981. Bacterial pod rot of L. leucocephala caused by P. fluorescens Biotype 2. Proc. 5th Int. Conf. Plant Path. Bact. Cali, Colombia.
13. _____ 1981. Bacterial leaf spot and dieback of Centrosema sp. nov. Proc. 5th Int. Conf. Plant Path. Bact. Cali, Colombia.
14. Skerman, P. J. 1977. Tropical forage legumes. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. 609 pp.
15. Torres, G. C., Lenné, J. M., Victoria, J. I. 1981. Bacterial wilt of Zornia spp. caused by Corynebacterium flaccumfaciens. Proc. 5th Int. Conf. Plant Path. Bact. Cali. 74-79 pp.
16. ✓ Torres, G. C. y Lenné, J. M. 1985. Efecto de varios tratamientos en la supervivencia de Corynebacterium flaccumfaciens (Hedges) en semillas de Zornia glabra CIAT 7847. XI Congreso Panamericano de semillas. Cali, Colombia.