

Diagnóstico e identificación de enfermedades y patógenos asociados en (*Diplostephium rosmarinifolius*) y (*Oreopanax floribundum*) en fase de vivero

Presentado por

Karen Eliana Aguirre Carrión

Para optar al título de Tecnólogo Agroforestal

Presentado a

Carlos Carranza

Ing. Agrónomo

Universidad Nacional de Colombia

Director

Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD

Escuela de Ciencias Agrícolas pecuarias y de Medio ambiente ECAPMA

Bogotá, 2017

## Tabla de contenido

1. Resumen .....	3
2. Abstract .....	4
3. Introducción .....	5
4. Planteamiento del problema .....	6
5. Objetivos .....	6
6. Marco teórico .....	7
7. Materiales y métodos .....	14
7.1. Localización.....	14
7.2. Material vegetal .....	14
7.3. Identificación de síntomas .....	15
7.4. Identificación partes afectadas.....	16
7.5. Recolección de las muestras .....	16
7.6. Aislamiento de patógenos .....	17
7.7. Caracterización de patógenos .....	17
7.8. Purificación de patógenos .....	18
8. Resultados y discusión .....	18
8.1. Especie de <i>D. rosmarinifolius</i> .....	18
8.1.1. Descripción de Síntomas.....	18
8.1.2. Análisis de Frecuencia de los Síntomas.....	21
8.1.3. Patógenos Identificados.....	22
8.2. Especie <i>O. floribundum</i> .....	25
8.2.1. Descripción de Síntomas.....	25
8.2.2. Análisis de frecuencia de Síntomas.....	26
8.2.3. Patógenos Identificados.....	27
9. Bibliografía.....	31

## 1. Resumen

En el vivero del Jardín Botánico de Bogotá se presentan problemas de pérdida de materiales en las especies *Diplosteghium rosmarinifolius* y *Oreopanax floribundum* durante su fase de crecimiento en bolsa para los programas de reforestación de la Alcaldía de Bogotá ocasionados por enfermedades. Se realizó la caracterización de síntomas y se tomaron muestras de las partes afectadas en cada una de las especies (tejido foliar y tallo) y se determinó la frecuencia de los síntomas. En el Laboratorio de Biología y Microbiología de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia (Bogotá) se realizó aislamiento por siembra directa en medio de cultivo con papa dextrosa agar (PDA), se realizó la observación de las primeras colonias y purificación de los patógenos. Posteriormente se realizó la identificación con la ayuda de una guía taxonómica. Los datos obtenidos de la frecuencia de los síntomas fueron procesados mediante prueba de chi-cuadrado con el programa estadístico R. En *Diplosteghium rosmarinifolius* se expresó síntomas de escoba de bruja, con un total de ocho síntomas, no se encontró diferencias significativas a nivel de su frecuencia la cual osciló entre el 60%-90%, se identificaron los patógenos *Fusarium* sp. y *Chaetomella* sp. En *Oreopanax floribundum* se identificaron síntomas de clorosis y necrosis con valores similares entre sí que oscilaron entre el 25-50%, los patógenos asociados a estos síntomas se identificaron fueron *Alternaria* sp. y *Curvularia* sp. con una asociación significativa entre la estructura y la incidencia de los ataques. Estos resultados son un insumo para la formulación de planes de manejo integrado de enfermedades.

**Palabras clave:** Fitopatógenos, clorosis, identificación,

## 2. Abstract

In the nursery of the Botanical Garden of Bogotá there are problems of loss of materials in the species *Diplostephium rosmarinifolius* and *Oreopanax floribundum* during its growth phase in the bag for the reforestation programs of the Bogota City Hall caused by diseases. The characterization of symptoms was carried out and samples of the affected parts were taken in each of the species (leaf tissue and stem) and the frequency of symptoms was determined. In the Biology and Microbiology Laboratory of the National Open and Distance University (Bogotá) isolation was carried out by direct seeding in culture medium with potato dextrose agar (PDA), observation of the first colonies and purification of the pathogens was carried out. Subsequently, the identification was made with the help of a taxonomic guide. The data obtained from the frequency of symptoms were processed by chi-square test with the statistical program R. In *Diplostephium rosmarinifolius* witch's broom symptoms were expressed, with a total of eight symptoms, no significant differences were found at the level of frequency which ranged between 60% -90%, the pathogens *Fusarium* sp. and *Chaetomella* sp. In *Oreopanax floribundus* symptoms of chlorosis and necrosis were identified with values similar to each other that ranged between 25-50%, the pathogens associated with these symptoms were identified were *Alternaria* sp. and *Curvularia* sp. with a significant association between structure and incidence of attacks. These results are an input for the formulation of integrated disease management plans.

### 3. Introducción

El Jardín Botánico de Bogotá, José Celestino Mutis; tiene dentro de su plan de propagación especies de clima frío de perfecta adaptación a los ecosistemas de la ciudad, dos de esas especies (*Diplosteghium rosmarinifolius*) y (*Oreopanax floribundum*), presentaron problemas fitosanitarios que terminaban con la muerte de las plántulas sin lograr mayor éxito en su desarrollo fenológico, impidiendo así el objetivo con el cual se propagan dichas especies.

Por lo anterior se llevó a cabo un trabajo de investigación con el fin de identificar los patógenos causantes de dichos problemas sanitarios, así como la identificación de las enfermedades asociadas a estos patógenos; mediante el convenio con la Universidad Nacional Abierta y Distancia y el Jardín Botánico de Bogotá, Dentro de dicho convenio era de vital importancia conocer los causantes de la mortalidad de las especies que se tienen en propagación del vivero del JBB, ya que estas especies son indispensables dentro de los programas de arborización urbana del jardín botánico como Arbolado joven, Manejo de arbolado antiguo, jardinería, producción de material vegetal entre otros; La producción y propagación de (*Diplosteghium rosmarinifolius*) y (*Oreopanax floribundum*), por parte del JBB aportan innumerables beneficios medioambientales tanto para el sector público como privado por ende los beneficios que se brinda a el distrito y a la conservación, paisajismo, cobertura vegetal, recuperación de espacios, aporte de oxígeno, reducción de CO<sub>2</sub>, sostenibilidad ambiental y la calidad del paisaje.

#### **4. Planteamiento del problema**

Las especies forestales de clima frío como, *Oreopanax floribundum* y *Diplostegium rosmarinifolius* que presentan enfermedades durante su desarrollo en vivero, carecen de identificación de síntomas por factores externos, biológicos, físicos o abióticos y posteriores enfermedades; estas, están generando la muerte en los individuos desde muy temprana edad, de manera tal que no se conoce como controlar los anteriores y por ende hacer un manejo adecuado brindando las condiciones de desarrollo saludable para las especies forestales mencionadas que son de gran importancia para los planes de reforestación y de manejo de flora en la capital del país.

## **5. Objetivos**

### **5.1. Objetivo General**

Identificar posibles enfermedades que se presentan en las especies *Oreopanax floribundum* y *Diplostephium rosmarinifolius* en el vivero del Jardín Botánico de Bogotá.

### **5.2. Objetivos Específicos**

- Describir y clasificar los síntomas encontrados en cada una de las especies.
- Identificar los patógenos presentes en *Oreopanax floribundum*, *Diplostephium rosmarinifolius*.

## 6. Marco teórico

### 6.1. Aspectos generales de los forestales

Los bosques son muy importantes para la vida humana por la cantidad de servicios que proveen: captura y almacenamiento de carbono, regulación climática, mantenimiento del ciclo del agua, purificación hídrica, mitigación de riesgos naturales como inundaciones, además de que sirven como hábitat para un gran número de especies (los bosques contienen cerca del 90% de la biodiversidad terrestre). Esto sin tomar en cuenta los bienes que disfrutamos directamente, como frutos, papel, madera, insumos para medicinas o cosméticos, y recreación (García, 2014).

La mitad del territorio colombiano está cubierto por bosques (59 millones de hectáreas). Ocupa el tercer lugar en Sudamérica en cuanto a superficie de bosque después de Brasil y Perú, y es el 5° país en la región respecto a cobertura con bosque primario (8,5 millones de hectáreas) (FAO, 2010). El resto son 51,5 millones de hectáreas de bosque regenerado y 350,000 hectáreas de plantaciones forestales. Debido a la diversidad de climas y relieves colombianos, el país se encuentra dividido en cinco regiones naturales. La Amazonía es la que posee la mayor área de bosques del país con 39,7 millones de hectáreas, dos terceras partes del total nacional. En esta región se encuentran principalmente bosques altos de tipo selvático. Le sigue la Región Andina con el 18% de los bosques naturales del país. Esta región presenta la mayor variedad de tipos de bosque por la variedad de condiciones climáticas que la componen, aunque muchos son bosques fragmentados. Se observan bosques selváticos, bosques de niebla, bosques enano, entre otros. La Región Pacífico contiene el 8% de los bosques naturales del país y la mitad de su territorio está cubierta por bosques, principalmente selvas. También sobresalen las coberturas relativas a la vegetación de manglar. La Orinoquía se caracteriza por bosques bajos y mixtos, así como vegetación de sabana. Finalmente, la Región Caribe presenta bosques mixtos que son 2,7% del total nacional. La mayor parte de esta región está cubierta por pastos utilizados en actividades ganaderas (IGAC *et al.*, 2002).



## 6.2. Enfermedades en forestales

La patología forestal es la rama de la fitopatología que estudia las enfermedades de los árboles (autóctonos, de cultivo u ornamentales), su prevención y control. Además, desarrolla métodos de lucha y control frente a las enfermedades (Chavarriaga, 2011). Los sistemas forestales, como otros ecosistemas, se encuentran en un equilibrio dinámico que puede romperse en cualquier etapa del desarrollo del mismo debido a diferentes causas; entre otras la acción nociva de alguno de los componentes vivos del ecosistema o de factores climáticos adversos (Gómez, 2009). Los hongos, bacterias, insectos, nematodos, ácaros, virus y roedores son los principales agentes bióticos que afectan la calidad y la cantidad de una cosecha de semillas tanto forestal como agrícola (Triviño, 1980). Las plantas requieren de nutrientes que garanticen la salud de la misma; los micronutrientes que, como integrantes de muchas estructuras enzimáticas, son capaces de catalizar la mayor parte de las reacciones típicas del metabolismo de la planta interviniendo de manera directa en la fisiología de esta (Valagro SpA, 2004). De esta manera si las plantas no reciben los micronutrientes esenciales pueden presentar síntomas de enfermedades por deficiencia de nutrientes.

La evolución de las plantas y los organismos asociados ellas han sido alteradas por los agroecosistemas desarrollados por el hombre. Las técnicas del monocultivo, el mejoramiento genético de las plantas y el empleo intensivo de plaguicidas han conducido al desarrollo de patógenos más nocivos y que resisten a los plaguicidas. Esta variación genética ha cambiado las expectativas de los programas de mejoramiento de plantas y las alternativas para el manejo de las enfermedades (Miller y Martin, citados por Flores *et al.* (1997).

Las plantas se encuentran en continuo contacto con otros organismos. Bajo condiciones naturales, ellas interactúan además con un gran número de microorganismos potencialmente patogénicos. Sin embargo, las plantas normalmente permanecen sanas debido, en parte, a la manifestación de varios mecanismos de defensa. De acuerdo con los axiomas de resistencia planteados por Browning (1980),

la resistencia y la virulencia son la regla mientras que la susceptibilidad y la virulencia son la excepción. El autor propone además que la resistencia y la susceptibilidad son los extremos de un continuo y que la inmunidad es absoluta. Los genes que determinan la resistencia oligogenica y la susceptibilidad en la planta, son complementarios a los genes que determinan la virulencia y la virulencia en el patógeno (Browning 1980).

### 6.3. Características taxonómicas, botánicas y ecológicas de (*Oreopanax floribundum*) y (*Diplostephium rosmarinifolius*)

#### **Oreopanax floribundum – Mano de oso**

Nombre científico: *Oreopanax floribundum* (Kunth) Decne & Planch.

Familia: Araliaceae

Nombre común: Mano de oso, cinco dedos

Tipo de Hojas: Simple.

Disposición de las hojas: Alterna.

Tipo de Fruto: Drupa.

Látex: Ninguno.

*Oreopanax floribundum* es una especie forestal presente en los bosques andinos colombianos entre los 2.600 y 3.000 m.s.n.m. con una precipitación promedio anual de 1.720 mm (Cantillo *et al.*, 2008). Mediante un estudio de diversidad y caracterización florística en los cerros orientales de Bogotá se encontró que, en términos de riqueza y diversidad, los siete tipos de unidades de vegetación presentan valores muy similares entre sí; las comunidades *Ocotea sericea* y *Weinmania tomentosa* y *Oreopanax floribundum* y *Axinaea macrophylla* poseen los valores más bajos en cada uno de los índices calculados para este estudio (Cantillo y Gracia, 2013). *O. floribundum* es usada de manera indispensable en los diferentes procesos de restauración ecológica, dada la importancia de generar conectividad con relictos de bosque nativo o áreas cercanas recientemente incluidas en el proceso de restauración ecológica en los Cerros Orientales, dichos procesos permiten la

Evaluación de crecimiento y desarrollo de las especies plantadas y que durante el proceso de intervención fueron plantados en módulos de especies nativas, estableciéndose en forma de anillo; dentro de las especies más usadas están: *Xylosma spiculiferum*, *Myrcianthes leucoxylla*, *Lycianthes lycioides*, *Oreopanax floribundum*, *Clusia multiflora*, *Morella pubescens* (Moreno, 2014).

Son arboles medianos a grandes, 20 m de altura, ramas con cicatrices anilladas y hojas nuevas con indumento denso café. Hojas digitado lobuladas con estípulas lineares agrupadas al final de las ramas, haz verde oscuro lustroso, envés amarillento o pardo con tomento fino; peciolo variable en longitud y dilatado basalmente. Lámina con 5-9 lóbulos, base cordada, borde dentado y de consistencia coriácea. Inflorescencia en panículas grandes terminales hasta de 35 cm de longitud, muy ramificada; ejes con tomento pardo amarillento y con una estipulilla en la base de cada ramificación; flores pequeñas verde amarillentas, inmersas en tomento dorado y dispuestas en cabezuelas alargadas. El fruto es una drupa globosa dispuesta en grupos al final de los ejes, con cáliz y estilo persistentes. Especie con un gran potencial ornamental debido a la vistosidad de su follaje y a su hábito de crecimiento (UDCO, 2008).

Su propagación se da por semillas y por regeneración natural. Por semillas los frutos maduros se secan al sol para luego extraer las semillas que se siembran en semillero a medio centímetro de profundidad dejando 5 cm de distancia entre una y otra, en hileras separadas entre sí por 10 cm. Cuando las plántulas alcanzan los entre 5 y 10 cm de altura se trasplantan bolsas y cuando alcanzan entre 20 y 30 cm de altura se siembran en el lugar definitivo.

Floración: de diciembre a febrero, fructificación: de febrero a julio, recolección de frutos: julio. Caída y renovación de follaje: pierde parcialmente sus hojas después de la fructificación, Sus semillas son dispersadas por aves (Mahecha *et al.*, 2004).

El mano de oso presenta una apariencia general muy ornamental, Por su crecimiento rápido es fácil cultivar. Su madera utilizada para elaborar guitarras, cajas para dulces, utensilios de cocina. Ecológicamente el árbol protege la ribera de los ríos. Inductor de procesos de restauración en bosque. Además, produce buena hojarasca importante para el ciclaje de nutrientes (Mahecha *et al.*, 2013).

#### 6.4. *Diplostephium rosmarinifolius* – Romero de paramo

##### **Taxonomía - *Diplostephium rosmarinifolius*.**

Nombre Científico: *Diplostephium rosmarinifolius*

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Diplostephium*

Epíteto específico: *rosmarinifolius*

Determinador: Cuatrecasas, J.

*Diplostephium* pertenece a la familia Asteraceae al a tribu Astereae y a la subtribu Hinterhuberineae (Neson y Robinson, 2007). Es un género de árboles y subarbustos que hacen parte de la flora del límite superior de los bosques andinos, paramo y punas en las montañas del geotrópico, que van desde Costa Rica hasta el norte de Chile, el género comprende 111 especies de las cuales se han reportado 63 especies para Colombia (Vargas y Madriñan, 2006). Dos para Costa Rica (Sistema de información de INBio, 2005); 9 para Venezuela (Badillo, 1996); 2 para Ecuador (Ulloa y Jorgensen, 2004), y 37 para Perú (Brako y Zarucchi, 1993) en los páramos se considera el tercer genero más diverso con 70 especies después de *Pentacalia* y *Senecio* (Luteyn, 1999).

El romero de paramo alcanza una talla muy variable dependiendo del tipo de suelo el cual crece. En circunstancias óptimas llega a ser un árbol pequeño, con un único tronco algo reclinado, alcanzando unos 6 m de altura. Sin embargo, la especie es muy resistente y puede crecer también en suelos rocosos, donde, por la pobreza y dureza del terreno, a menudo permanece reducido a la talla de un arbusto de menos de 1 m

de altura. En cimas altas, expuestas al viento, estos pequeños arbustos a menudo adoptan interesantes formas retorcidas, que recuerdan un bonsái.

Al igual que muchos otros miembros de su familia (las asteráceas o compuestas), el romero de paramo tiene flores que producen un perfume muy agradable y que son muy atractivas para una gran variedad de insectos: entre ellos moscas, abejas y mariposas. Estos las visitan asiduamente y liban su néctar. Una vez polinizadas las flores, se desarrollan los frutos, que vienen provistos de pequeños “paracaídas” (como los del diente de león), para ser llevados lejos por el viento. Tiene como fauna asociada insectos entre ellos las siguientes especies: abeja doméstica (*Apis mellífera*), mariposas y polillas (Lepidoptera) y moscas (Tachinidae y otras familias). Esta especie es ornamental y puede ser plantada en jardines; se adapta con facilidad a suelos duros y secos, apropiada para la restauración de canchales y terrenos erosionados (OPEPA, 2015).

#### **6.4.1. Enfermedades.**

##### **Escoba de bruja – Fasciación.**

La escoba de bruja del cacao es causada por el hongo *Moniliophthora perniciosa* (Aime y Phillips-Mora, 2005), se caracteriza por la proliferación de yemas apicales y axilares en ramas de cacao. Fue descubierta en Surinam en el año 1895 (Garcés, 1946). Fasciación, es un término proveniente del latín fascia, que significa fusión. Bajo este término son referidas las alteraciones morfológicas en plantas que se caracterizan como una distorsión que afecta órganos vegetativos y reproductivos tales como el aplanamiento de estructuras cilíndricas como tallos y raquis, fusión de órganos y apéndices que típicamente están separados, la expansión lateral de un órgano en su punto de crecimiento, el alargamiento de un eje o la proliferación de folíolos (White 1948). La Fasciación afecta dicotiledóneas y monocotiledóneas de 39 familias de plantas y 86 géneros (Goethals *et al.*, 2001). Puede ocurrir en tallos, raíces, hojas, botones florales y frutos debido a diversas causas tales como balance hormonal,

mutaciones en células meristemáticas, infecciones por microorganismos, ataque de insectos y daños químicos o mecánicos que en algunas especies de plantas pueden ser heredables.

Malaguitig (2012) afirma que con el nombre de “Escoba de bruja” se le conoce a un cuadro sintomatológico característico (brotes múltiples, entrenudos cortos, hinchazones y deformaciones de las ramas, hojas reducidas) de etiología diferente o desconocida, ya sea en plantas leñosas o herbáceas. Ciferri (1994); Posnette y Palma (1944), encontraron que los árboles de *Erythrina* en especial árboles de cacao y café son los más susceptibles a la llamada “Escoba de bruja” primero ataca las ramas más jóvenes, luego se extiende a todas las ramas hasta ocasionarles la muerte y llevando a la muerte el árbol completo. Por otro lado; algunos especímenes de *Echeveria pumila* cv. “Glauca”, presentan la sintomatología de Fasciación con reducción del área foliar y a la proliferación, esto síntomas en estudios anteriores han sido relacionadas con fitoplasmas (Andreu y Gómez, 2007) o bacterias como *Rhodococcus fascians* (Norimoto *et al.*, 1980).

En la mayoría de los casos los síntomas que son producidos por los fitoplasmas son el amarillamiento o bronceado, enanismo, entrenudos cortos, flores estériles, frutos y semillas anormales, proliferación de raíces aéreas (desarrollo de apariencia de escoba de bruja) y crestas (OIRSA, 2005) Se estima que la bacteria *Rhodococcus fascians* es G+, un actinomiceto fitopatógeno que en una amplia gama de plantas induce brotes modificando el fenotipo, por la activación de los meristemos axilares y formación de meristemos de novo ( De O Manes *et al.*, 2001).

## **7. Materiales y métodos**

### **7.1. Localización**

La primera fase del trabajo se realizó en el vivero del jardín botánico de Bogotá; que se encuentra ubicado en el municipio de Cota Cundinamarca, en la vereda la Florida dentro de la concesión del parque metropolitano la Florida en la Autopista Medellín Kilómetro 2 y límite occidental de la localidad de Engativá.

La segunda fase del proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de Biología y Microbiología en las instalaciones de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD) sede José Celestino Mutis, ubicado en la Calle 14S #14, Bogotá.

### **7.2. Material vegetal**

En el vivero se tomó material de las especies de Romero de Paramo (*Diplostephium rosmarinifolius*) y mano de oso (*Oreopanax floribundum*) con una edad menor de un año de crecimiento, se tomaron los individuos al azar y se llevó toda la planta en bolsas plásticas al Laboratorio de la UNAD para ser procesados.

### **7.3. Identificación de síntomas**

Se tomaron 10 individuos de cada una de las especies vegetales analizadas, que presentaban síntomas en hojas, tallo y raíz, se realizó la descripción de lo observado, para poder asociarlo a una enfermedad ya caracterizada o posiblemente nueva. La identificación de las enfermedades se basó en los autores que se encuentran en la Cuadro 1. La frecuencia de los síntomas se comparó mediante un test de chi-cuadrado, teniendo en cuenta que esta prueba estadística se utiliza para comparar variables categóricas como los conteos. El valor de significancia utilizado fue del 5%.

Cuadro 1. Identificación de los síntomas por especie.

Especie	Síntoma	Fuente
<i>Diplostephium rosmarinifolius</i>	Hojas reducidas	Presente estudio
	Proliferación foliolos	White, (1948) Malaguitig, (2012), CABI, 2011.
	Entrenudos cortos	Norimoto <i>et al.</i> (1980). Malaguitig (2012)
	Deformación ramas y Fasciación pronunciada	Goethal <i>et al.</i> (2001), Andreu y Gómez (2007).
	Marchitamiento	White, (1948)
	Secamiento de raíz y raíz aérea	Presente estudio
<i>Oreopanax floribundum</i>	Clorosis y pre necrosis	Arguedas (2008). Varón & Sarria (2006)



#### **7.4. Identificación partes afectadas**

Con base en la descripción de los síntomas en el numeral 7.3. Se realizó la caracterización de las partes afectadas encontradas en los individuos analizados. Se encontró que las sintomatologías eran de características similares en todos los individuos, es decir en la totalidad de los individuos la expresión de los síntomas se dio de manera homogénea sin diferencia alguna de un individuo a otro. Lo que permitió determinar que dichos signos eran provocados por el mismo patógeno.

#### **7.5. Aislamiento de patógenos**

Se seleccionó las lesiones generadas por los síntomas en *O. Diplostephium* realizando cortes de las hojas afectadas y en *D. rosmarinifolius* la parte seleccionada fueron los tallos que presentaban faciación y entrenudos cortos; luego de esto se realizó un proceso de desinfección que consistió en introducir los cortes de tejido de aproximadamente 0,5 cm, en Etanol al 70% por un minuto, luego en NaOcl al 1% por un minuto, finalmente se lavó el tejido en agua destilada y se retiró el exceso de humedad, toda la manipulación del tejido vegetal se realizó con pinzas estériles y en un ambiente de total asepsia.

Con las muestras de tejido desinfectadas se procedió a sembrar tres cortes de tejido equidistante por 1 caja de Petri, teniendo un total de 4 cajas en agar papa dextrosa (PDA) (Referencia 01-483-500, Marca Scharlu®) medio para el crecimiento de hongos y una en agar nutritivo (AN) (referencia 01-140-500, marca Scharlau®) para el crecimiento de bacterias con el fin de descartar presencia de éstas. El número de siembras se realizó igual tanto para *D. rosmarinifolius* y *O. floribundum*. Las siembras realizadas en el medio de cultivo nutritivo fueron llevadas a incubación por 24 horas a 37°C y las sembradas en medio de cultivo PDA a incubadora a temperatura ambiente de 6 a 8 días para evidenciar los primeros crecimientos de colonias.

## **7.6. Purificación de patógenos.**

Con las primeras cepas de los patógenos aislados, se realizaron montajes en azul de lactofenol; realizando un corte superficial con una asa recta directamente de la colonia en el medio de cultivo y poniendo el corte sobre una lámina porta objeto y cubriéndolo con una laminilla para luego ser observadas en el microscopio en 40x; se encontraron patógenos del ambiente y/o contaminantes como *Asperguillus* sp., *Rizhopus stolonifer* se separaron de los fitopatogenos encontrados. De los fitopatogenos identificados se tomó un inóculo de la colonia y se realizó un aislamiento nuevo en PDA (Referencia 01-483-500, Marca Scharlu®) y así sucesivamente con todos los patógenos hasta obtener el cultivo del fitopatogeno puro.

## **7.7. Caracterización de patógenos.**

Para identificar los patógenos, una vez se obtuvo la cepa del patógeno pura, se realizaron montajes de manera directa con aguja estéril en azul de lactofenol y se observaron al microscopio en 40x, se identificaron las estructuras basados en los géneros de la guía ilustrada de hongos imperfectos de Barnett (1972).

## **7.8. Análisis estadístico**

Para evaluar estadísticamente las frecuencias respectivas a los conteos, se realizó una prueba de chi – cuadrado mediante el programa estadístico R, en donde se comparó la frecuencia observada (Síntomas y partes afectadas) en las dos especies vegetales trabajadas, con la frecuencia esperada, esto se hizo con el fin de obtener diferencias significativas entre frecuencias.

## 8. Resultados y discusión

### 8.1. Especie de *D. rosmarinifolius*

#### 8.1.1. Descripción de los síntomas

Con base en la literaria reportada para los síntomas encontrados en *D. rosmarinifolius* se caracterizaron los síntomas descritos en las (Cuadro 1).

En el Cuadro 2, se encuentra de manera detallada los síntomas identificados en las diferentes partes de los individuos de *D. rosmarinifolius*, así como una imagen que permitirá ubicar de mejor manera la manifestación de cada uno de los síntomas.

Cuadro 2: Descripción de síntomas en *D. rosmarinifolius*





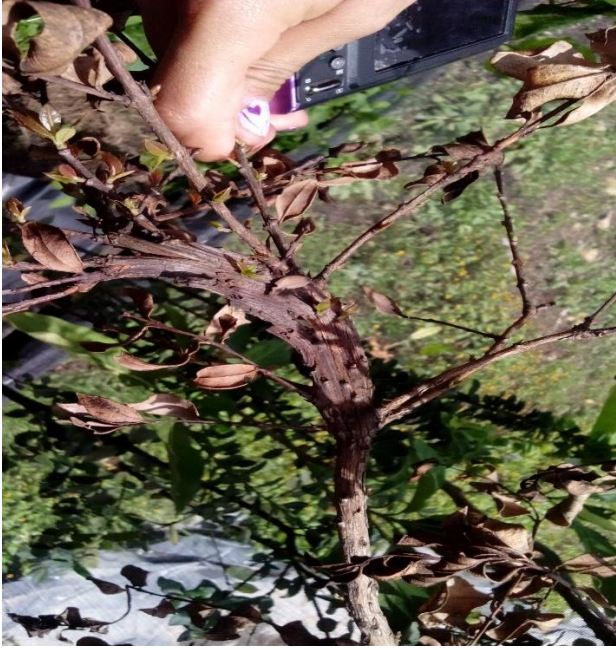

Síntoma	Descripción	Foto	Patógeno
Hojas reducidas	Durante la proliferación de foliolos, estos se tornan de tamaño anormal e inferior al que se presenta en un individuo sano.		<i>Fusarium</i> sp.
Proliferación de foliolos	Crecimiento en número exagerado de foliolos de manera desordenada, sobre las ramas y en el fuste de los individuos analizados.		<i>Fusarium</i> sp.

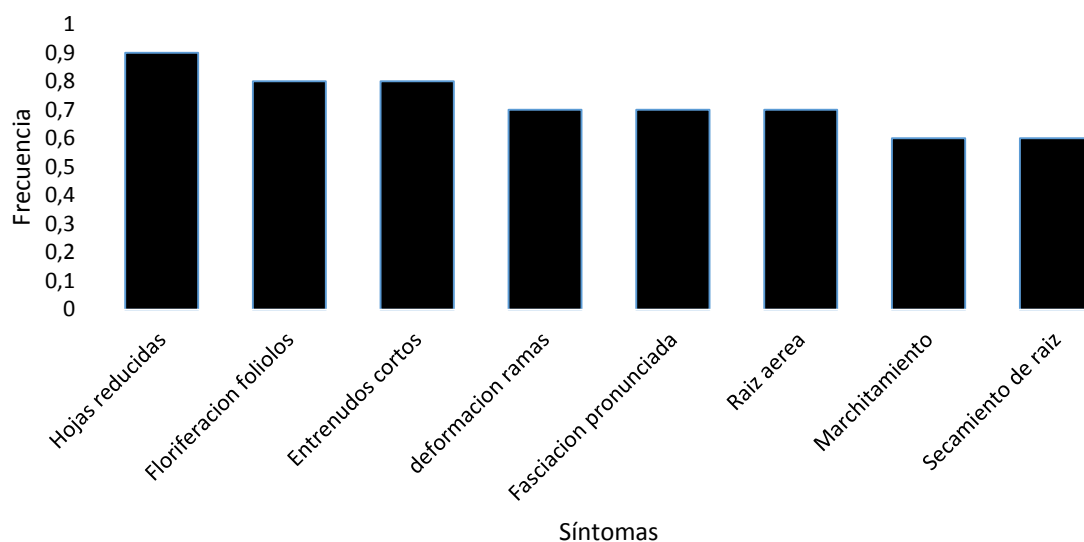
		Foto: Arguedas, 2008	
Fasciación pronunciada y deformación de ramas	Presencia de estructuras y tejidos anormales, de aspecto aplanado en tallos. Tejidos de las ramas engrosados.	 <p>Foto: Arguedas, 2008</p>	<i>Fusarium</i> sp.
Entrenudos cortos	Entrenudos cortos, hinchados, de medida no característica para la especie vegetal.		<i>Fusarium</i> sp.

<p>Marchitamiento</p>	<p>Se presenta en la fase terminal de la enfermedad, presentando marchitamiento en la totalidad de los foliolos, finalizando con la muerte total del individuo.</p>		<p><i>Chaetomella</i> sp.</p>
<p>Raíz aérea</p>	<p>Presencia de raíz sobresaliente a la superficie.</p>	 <p>Proliferación de raíces aéreas en Maíz.</p>	<p><i>Fusarium</i> sp.</p>



### 8.1.2. Análisis de frecuencia de los síntomas.

Se reportaron ocho síntomas; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas a nivel de su frecuencia ( $\chi^2 = 1,034$ ,  $df = 7$   $p = 0,994$ ) la cual osciló entre el 60% - 90% (Figura 1).



en particular, afectando todas las partes de la planta de manera homogénea (Figura 2).

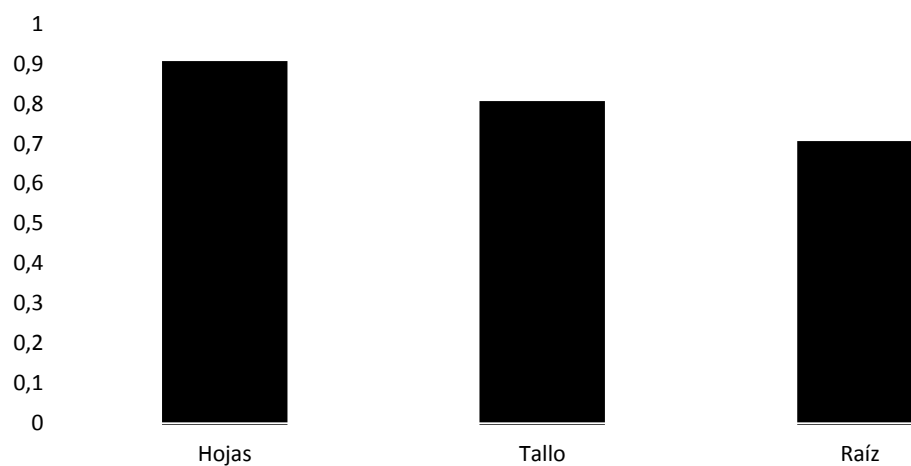


Figura 2. Frecuencia partes afectadas en individuos de *D. rosmarinifolius*.

### 8.1.3. Patógenos identificados

Se identificaron colonias de *Fusarium sp.* de color blanco algodonosas, con pigmentos color crema, en el medio de cultivo cambiaba de color rosa a salmón. En el montaje en el microscopio se observaron hifas hialinas septadas y delgadas, abundantes macroconidias fusiformes y septadas, escasas microconidias elipsoidales (Figura 3).

En relación con este patógeno, el 100% de los síntomas fueron expresados en *D. rosmarinifolius*, el 80% de estos están asociados a la enfermedad denominada escoba de bruja, dichos síntomas son predominantes en los individuos analizados mientras que la reducción de folíolos y la presencia de raíces aéreas como el secamiento de la mismas, no están enteramente asociados a la enfermedad mencionada ni a el patógeno encontrado, se estima que estos dos síntomas se deban a un factor físico por deshidratación o deficiencias de nutrientes en el sustrato; se tiene reportes de escoba de bruja por *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*, en *Mangifera indica* L. (Mora *et al* 2003) generan síntomas similares a los mencionados en la (Tabla 2) esto nos confirma la presencia de *Fusarium sp.*

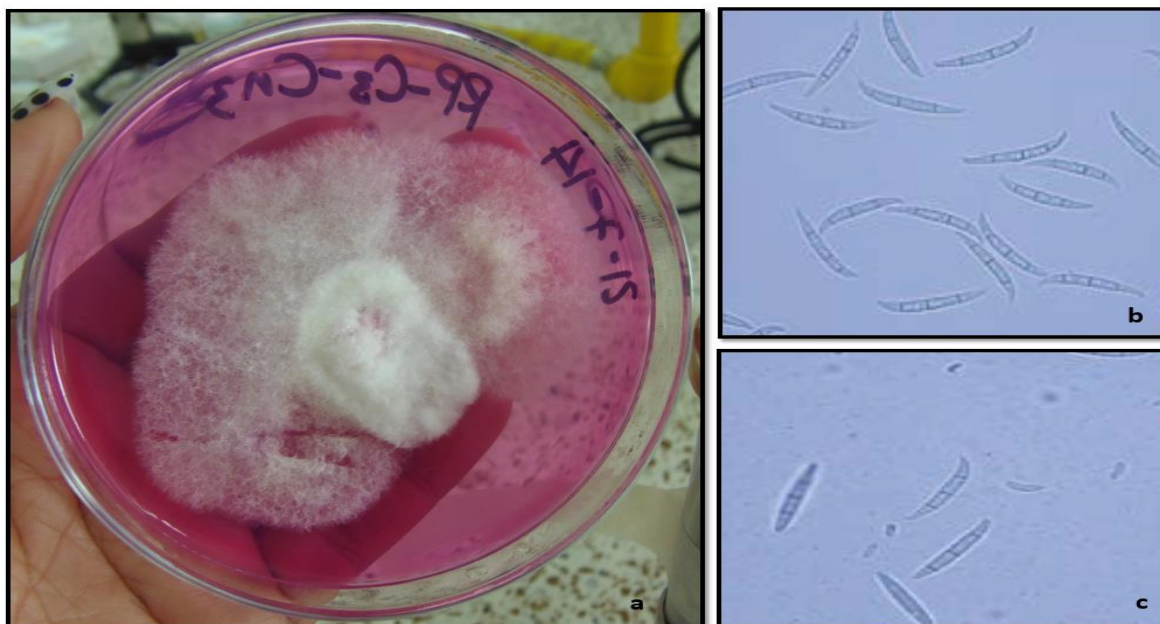


Figura 3. *Fusarium sp.* a. *Fusarium sp.* en medio selectivo. b y c. Macroconidias de *Fusarium sp.*

Otro patógeno que se identificó fue *Chaetomella* sp., macroscópicamente se observó colonias de color marrón oscuro a verde oscuro, con hifas sumergidas, y micelio aéreo, de aspecto grumoso y/o arenoso (Figura 4, a y b) microscópicamente se observaron picnidios reniformes de color negro que generalmente abren por un solo rafe longitudinal, con setas flexuosas, espiraladas y/o a veces rectas que se desarrollan desde la región de la pared externa. Hialina interna color marrón con presencia de conidióforos (Figura 4).

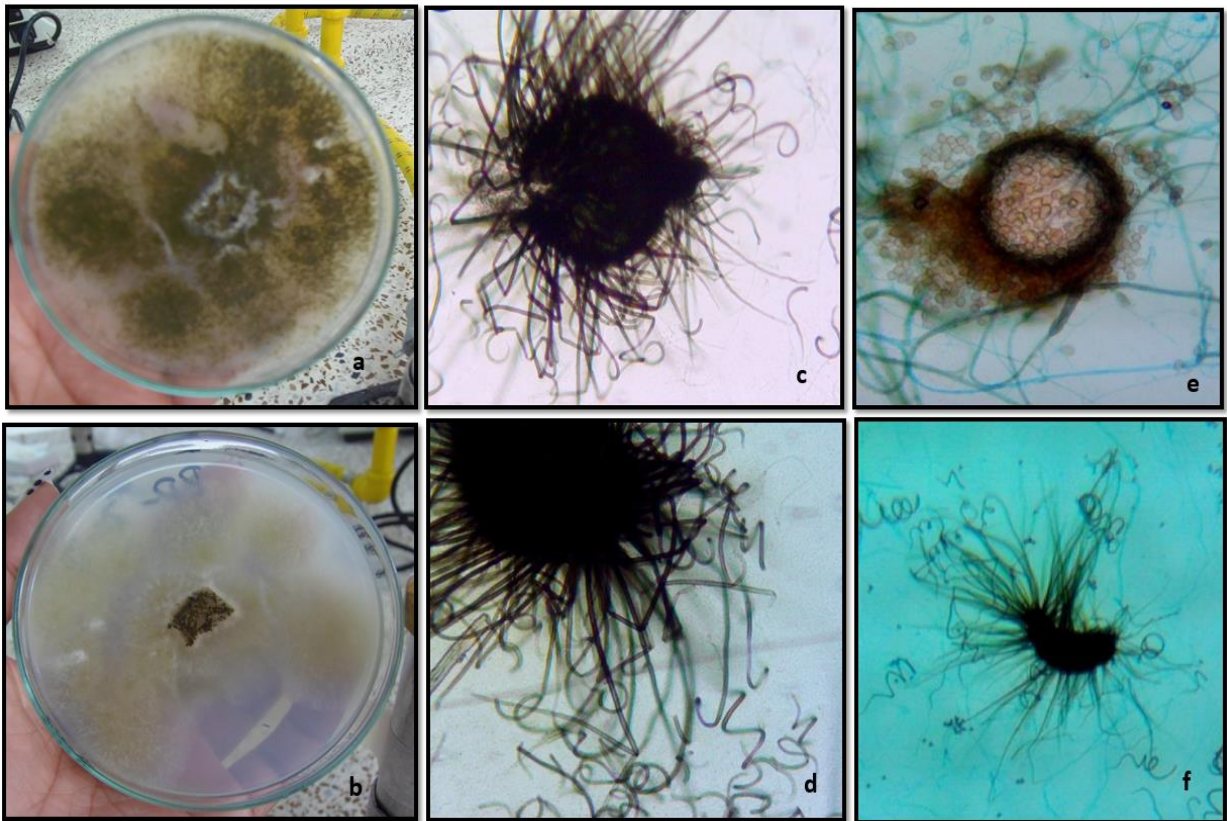


Figura 4. *Chaetomella* sp. Visto desde medio de cultivo a microscópicamente. A. *Chaetomella* sp. 12 días de crecimiento; b. *Chaetomella* sp. 8 días de crecimiento; c. Picnidio de *Chaetomella* sp. Rafe longitudinal; d. Picnidio de *Chaetomella* sp. Setas flexuosas y rectas; e. Hialina interna de *Chaetomella* sp. Presencia de conidióforos. f. Vista en 40x de Picnidio completo cerrado de *Chaetomella* sp.

El género *Chaetomella* es relativamente nuevo, algunos de los géneros de coelomicetos como *Chaetomella fuckel* y *Pilidium kunze* se encuentran con frecuencia como hongos asociados a plantas (Farr *et al.*, 2004) y aislados del suelo




(Sutton, 1980). Se desconoce la patogenicidad de *Chaetomella sp.*, al no tener casos reportados de este en individuos forestales; se conoce de una enfermedad en *Cuphea sp.* Cuyos síntomas inician con la aparición de pequeñas lesiones de color marrón claro a oscuro en las hojas inferiores, estas gradualmente aumentan de tamaño, afectando simultáneamente las hojas superiores, dando a las plantas un aspecto deteriorado a veces, el tallo también muestra manchas regulares (Sing *et al.*, 1999). A diferencia de *Cuphea sp.*, *D. rosmarinifolius.*, no presento los síntomas de manchas en hojas, esto puede deberse a que este síntoma aparece en la fase terminal de la enfermedad o puede que no se expresen en *D. rosmarinifolius* dada su fisiología.

## 8.2. Especie de *O. floribundum*

### 8.2.1. Descripción de los síntomas

Se encontró para *O. floribundum* un total de dos síntomas (Cuadro 3).

Cuadro 3: Descripción de síntomas en *O. floribundum*

Síntoma	Descripción	Foto	Patógeno
Pre necrosis Clorosis	Presencia de manchas foliares localizadas en el haz de los folíolos, centro café pardo, acompañadas de un halo clorótico profundo. Manchas distribuidas en todo el folíolo.		<i>Curvularia</i> sp. <i>Alternaria</i> sp.

### 8.2.2. Análisis de frecuencia de los síntomas.

Estos síntomas presentaron valores similares entre si ( $\chi^2 = 1,285$ ,  $df = 1$   $p = 0,256$ ) oscilando entre el 25-50% (Figura 5).

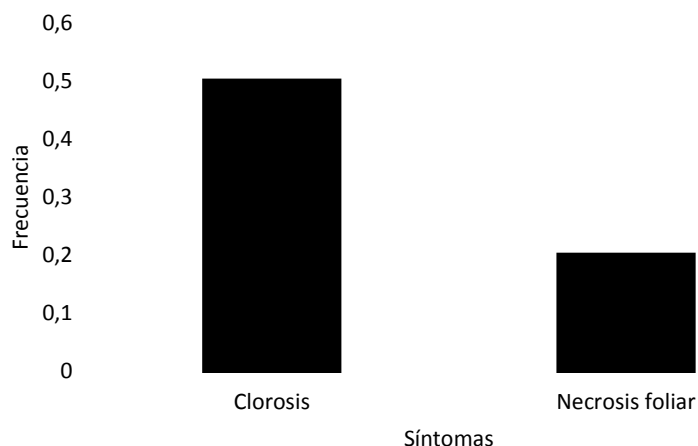


Figura 5: Frecuencia de síntomas en *O. floribundum*.

En el caso de *O. floribundum* se encontró asociación significativa entre la estructura y la incidencia de los ataques ( $\chi^2 = 14$ ,  $df = 2$   $p < 0,05$ ), siendo las hojas la estructura más afectada con una frecuencia del 70%. No se registraron ataques sobre otras estructuras de la planta como el tallo o la raíz, entendiéndose así que los dos patógenos encontrados para esta especie usa como estructura de ataque el follaje únicamente (Figura 6).

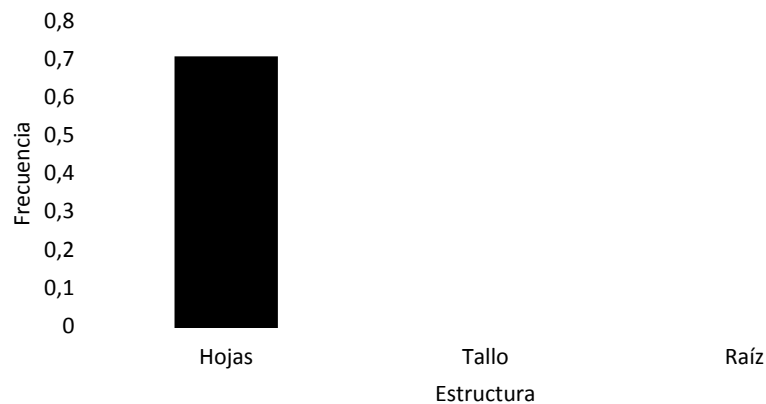


Figura 6. Frecuencia partes afectadas en individuos de *O. floribundum*

### 8.2.3. Patógenos identificados

Se encontró presencia de *Alternaria sp.* con colonias de aspecto veloso, al principio de color gris, después adquiere tonos negros olivá-ceos en el centro y reverso con un borde gris blanquecino que rodea la colonia cuando esta se encuentra en estado joven, el medio de cultivo vira hacia un tono café oscuro o marrón hasta llegar a negro cuando las colonias van envejeciendo. En la observación microscópica, conidióforos simples, tabicados, de forma alargada u ovoide. En el extremo del conidióforo se forman unos conidios de color pardo, con septos transversales y verticales (muriformes) de disposición irregular (Figura 7).

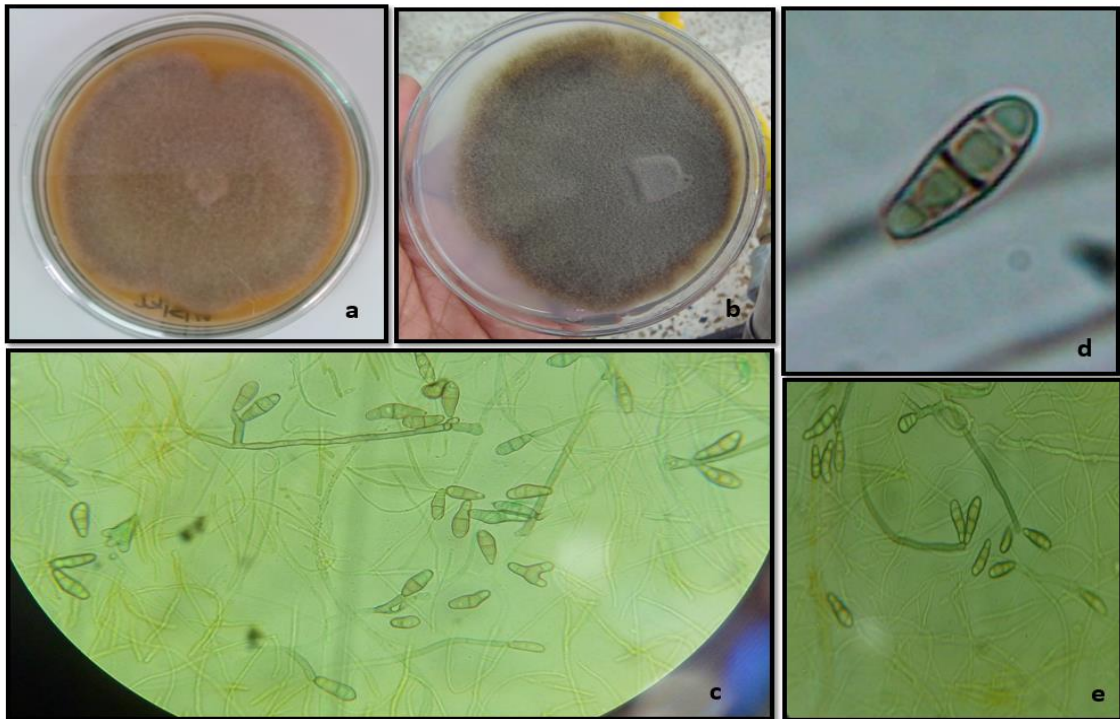


Figura 7. *Alternaria sp.* Vista macro y microscópica. a. *Alternaria* estado joven. b. *Alternaria sp.* Colonias maduras. c. Conidióforos de *Alternaria sp.* d. Conidio de 4 septos de *Alternaria sp.* e. Conidios desprendidos de los conidióforos.

Se identificó un segundo patógeno *Curvularia sp.* a nivel macroscópico se encontró colonias de tipo algodonosas que en fase inicial de crecimiento toman un color blanco, en estado de madurez se tornan de gris oscuro a café oscuro. El medio de cultivo vira de color café oscuro a negro. En sus estructuras microscópicas se observaron hifas septadas dematiáceas. Conidióforos doblados en los puntos donde se originan las conidias. Conidias curvadas, con 3 a 4 septos transversales, por lo general el segundo septo después de e apical es más grande que los otros; lo que hace que la estructura de las conidias sea curva (Figura 8).

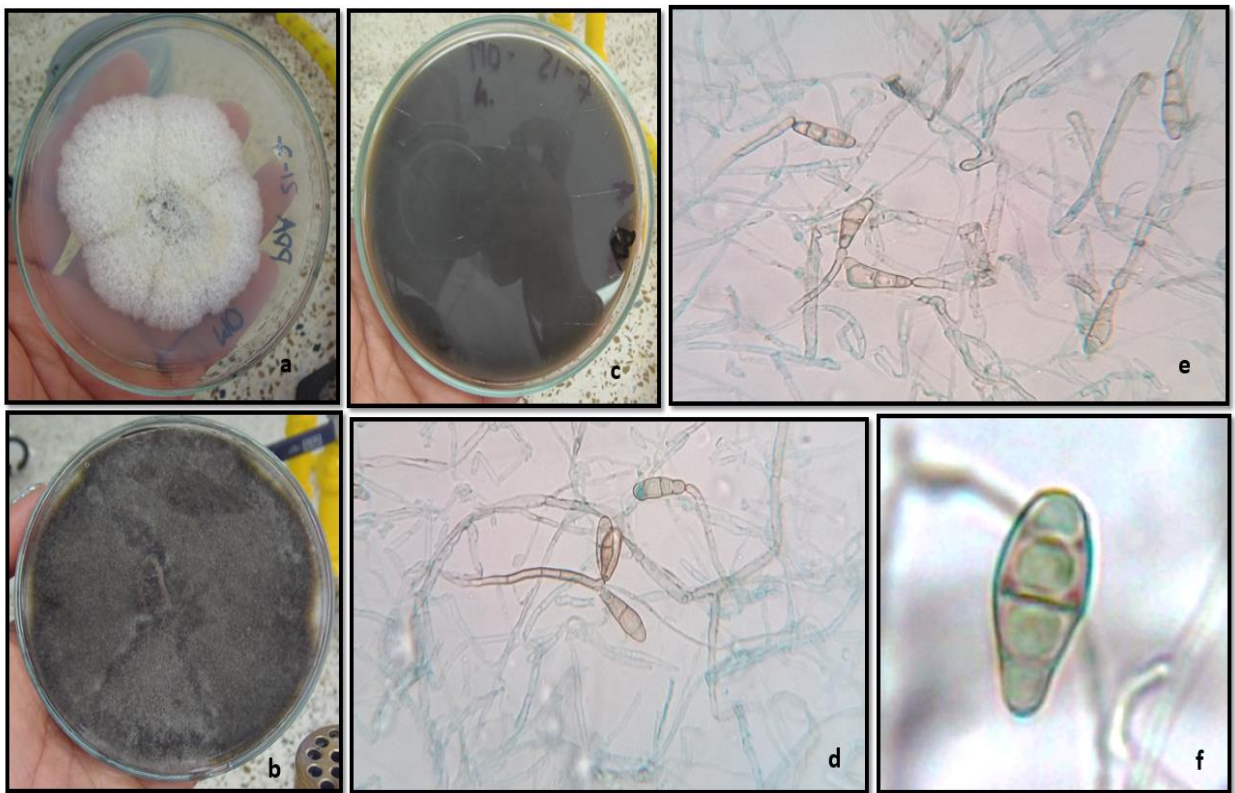


Figura 8. *Curvularia sp.* a. Colonias de 7 días de crecimiento; b. Colonias maduras, 12 días de crecimiento; c. Viraje del medio de cultivo; d. Hifas septadas de *Alternaria sp.*; e. Conidios curvados; f. Conidio curvado, segundo septo de mayor tamaño.

La presencia de *Alternaria sp.* y *Curvularia sp.* Identificados en *O. floribundum* generan los síntomas que se presentan en las hojas de los individuos estudiados. Pueden causar diferentes tipos de daños en hojas, tallos, flores y semillas, que abarcan desde pequeñas manchas hasta lesiones de mayor tamaño (Jin, 1991), lo que se

confirma que los patógenos están directamente relacionados con la enfermedad a la que se le denomina mancha foliar; esto explica el porqué de los resultados de la frecuencia de partes afectadas (Figura 6).

Una vez las hojas presentaban las manchas cloróticas, estas se tornaban con aspecto pre necrótico, producto de la fase final de la enfermedad. Ahora bien, si durante la propagación en vivero no se tiene el manejo adecuado tanto en sustratos, selección de semillas, y recurso humano, las plántulas siempre estarán expuestas a este tipo de patógenos; ya que uno de los métodos de transporte de esporas de estos patógenos, se hacen a través de las corrientes de aire, insectos, polen etc.

## 9. Conclusiones

Se presentó una relación estricta entre *Fusarium sp* y los síntomas de escoba de bruja encontrados en *D. rosmarinifolius*, pero para el secamiento de raíz y marchitamiento no se encontró reportes de que estos síntomas hayan sido causados por la presencia de *Fusarium sp.*, el marchitamiento en la fase final de la enfermedad puede deberse a la muerte total de la planta y por ende resultado de los demás síntomas que se dan al tiempo en la planta.

Se confirmó la acción directa de los patógenos *Curvularia sp* y *Alternaria sp* en *O. floribundum*, ambos generan los mismos síntomas en la planta hospedera, los dos patógenos tiene preferencia directa por los foliolos.

Se recomienda realizar otro tipo de análisis para determinar la influencia directa de *Chaetomella sp* en *D. rosmarinifolius* para saber si se puede asociar los síntomas de marchitamiento de la planta y secamiento de la raíz, a este patógeno; ya que los reportes de enfermedades producto de la presencia de *Chaetomella sp* hablan de presencia de manchas de color pardo en las hojas y este síntoma no se encontró en *D. rosmarinifolius*.

## 10. Bibliografía

- Aime, M.C. y Phillips-Mora, W. (2005). The causalagents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (Chocolate, *Theobroma cacao*) from a new lineage of Marasmiaceae. *Mycology* 97(5),1012-1022.
- Andreu R C, S J R Gomez. 2007. La sanidad vegetal en la agricultura Sostenible. Fejío. Cuba. pp. 410-412.
- Arguedas, M. 2008. Clasificación de síntomas de enfermedades forestales. Segunda parte. Kurú: Revista Forestal (Costa Rica) 5 (15). Instituto tecnológico de Costa rica.
- Badillo, V. Los generos de la compositae (Asteraceae) de Venezuela: Clave artificial para su Determinacion. *Ernsta* 6 (2-3): 51-168.
- Barnett, H.L. y Hunter, B.B. (1972). Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Company. Minneapolis, MN, USA. 241 p.
- Brako. L. & J. L. Zarucchi. 1993. Catalogue of the flowering plants and Gymnosperms of Perú. Monographs in systematics Botany from the Missouri Botanical Garden. N° 45 missouri Botanical Garden. San luis.
- Browning, JA. (1980). Genetic protective mechanism of plantpathogen populations: their coevolution and use in breeding for resistance. pp. 52-75. En: Harris, MK. Ed. Biology and Breeding for resistance to arthropods and pathogens in agricultural plants. Texas Agric. Stra. College Station, TX.
- CABI. 2011. Crop Protection Compendium. Global module 7nd. Edition CAB International. UNK.
- Cantillo, E. y Gracia, M. (2013). Diversidad y Caracterización florística de la vegetación natural en tres sitios de los cerros orientales de Bogotá D.C. *Colombia Forestal* 16(2), 228-256.
- Cantillo, E. Rodríguez, K. y Avella, E. (2008). Caracterización florística, estructural, diversidad y ordenación de la vegetación, en la reserva forestal Cárpatos, Guasca,



- Cundinamarca. Centro de Investigaciones de la Universidad Distrital “Francisco José de Caldas”. Bogotá, D.C.
- Chavarriaga, D. (2011). Protección fitosanitaria forestal. Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Código Libro ICA 02.06.02.10C. ISBN: 978-958-8214-77-. 229 p. Colombia. Sur América.
- Ciferri, R. (1949). La escoba de bruja en algunos árboles de sombrero del cacao (*Erythina* y *Tabebuia*) en Venezuela una enfermedad de origen no criptogámico. *Rev. Fac. Nac. Agron.* 10, 143-147.
- FAO (2010). Evaluación de los recursos forestales mundiales 2010. Informe Nacional: Colombia. Documentos de trabajo de la Evaluación de los Recursos Forestales Mundiales.
- Farr D F, Rossman AY, Palm M E, Mccray E B (2004) Fungal Databases, Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved February 26, 2004, from <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>.
- Flores, Olivas, Alberto., et al. 1997. Nuevas tecnologías en la obtención y análisis genético de fitopatogenos. Tomado de Fitopatología. (Mex) 32(2).
- Garcés, C. (1946). La escoba de bruja del cacao. *Revista Facultad de Agronomía de Medellín, Colombia.* 6(24), 329-369.
- Garcia, H. (2014). Deforestacion en Colombia: Retos y perspectivas. Fedesarrollo. 28 pp. Colombia.
- Goethals, K., D. Vereecke, M. Jaziri, M. Van Montague y M. Holsters. (2001). Leafy gall formation by *Rhodococcus fascians*. *Annual. Rev. Phytopathol.* 39, 27-52.
- Gómez, C. (2009). Sanidad Forestal: plagas de insectos forestales en plantaciones de *Pinus* sp, 13 pp. Universidad nacional de la Patagonia, SENASA. Argentina. Sur América.
- IGAC y CORPOICA (2002). Zonificación de los conflictos de uso de las tierras en Colombia.

- Jin, M. Z. 1991 «Preliminary Study of Discolored Rice Grain Caused by *Curvularia*», Seed Pathology and Microbiology, CAB Abstracts, 2(295):33.
- Luteyn, J. (1999). Paramos: A Checklist of plant diversity, geographical distribution, and Botanical literatura. New York Botanical Garden.
- Maecha, G., Ovalle, A., Camelo, D., Rozo, A. y Barrero, D. (2013). Vegetación del Territorio de la CAR, 450 especies de sus llanuras y montañas. Segunda edición.
- Mahecha, G., Ovalle A., Camelo, D., Rozo, A., Barrero, D. (2004) Vegetación del territorio CAR. 450 especies de sus llanuras y montañas. Bogotá, Colombia.
- Malaguitig, G. (2012). Instituto Nacional de Agricultura, División de Fitopatología. Escoba de bruja en varios árboles. Division de Fitopatologia. Instituto Nacional de Agricultura 634.1/9:632.8 (87). Caracas, Venezuela.
- De O Manes C – L, T. Beeckman, T Ritsema, M. Van Montagu, K Goethals, M Holsters (2004) Phenotypical alterations in arabidococcus fascians infección. J Plants Rest. 117: 139-145.
- Mora Aguilera, Antonio, Téliz Ortíz, Daniel, Mora Aguilera, Gustavo, Sánchez García, Prometeo, Javier Mercado, Javier, Progreso temporal de ´escoba de bruja´ (fusarium oxysporum y f. subglutinans) en huertos de mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden en Michoacán, México Revista Mexicana de Fitopatología [en línea] 2003, 21 (enero-julio): [Fecha de consulta: 3 de octubre de 2017] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221101> ISSN
- Moreno, E. (2014). Proyecto de Restauración Ecológica, Rehabilitación y/o Recuperación de áreas alteradas en el D. C y la Región. F.06-JBB.V1. 70 pp. Subdirección Científica. Jardín Botánico Jose Celestino Mutis. Bogotá. Colombia.
- OIRSA, 2005. Manual Técnico de Fitosanidad en plantas ornamentales y Follajes. OIRSA. El salvador.
- OPEPA, 2015 Disponibe en <http://opepa.org/wp/>

Sutton BC (1980) The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

Triviño, T, (1980). Certificación de semillas agrícolas y forestales. Nota de clase. Facultad de Agronomía, Universidad de Córdoba, Montería. 48 p. (mimeografiado).

Universidad católica de oriente UDCO. (2008). Catálogo Virtual Ilustrado de la Flora del Oriente Antioqueño. Recuperado de: <http://www.uco.edu.co/floraorienteanioquia/araliaceae/Oreopanax-floribundum-Decne-Planch/Paginas/default.aspx>

Valagro SpA, (2004). Los Microelementos de la nutrición vegetal. pp. 72. Italia.

Vargas O.M. & S. Madriñan. 2006. Clave para la identificación de las especies de *Diplostegium* (Asteraceae, Asterae) en Colombia. Revista de la Academia Colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales. 30(117): 489-494.

White, O.E. (1948). Fasciation. *Bot. Rev.* 14, 319-358.

Nesom, G. y H. Robinson. (2007). Tribe Astereae. pp. 284–342. En: Kadereit, J.W. and C. Jeffrey (eds). *The Families and Genera of Vascular Plants vol 8*. Springer, Berlin.

Posnette A, Palma M. 1944. Observations on cacao on the Paria Península. *Trop. Agricul.* 21(7):130-132.

Sistema de información de INBio. Julio 2005. <http://www.inbio.ac.cr>.

Varón de Agudelo, F & Sarria G A. 2006. Enfermedades del Maíz y su manejo. Compendio ilustrado. Ministerio de agricultura y desarrollo rural, Instituto colombiano agropecuario ICA. Palmira, Colombia. 56 pp.