

INSECTOS PORTADORES DE LA BACTERIA CAUSANTE DEL "CANCER DE MANGO" (*Mangifera indica*)^{1/*}

Miguel Quesada **
Amy Wang ***

ABSTRACT

Insect carriers of the bacterium causing the canker disease of mango (*Mangifera indica*). One of the most important and damaging diseases of mango (*Mangifera indica*) is the one known as "canker", caused by a bacterial agent, *Erwinia* sp. Two means of dispersal of this disease are infected scions used in mango propagation, and some of the insects associated with this tree. To obtain evidence regarding the latter, insects were collected biweekly in two infected orchards. The bacteria they carried were isolated, first in nutrient agar and then selected on Kado's D3 medium. Tests on potato disks were also conducted. Bacteria obtained were purified and inoculated on mango fruits. Those isolates that caused lesions were identified as the genera *Serratia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Erwinia*. The last one was isolated from *Dysdercus* spp., *Trigona* spp., *Apis mellifera*, *Ceratitis capitata* and *Anastrepha* spp.

INTRODUCCION

La bacteriosis en mango fue encontrada por primera vez en el Continente Americano en Venezuela y el agente fue identificado como *Erwinia mangifera*, bajo el nombre de mancha negra del fruto (Rondon y Figueroa, 1970). Después de este primer informe, diferentes investigaciones han dado resultados variados en cuanto a la identificación del agente causal, teniéndose en última instancia al género *Erwinia* con dos especies *E. mangifera* y *E. carotovora* (Guevara *et al.*, 1980). Posteriormente, esta primera especie *E. mangifera* es señalada como *E. herbicola* (Guevara, 1985). En Costa Rica, los síntomas de la enfermedad se comenzaron a observar en forma gene-

ralizada a mediados de 1987, aislándose en forma consistente a esta misma bacteria (Sáenz y Murillo, 1989).

Los síntomas que se observan en el mango son: en las hojas, manchas oscuras que se pueden tornar blancas y secas cuando viejas. Estas manchas pueden fusionarse y formar grandes parches, que producen exudados en las áreas verdes. La infección puede pasar a la inflorescencia y pecíolo, produciendo rajaduras longitudinales con bordes levantados (Rondon y Figueroa, 1970; Guevara *et al.*, 1979). La infección pasa posteriormente al fruto, a través de heridas causadas por insectos u otros agentes, a la base del pecíolo o en la piel; o por aberturas naturales como lenticelas y estomas produciendo la descomposición de la pulpa con necrosis (Díaz *et al.*, 1971). En el tronco y ramas, se observan lesiones longitudinales de las cuales sale un exudado gomoso de color oscuro que al secarse se pone negro, si se hace un corte al cancro, se ve una lesión pardo rojiza que avanza hacia la parte superior del árbol (Guevara *et al.*, 1985).

Se ha sugerido que dípteros que se alimentan de las secreciones gomosas del árbol de mango están involucrados en la transmisión mecánica de *Erwinia* (Soto y Lezama, 1980).

-
- 1/ Recibido para publicación el 2 de diciembre de 1991.
* Parte de la tesis de grado de Lic. en Ing. Agr. con énfasis en Fitotecnia, Universidad de Costa Rica.
** Laboratorio de Nematología, Escuela de Fitotecnia, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
*** Laboratorio de Fitopatología, Escuela de Fitotecnia, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica., San José, Costa Rica.

Si las condiciones ambientales son favorables al microorganismo patógeno, sobre todo la humedad relativa (superior al 80%), una precipitación mayor de 856 mm anuales o durante el riego por aspersión y temperatura entre 24-32°C, la población bacteriana se incrementa notablemente y se disemina rápidamente por insectos que visitan el árbol o por la lluvia y el viento, dándose la infección en flores y frutos (Guevara *et al.*, 1985). Este caso es similar al de la bacteria *Erwinia amylovora* causante del Fuego Bacteriano del Peral y Manzano, ya que este organismo sobrevive en forma epifítica en flores, frutos y hojas de árboles aparentemente sanos, así como en algunos insectos que la diseminan en la inflorescencia y tejidos jóvenes causando la infección primaria (López y Noval, 1988).

Debido al rápido incremento de la enfermedad y por la presencia, en general de altas poblaciones de insectos en las plantaciones, se consideró importante determinar el papel que juegan éstos en la diseminación de la enfermedad, y aportar un posible medio de control.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se llevó a cabo de abril a noviembre de 1989, mediante muestreos quincenales realizados en horas de la mañana, en plantaciones de mango en período de finalización de cosecha y etapa vegetativa que presentaban la enfermedad, ubicadas en el Cantón de Orotina, a una altitud de 200 msnm.

Esta investigación no llevó diseño, debido a la movilidad de los insectos y desuniformidad en cuanto a árboles afectados, lo que obligó a una selección al azar de 80 árboles, durante cada visita.

Se recolectaron los insectos ahí presentes utilizando una red entomológica y se colocaron de inmediato en forma individual en frascos de vidrio limpios. Una vez terminado el muestreo, se procedió a clasificarlos taxonómicamente en el Laboratorio de Entomología Económica y el Museo de Insectos de la Universidad de Costa Rica.

Concluida esta fase se hicieron aislamientos de la bacteria por dos métodos:

a-Incremento de la población original mediante la colocación de diferentes órganos (cabeza, tórax, abdomen, patas) sobre discos de papa e incubándolos por 24 h. Luego se aisló en

agar nutritivo a partir de tejido vegetal afectado y se seleccionó con el medio D3 de Kado que es específico para el crecimiento de *Erwinia* sp.

b-Se formó un caldo o suspensión con base en cada insecto; para esto, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1%, durante minuto y medio, se enjuagaron con agua destilada estéril y se incubaron por 24 h, para permitir a los microorganismos multiplicarse. Transcurrido ese tiempo, se procedió a distribuirlo en platos de Petri con agar nutritivo. Las colonias de bacterias que se desarrollaron se colocaron en un medio selectivo para favorecer su crecimiento.

Concluida esta fase, se procedió a purificar las colonias basándose en características como forma, elevación y margen, para luego conservarlos en agua destilada estéril y así promover su multiplicación. De esta manera se enviaron a la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, para ser llevados a una concentración estándar de 109 unidades formadoras de colonias (UFC) y de ahí se hicieron diluciones hasta llegar a una concentración de 104 UFC, que se consideró adecuada para inocular. Para la inoculación se utilizaron frutos frescos de mango, que fueron expuestos a un tratamiento térmico (en agua a 50°C por 10 min).

A cada uno de ellos se le inyectó 1 ml de la suspensión de bacteria preparada previamente. El área de inoculación se cubrió primero con papel de filtro, luego con papel de aluminio y por último con papel de parafina. Este punto fue humedecido diariamente por un lapso de 7 días. Los aislamientos positivos fueron identificados en la Facultad de Microbiología por medio de pruebas bioquímicas.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la etapa de campo se muestrearon 19 géneros, incluidos en los Ordenes Díptera, Lepidoptera, Coleóptera, Hymenóptera, Hemíptera; notándose diferencias en su captura, desde aquellos que aparecieron en una sola ocasión hasta los que estuvieron presentes todo el período de la investigación. Sin embargo, este porcentaje de aparición no estuvo directamente relacionado con el número total de individuos capturados; ejemplo de esto son *Dysdercus* spp. y *Apis* sp. con 79 y 43% respectivamente de frecuencia (Cuadro 1).

Cuadro 1. Fluctuación de la población de insectos capturados (desglosados por tipo de espécimen), Orotina, Alajuela. Abril a noviembre, 1989.

Insectos	Muestras													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Nitidulidae	25													
<i>Dysdercus</i> sp.	5		10	15		5	4	10	5	5	5		7	6
<i>Trigona</i> sp.	30	20	20	50					3	5		10	8	5
<i>Ceratitis capitata</i> *	25	30			5	20								
<i>Apis mellifera</i>		20		20	10	25	25	5						
Formicidae		20												
<i>Anastrepha</i> sp.*			20	15			20	25						
Reduviidae							2		4					
Saturniidae*					5						2	3		
Arctiidae*					4		3							
Coccinellidae						3	2							
Vespidae								5						
<i>Diabrotica</i> sp.								3	2	2				
Chrysomelidae							5			3	2			
Cercopidae							5	5						
<i>Nezara viridula</i>							5			5				
<i>Coccus</i> sp.								15			10			
<i>Mocis latipes</i> *										4				
Cerambycidae										2				

* Estadio larval

Se observó una tendencia decreciente en la cantidad de individuos por muestreo, que pudo deberse a varias razones, como las condiciones de tiempo imperantes, ya que, al aumentar la humedad relativa, bajar la temperatura e incrementarse la precipitación (Figura 1), la población de insectos disminuía.

La presencia de maleza creciendo desmedidamente, en el caso de una de las fincas, causó un efecto detrimental en la eficiencia de captura; otro factor que afectó, fue la presencia de fruta a tal punto que, finalizado el período de fructificación desaparecieron de la lista de muestreo (larvas *Ceratitis* sp. y *Anastrepha* spp.) o disminuyeron en número (*Trigona* spp. y *Apis* sp.).

Los géneros más importantes que portaban bacteria que dieron positivo en el medio D3 de Kado fueron *Dysdercus* spp., *Trigona* spp., *Apis* sp., *Ceratitis* sp. y *Anastrepha* spp. (Figura 2); lo cual puede ser causado por hábitos de alimentación, como es el caso de la búsqueda de azúcares para los géneros *Apis* sp., *Trigona* sp., etc. ó que en alguna etapa del ciclo de vida se de una relación con alguna parte del árbol, como por ejemplo la fruta en la cual se alimentan las larvas de *Anastrepha* sp., *Ceratitis* sp., etc. Al seccionar los insectos, se encontró que las abejas del género *Trigona* spp. son las que portan la bacteria, en sus

patas, con mayor frecuencia seguido por *Apis* sp. En lo que se refiere a la obtención de la bacteria a partir de caldo, *Dysdercus* spp. y *Trigona* spp. resultaron ser los principales portadores, aunque las moscas encontradas en la fruta (*Anastrepha* sp., *Ceratitis* sp.) tienen un porcentaje bastante similar (Figura 3).

La variación del color del medio de cultivo D₃ de Kado indicada en la literatura (Mortimer, 1983), no se presentó en todos los casos, aunque la coloración de las colonias era anaranjada. Esta circunstancia quedó satisfecha luego de la identificación de los aislamientos bacteriales, los cuales resultaron no ser *Erwinia*, mientras que en los que se notó cambio de coloración sí pertenecían a este género (Cuadro 2).

Cuando se procedió a la identificación de las bacterias, se notó que las colonias pueden ser fenotípicamente muy similares, de ahí que se tenga que llegar a las pruebas bioquímicas si se quiere estar seguro, principalmente en el caso de que pertenezcan a la misma familia, como es el caso de *Enterobacter* sp., *Erwinia* sp., *Klebsiella* sp. y *Serratia* sp. que son todas Enterobacteriaceas. De estos cuatro géneros, los fitopatógenos son *Erwinia* sp. y *Enterobacter* sp.; este último aislado recientemente e identificado con bacterias asociadas con los huevos de *Anastrepha*

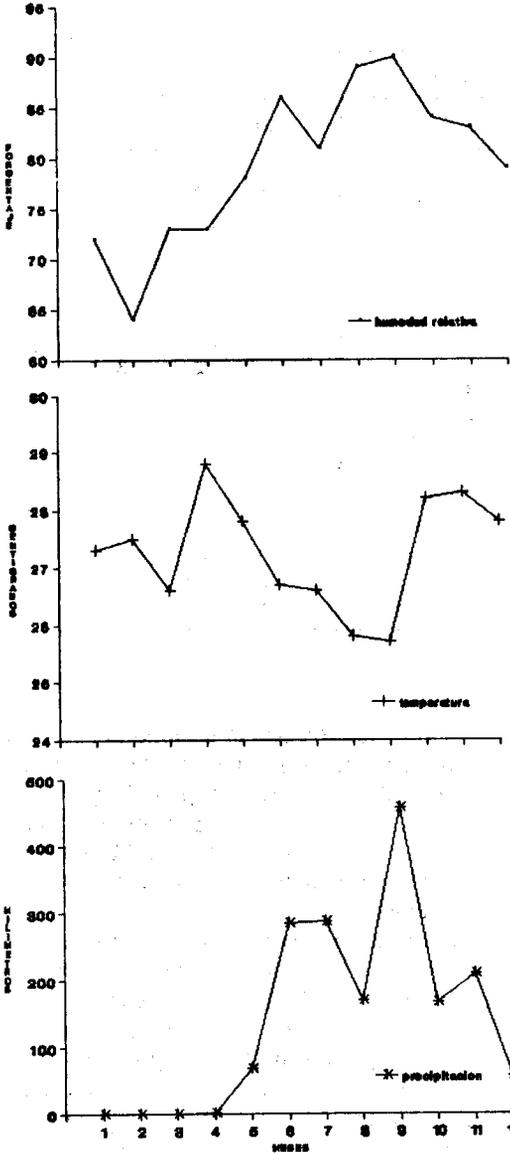


Fig. 1 Datos climatológicos de humedad relativa, temperatura y precipitación para el año 1989 (promedios mensuales).

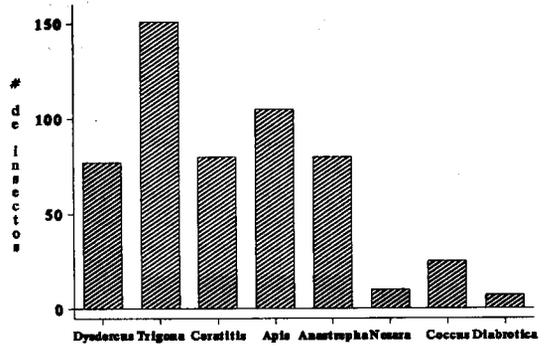


Fig. 2. Número total de especímenes capturados de los géneros, cuyos aislamientos en D3 de Kado fueron positivos.

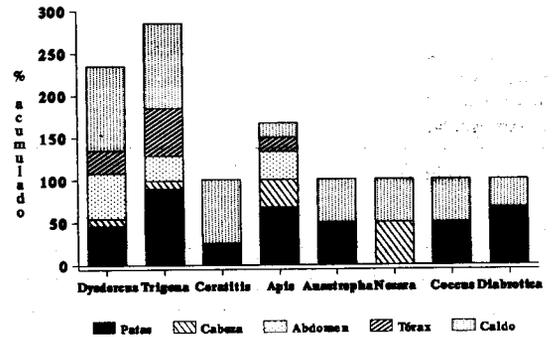


Fig. 3. Comparación de los porcentajes de obtención de la bacteria en D3 de Kado, para los géneros de acuerdo al órgano.

dato debido a la eliminación de la barrera mecánica (introducción de la aguja en la fruta) y la concentración de la bacteria, que pudo ser muy alta, provocando cierto daño al tratar de colonizar el tejido con la que fue puesta en contacto. Otras posibilidades son: penetración de otros patógenos tanto de origen bacteriano como fungoso a pesar del proceso aséptico, debido a la exposición al ambiente de los frutos, acompañada del humedecimiento del punto de inoculación, situación que se pudo prestar para que ocurriera lo descrito.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El medio D3 de Kado resultó ser poco selectivo al crecimiento de *Erwinia* sp.

De acuerdo a los datos obtenidos, se hace necesario, además de un combate directo de la

obliqua y dos especies de *Klebsiella* sp. y *Enterobacter* sp. (Murillo et al., 1990).

En la inoculación de frutos, se observaron diferencias en el tipo de daño ocasionado en la pulpa entre los aislamientos de las bacterias consideradas como no fitopatógenas y los de *Erwinia* sp., *Enterobacter* sp. (Cuadro 3). Los efectos notados con las primeras, se pueden haber

Cuadro 2. Distribución de los aislamientos identificados, por géneros y sección del insecto de donde se originaron.

Insecto	Organo	Bacteria
<i>Dysdercus</i> sp.	Cabeza	<i>Klebsiella</i>
	Tórax	<i>Klebsiella</i>
	Abdomen	**
	Patas	**
	Entero*	<i>Erwinia</i> sp. y **
<i>Trigona</i> sp.	Cabeza	**
	Tórax	<i>Klebsiella</i> sp.
	Abdomen	<i>Erwinia</i>
	Patas	<i>Erwinia</i> y **
	Entero	<i>Erwinia</i> y **
<i>Apis mellifera</i>	Cabeza	<i>Klebsiella</i> sp.
	Tórax	**
	Abdomen	<i>Klebsiella</i> sp.
	Patas	<i>Erwinia</i> sp.
	Entero	<i>Klebsiella</i> sp.
<i>Diabrotica</i> sp.	Patas	<i>Serratia</i> sp.
	Entero	<i>Klebsiella</i> sp.
<i>Nezara viridula</i>	Cabeza	<i>Klebsiella</i> sp.
	Entero	<i>Serratia</i> sp.
<i>Coccus</i> sp.	Entero	<i>Enterobacter</i> sp.
<i>Ceratitis capitata</i>	Seccionada	<i>Erwinia</i> sp.
	Entera	<i>Erwinia</i> sp.
<i>Anastrepha</i> sp.	Seccionada	<i>Erwinia</i> sp.
	Entera	<i>Erwinia</i> sp.

* Insecto sin seccionar colocado en agua destilada estéril; formación de caldo.

** Aislamiento que no creció al ser rayado y no pudo ser identificado.

enfermedad, hacer un control lo más eficaz posible de las poblaciones de insectos, ya que, son portadores de la bacteria. Se estaría hablando entonces de un combate tanto para evitar daño directo del insecto como para evitar su posible participación en la transmisión de la enfermedad.

Por su relación con el cultivo y su actividad, los insectos con mayores posibilidades de transmitir la bacteria en orden de importancia son *Anastrepha* spp., *Ceratitis capitata*, *Trigona* spp., *Dysdercus* spp. y *Apis mellifera*.

Además de usar el agar nutriente al inicio de los aislamientos debería usarse un medio como el agar tripticasa-soya, que es más rico y permite un mejor desarrollo de las bacterias presentes, distinguiéndose mejor la forma de las colonias.

En lugar del medio D3 de Kado se podrían usar medios como el MS (Miller-Schroth) que es

Cuadro 3. Reacción observada en fruta de mango, al ser inoculadas con los aislamientos bacteriales obtenidos de insectos.

Bacteria	Síntoma
<i>Serratia</i> sp.	En tejido no completamente maduro se observó la formación de un círculo blanco opaco, con una sección amarilla a un lado. En fruta madura se produjo una ligera maceración de tejido, con la formación de una línea hacia el interior apenas apreciable. Externamente no hubo daño.
<i>Enterobacter</i> sp.	En tejido no maduro se apreció un círculo blanco opaco con el centro amarillo pálido y el borde café claro. En fruto maduro se formó un línea café claro, sin separación de tejido. Externamente no se produjo lesión.
<i>Klebsiella</i> sp.	En tejido no sazón se formó un círculo con una franja central blanca opaca y a los lados dos zonas de color café claro. En tejido maduro se formó una línea café claro, con una ligera separación de tejido, esta lesión es apenas apreciable. Externamente no se dió lesión.
<i>Erwinia</i> sp.	En tejido no maduro se observó un círculo con borde blanco -amarillo y en el centro una franja café claro con puntuaciones más oscuras. En fruta madura una línea café claro con separaciones de tejido que termina en una cámara ovalada café oscuro con ciertas zonas en su interior de tono blanco; la lesión es de apariencia seca.

selectivo para gram negativos y el CVP (Cristal Violeta Pectato) en el cual la hidrólisis de pectato indica la presencia del género *Erwinia*.

Antes de planear cualquier método de combate para estos insectos, será necesario efectuar en primera instancia estudios sobre: eficiencia de transmisión, ciclo de vida y fluctuación poblacional; una vez concluida esa fase se podrán indicar los posibles métodos químicos y/o biológicos de acuerdo a los niveles de daño económico.

En lo que se refiere a la enfermedad, desde un punto de vista global, se deben combinar tanto las estrategias destinadas al combate directo (químico, biológico, cultural y de resistencia genética), como las indirectas (químicas o biológicas) que serían aquellas dirigidas a insectos que puedan diseminarla.

Claro está, todo enfocado a un combate preventivo, en un esfuerzo conjunto de los productores de la zona y en forma seria, responsable y coordinada de acuerdo a las condiciones.

RESUMEN

Una de las enfermedades más serias e importantes del mango (*Mangifera indica*) es el "cáncer", causado por *Erwinia* sp. El principal medio de diseminación de la bacteria son los esquejes infectados utilizados en la propagación; además, se informa que los insectos también juegan un papel importante. Con el fin de probar esto último se hicieron muestreos quincenales en plantaciones con la enfermedad. Se recolectaron los insectos presentes y se hicieron aislamientos, primero en agar nutritivo y luego seleccionando con el medio D3 de Kado. También se efectuaron pruebas en discos de papa. Las bacterias que crecieron se purificaron y se utilizaron para inocular frutos de mango. Se identificaron aquellos aislamientos que provocaron algún tipo de lesión, resultando cuatro géneros: *Serratia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Erwinia*. Este último se aisló de *Dysdercus* spp., *Trigona* spp., *Apis mellifera*, *Ceratitis capitata* y *Anastrepha* spp.

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Ramón Luis Hernández de la Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno, por su colaboración en el transporte; al Dr. Franklin Jiménez de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, por su ayuda en la identificación y al Dr. Róger López por su ayuda técnica en la revisión del resumen.

LITERATURA CITADA

- DÍAZ, C.; FIGUEROA, M.; OPONTE, O. 1971. Una bacteriosis de la pulpa del mango causada por *Xanthomonas* sp. *Agronomía Tropical* (Venezuela) 21(1):17-24.
- GUEVARA, Y.; AMADOR, R.; SOLORZANO, R. 1979. Una nueva bacteriosis del mango en Venezuela. *Fitopatología Colombiana* 8:31.
- GUEVARA, Y.; RONDON, A.G.; SOLORZANO, R. 1980. Bacteriosis en mango (*Mangifera indica* L.) en Venezuela. Sintomatología e identificación. *Agronomía Tropical* (Venezuela) 30(1-6):65-76.
- GUEVARA, Y.; RONDON, A.G.; ARNAL, E.; SOLORZANO, R. 1985. Bacteriosis del mango (*Mangifera indica* L.) en Venezuela. Distribución, perpetuación, diseminación y evaluación de la resistencia de variedades. *Agronomía Tropical* (Venezuela) 35(6):63-75.
- LOPEZ, M.M.; NOVAL, C. 1988. El Fuego Bacteriano (*E. amylovora*). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Dirección General de la Producción Agraria, Subdirección General de Sanidad Vegetal. Madrid, 60 p.
- MORTIMER, P. 1983. *Phytopathogenic Bacteria*. Department of Bacteriology. University of California, Davis, California. 6633 p.
- RONDON, A.G.; FIGUEROA, M. 1970. Mancha negra de los frutos del mango (*Mangifera indica* L.) por *Erwinia mangifera* (Doige) Bergey. *Agronomía Tropical* (Venezuela) 20(4):271-274.
- MURILLO, T.; RIVERA, P.; HERNANDEZ, F.; JIRON, L.F. 1990. Indigenous microfloras of the West Indies fruit fly, *Anastrepha obliqua* (Diptera; Tephritidae). *Fruits* (Francia) 45(6):629-631.
- SAENZ, A.; MURILLO, A. 1989. Programa Nacional Sectorial de Mango. M.A.G., Boletín Técnico 73. 66 p.
- SOTO, J.; LEZAMA, H.J. 1988. Population fluctuation of *Ropalomera* Wiedemanx (Diptera; Ropalomeridae) in Costa Rica. *Revista Biología Tropical* 36(2B):549-550.

obeseb habemem
 oten comdina
 -dip) ocomstis dino
 -idog sionezier ob y
 (asogidoid o asomip) a
 -sup sup asozes a abigrib

un
 100 tal
 1000
 10000
 100000
 1000000