

## Caracterización de daños histológicos ocasionados por hongos patógenos aislados del fruto de arazá (*Eugenia stipitata*)

Sterling-Cuéllar. A.,<sup>1\*</sup> Vinasco-Sandoval. G.T.,<sup>2</sup> Martínez- Cotacio. C. A.,<sup>2</sup> Garzón-Gómez. M.T.,<sup>1</sup> Perdomo-Rojas. L.T.,<sup>1</sup> Parra-Ramos. N.C.,<sup>1</sup> Calderón-Rosas. B.M.

<sup>1</sup>Grupo de investigación GINMUA. Universidad de la Amazonia, Florencia (Caquetá), Colombia

<sup>2</sup>Grupo de investigación en Botánica. Universidad de la Amazonia, Florencia (Caquetá), Colombia

Recibido 9 de febrero de 2004; Aceptado 20 de Mayo 2004

### Resumen

En una finca ubicada al sur del municipio de Florencia-Caquetá (Colombia) se recolectaron frutos de arazá (*Eugenia stipitata*) que exhibían una clara sintomatología de ataque fúngico. A estos frutos se les determinó los hongos patógenos asociados a la laceración observada, además de una caracterización histológica de los daños tisulares presentes. A los frutos procesados en laboratorio se les realizó diversos cortes en exocarpo y mesocarpo para luego ser tincionados, fijados en láminas portaobjetos y observados con estereoscopio y microscopio. Los hongos se aislaron y repicaron en medio de cultivo PDA usando la técnica del microcultivo para su identificación. Se encontró evidentes daños tisulares a nivel de epidermis, estructuras esclerenquimatosas (esclereidas) e hiperplasia en el estrato de células más internas del exocarpo y mesocarpo (antracnosis). Se encontraron tres hongos asociados a la zona necrótica del fruto: *Colletotrichum gloesporioides*, *Pestalotia* sp. y *Trichophyton* sp. Los dos primeros son fitopatógenos: *C. gloesporioides* causa la antracnosis y *Pestalotia* es el responsable de la "roña del fruto". *Trichophyton* como saprófito facultativo no causó daños en tejidos vegetales. *C. gloesporioides* fue el mayor responsable de los daños tisulares observados en el fruto de arazá.

© 2005 Universidad de la Amazonia. Todos los derechos reservados.

**Palabras clave:** Arazá, *Colletotrichum gloesporioides*, daños tisulares, caracterización histológica.

### Abstract

In a farm located south of Florencia-Caquetá (Colombia) municipality, fruits of arazá (*Eugenia stipitata*) exhibiting clear symptoms of fungal attack were harvested. The pathogenic fungi associated to the observed laceration as well as the histological characterization of the damages present in the fruits were determined. Cuts in exocarpe and mesocarpe were dyed, fixed in sheets and observed with stereoscope and microscope. The fungi were isolated and replicated in PDA using the technique of the microculture for their identification. It was evident regular damages at epidermis level, structures of esclereides and hyperplasia in the stratum of more internal cells of the exocarpe and mesocarpe (antracnosis). Three fungi were found associated to the necrotic area of the fruit: *Colletotrichum gloesporioides*, *Pestalotia* sp. and *Trichophyton* sp. The first two are phytopathogenic: *C. gloesporioides* causes antracnosis and *Pestalotia* is responsible for the "scab of the fruit". *Trichophyton*, as a facultative saprophyte, didn't cause damages in the tissues. *C. gloesporioides* was the main fungi responsible for the tissue damages observed in the fruit of arazá.

© 2005 Universidad de la Amazonia. All rights reserved.

**Key words:** Arazá, *Colletotrichum gloesporioides*, tissue damages, histological characterization

### Introducción

A pesar de que las plantaciones de arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh) todavía son pocas y normalmente a pequeña escala, se han detectado varias plagas y enfermedades importantes, y otras que pueden ser motivo de preocupación.

Considerando que el aumento de la densidad de plantación de una determinada especie, generalmente agrava los problemas fitosanitarios, es previsible que otros insectos y microorganismos se tornen perjudiciales a *E. stipitata*, con la expansión de su cultivo (Clement 1991).

Entre la diversidad vegetal de la amazonia, las especies productoras de frutos comestibles, constituyen un grupo muy importante tanto por

\*Autor para correspondencia: Email: [sterlingmicofungal@yahoo.es](mailto:sterlingmicofungal@yahoo.es)

su consumo en la dieta diaria de la población rural y urbana, como en la alimentación de animales silvestres y domesticados (Vélez 1992). Según González (2003), el sabor, aroma y textura propios de los frutales amazónicos permiten desarrollar agroindustria regional, especialmente dirigida al mercado internacional que aprecia los sabores exóticos.

Según Agrios (1995) y Saldarriaga & Pineda (2001), los hongos al igual que otros factores bióticos causan daños en cualquier estructura de las plantas (raíz, tallo, hojas, flores o fruto). Estos daños no sólo son evidentes en términos anatómicos, sino también a nivel histológico, donde la necrosis de los tejidos lacerados evidencia la presencia in situ del micelio patogénico (haustorios y apresorios) en las distintas estructuras y órganos de las plantas, idealmente en hojas y frutos (Pardo-Cardona, 1995).

La región amazónica es un ambiente que favorece excepcionalmente la proliferación de múltiples microorganismos especialmente hongos, muchos de los cuales son fitopatógenos. Por otro lado, aunque la tolerancia y adaptabilidad de muchas plantaciones (Marín 2000) como los frutales amazónicos han amainado los efectos de los hongos patogénicos, las medidas de control son mínimas debido a que el conocimiento de los daños tisulares ocasionados y la micoflora patógena involucrada son incipientes; sin embargo, no hay registros de estudios realizados en histopatología de *E. stipitata* en la amazonía colombiana. La presente investigación se desarrolló con el objeto de 1) determinar los microhongos asociados a las patologías encontradas en los frutos de *E. stipitata* y 2) realizar una descripción histológica de las zonas cárpicas afectadas por los patógenos aislados.

#### Metodología

##### Área de estudio

El muestreo se realizó en la finca Ary ubicada en la vereda el Chamón al sur de la ciudad de Florencia en el departamento del Caquetá (Colombia), entre las coordenadas 1°35'72" latitud norte y 75°36'08" latitud oeste, con una altura promedio de 271 msnm (IGAC, 1993). Limita al sur con el río hacha por lo que se considera una zona inundable, y a sus alrededores cuenta con

zonas de pasturas utilizadas para el mantenimiento de ganado. El sitio de muestreo posee un área aproximada a 1 Ha. de la cual se destinó 12 m<sup>2</sup> para la siembra y cultivo de Arazá (*E. stipitata*), único producto agrícola de la granja.

#### Métodos

El procedimiento en campo partió del reconocimiento morfo-anatómico de 30 frutos de arazá (*E. stipitata*) afectados por micosis exocárpicas visibles dentro del cultivo de acuerdo con la metodología de diagnóstico en campo sugerida por Castaño & Mendoza (1997).

El aislamiento de los hongos patógenos del exocarpo del fruto de Arazá (*E. stipitata*) se hizo en los medios de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA), Agar Extracto de Malta al 2% (AEM) y Harina de Maíz Agar (HMA) con y sin antibiótico (clorafenicol 25µg/ml) siguiendo la metodología propuesta por Saldarriaga & Pineda (2001). En esta medida se realizaron cortes de 1 x 1 cm<sup>2</sup> del tejido afectado para ser esterilizados con hipoclorito de sodio al 5%. El proceso se continuó con un secado y posterior lavado de las muestras para ser sembrados en los medios de cultivo antes descritos. A continuación los medios fueron expuestos a temperatura ambiente (25°C) durante 8 días para la incubación correspondiente. El paso siguiente se basó en el aislamiento en cultivo puro de los hongos obtenidos en los medios de cultivo antes descritos, para ser identificados posteriormente según la técnica del microcultivo de Konemans & Roberts (1987). La taxonomía hasta género y especie siguió a Samson et al. (1984), Barnett & Hunter (1972), Von-Arx (1974), Domsch et al. (1980) y Sutton (1980).

Para describir los daños histológicos ocasionados por los hongos aislados de las zonas laceradas de los frutos de *E. stipitata* y contrastar éstas observaciones con las características micológicas de los aislamientos obtenidos in vitro, se llevó a cabo la elaboración de micropreparados de cortes histológicos de los tejidos necróticos con tinciones de hematoxilina y fluoroglucina, más ablandamiento de tejidos con HCl conc., siguiendo en todo momento las recomendaciones de Dhingra & Sinclair (1985).

A partir de los resultados obtenidos se elaboró una descripción macroscópica y micromorfológica de las colonias de hongos aislados y se determinó el porcentaje de densidad relativa. La descripción histológica se efectuó

teniendo en cuenta específicamente los tejidos afectados y la influencia patogénica del micelio fúngico observado en los micropreparados cárpicos.

## Resultados y Discusión

### Aislamientos microfúngicos obtenidos

En los medios de cultivos PDA, AEM y HMA con y sin antibiótico se encontró dos tipos morfológicos de colonias, correspondientes a *Colletotrichum gloesporioides* (Penz.) Sacc., y *Pestalotia* sp. Solamente en los medios AEM y PDA sin antibiótico, se diferenció otro tipo de colonia correspondiente al género *Trichophyton*. *Pestalotia* sp. presentó el mayor porcentaje de densidad relativa comparado con los demás géneros (Tabla 1).

Tabla 1. Densidad relativa (%) de las especies microfúngicas aisladas en los tres medios de cultivo empleados

Especie microfúngica	# Unidades Formadoras de Colonias (UFC)			Densidad relativa (%)
	PDA	AEM	HMA	
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	2	3	3	42.1
<i>Trichophyton</i> sp.	0	1	1	10.5
<i>Pestalotia</i> sp.	4	2	3	47.3

Aunque *Pestalotia* sp. presentó la mayor densidad relativa, *C. gloesporioides* se caracterizó por tener los UFC de mayor tamaño en los distintos medios, seguido de *Tricophyton* sp. y *Pestalotia* sp. Es importante indicar que *C. gloesporioides* y *Pestalotia* sp. son hongos fitopatógenos propios de los frutos descompuestos. En éste estudio la mayor sintomatología patológica correspondió a una enfermedad conocida como antracnosis ocasionada precisamente por el hongo *Colletotrichum gloesporioides* (Agrios 1995).

*C. gloesporioides* desarrolló en general colonias densas, de forma circular de color marrón claro en el centro y gris claro en el borde del anverso. Por el reverso las colonias presentaron una coloración gris verdosa, y una superficie de textura filamentosa. Las diferencias encontradas entre los medios de cultivo fue el diámetro que poseían las colonias a los cinco días. El medio en donde se observó mayor expansión de la colonia fue en PDA con un diámetro de 40 mm, a diferencia de los medios AEM y HMA en donde el diámetro

promedio fue de 30 mm. Estos valores coinciden con los reportados por Domsch et al. (1980) en dichos medios de cultivo.

El examen microscópico reveló la presencia de conidios hialinos fusiformes en *C. gloesporioides* y numerosas estructuras parasíticas tipo apresorios en el micelio vegetativo (Figura 1). Aunque no se pudo observar claramente las estructuras reproductivas asexuales del hongo en el tejido vegetal lacerado, los conidios suelen encontrarse también en una estructura llamada acérvulo. Estos cuerpos son de forma discoide, cerosos, subepidermales y típicamente oscuros (Pardo-Cardona 1995).

Las colonias de *Pestalotia* sp. fueron evidentes en todos los medios de cultivo, presentando la mayor abundancia entre todos los géneros observados, indiferente de la presencia o ausencia de antibiótico. Su macromorfología expone una coloración blanquizca, con superficie de textura algodonosa en el anverso, pero cremosa y amarillo-pálida en el reverso. El diámetro en esta colonia varió dependiendo del medio utilizado. El mayor tamaño fue en AEM, luego en PDA y por último en HMA.



Figura 1. Apresorio (punta de flecha) de *Colletotrichum gloesporioides*, objetivo 40X

*Pestalotia* sp. se caracteriza microscópicamente también por poseer acérvulos oscuros, con forma discoide similares a los de *C. gloesporioides*. Aunque los acérvulos no fueron evidentes en los montajes, sí se evidenció la presencia de múltiples conidios tabicadas transversalmente (fragmaconidias) triapendiculadas a lo largo de todo el micelio septado (Figura 2).

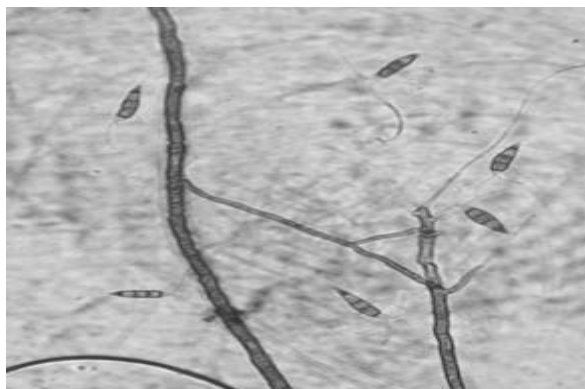


Figura 2. Micelio septado y fragoconidias triapendiculadas de *Pestalotia* sp., objetivo 40X

Las colonias de *Trichophyton* sp. fueron poco evidentes en AEM y PDA (ambos sin antibiótico) comparadas con *C. gloesporioides* y *Pestalotia* sp. Tanto en AEM como en PDA las colonias presentaron un borde irregular, una coloración café oscura uniforme en el anverso y un reverso de color negro. La textura superficial fue de tipo polvoriento y el diámetro promedio a los cinco días de crecimiento fue de 15 mm. Microscópicamente *Trichophyton* sp. exhibió numerosas conidias de diferentes tamaños, con forma ovoide, amarillas a hialinas, y se encontraron ubicadas lateralmente sobre la superficie de las hifas.

Según Barnett (1972), especies del género *Trichophyton* producen dermatomicosis en animales y en el hombre. Por eso es bastante curioso encontrarlo en sustratos vegetales en descomposición. Sin embargo es una especie saprófita oportunista que fácilmente puede crecer en medios de cultivo poliselectivos incluso en ausencia de antibióticos bacterianos (Hazen et al. 1970).

#### Histopatología de los daños encontrados en los frutos

Se encontró daños en los frutos expresados en lesiones circulares de color negro, hundidas y brillantes que al unirse dan lugar a grandes áreas necróticas. Internamente los frutos presentaron una pudrición de color negro y frecuentemente blando en el área afectada, observándose daños en el mesocarpio como una continuación de diversos daños iniciales encontrados en el epicarpio. Según Agrios (1995), esta sintomatología corresponde a una enfermedad conocida como antracnosis, la cual ocasiona la desintegración de los tejidos del fruto tanto en el campo como en poscosecha,

afectando la calidad externa e interna del producto y con ello su valor comercial. De acuerdo con Trapero (2000), el daño en el fruto inicia con una hiperplasia en el estrato de células más interno del exocarpio y mesocarpio (Cortes efectuados con tinción de fluoroglucina, Figura 3). Posteriormente se generan depósitos de fenoles en los estratos de células dañadas, y finalmente la desorganización y colapso celular en estados avanzados de la infección. Las manchas oscuras, consecuencia de la antracnosis en el fruto se deben a la oxidación de polifenoles depositados en las paredes celulares de las células muertas y espacios intercelulares.

Por otro lado, se observó que tanto los frutos maduros como los jóvenes presentaban endurecimiento. Los frutos maduros mostraban necrosis total en el exocarpio y manchas necróticas de color oscuro que involucraron epidermis y tejido esclerenquimatoso (esclereidas en particular). Según Pardo-Cardona (1995) éste diagnóstico sintomatológico corresponde a una enfermedad denominada "Roña o costra" del fruto causada por hongos fitoparásitos especialmente del género *Pestalotia*. Esta patología se caracteriza porque en las hojas causa deformaciones y las flores infectadas producen frutos deformes; si ataca al fruto, detiene su desarrollo, lo endurece y toma un aspecto corchoso, en ocasiones se cubre de costras de color pardo (Reyes & Paul 1995). Sin embargo es una enfermedad que puede ser ocasionada por un complejo de hongos.

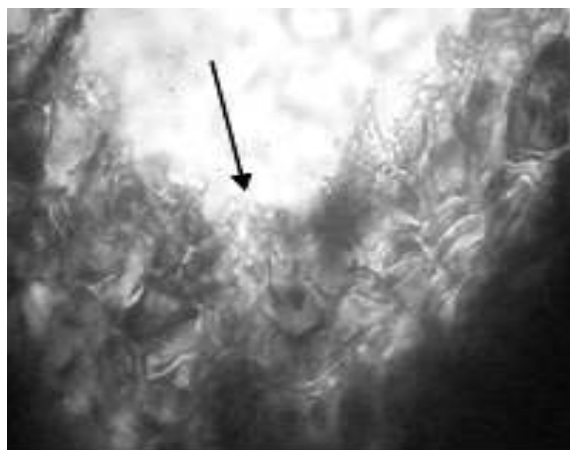


Figura 3. Zona de hiperplasia mesocárpica en el fruto de *E. stipitata* ocasionada por *C. gloesporioides*

González (2003), menciona que los síntomas de la "roña del fruto" dependen del hongo involucrado, sin embargo, la lesión se ubica

principalmente en el pedúnculo frutal. Los síntomas incluyen áreas difusas de aspecto húmedo que crecen a partir del pedúnculo en proyecciones en forma de dedo, las que rápidamente se tornan a un color oscuro y prevalecen en lesiones circulares con márgenes irregulares. Es común que la epidermis afectada se rompa y un líquido de color café fluya del pedúnculo o de las heridas abiertas hacia el resto del fruto, como se observó en las muestras analizadas (Figura 4).

El hongo *Trichophyton* sp. en el hombre afecta pelo, uñas y piel, ocasionando dermatomicosis, en los vegetales este microorganismo no presenta antecedentes patológicos, por tanto, se asume que fue una cepa que posiblemente se encontró asociado a los efectos causados por los hongos anteriormente mencionados o simplemente constituyó un contaminante de las muestras infectadas.

Las enfermedades causadas por hongos en el fruto de arazá (*E. stipitata*) corresponden a necrosis total o parcial de las capas del tejido vegetal, iniciando por la afección de la epidermis y posteriormente invadiendo todo el tejido del mesocarpo, debido a los hongos fitoparásitos *C. gloesporioides* responsable de la antracnosis y *Pestalotia* sp. responsable de la “roña del fruto”.

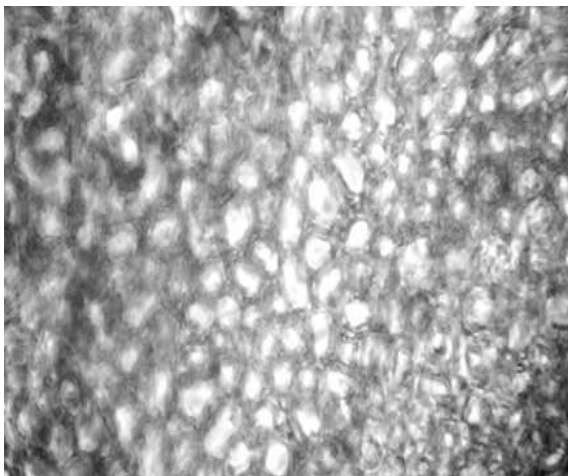


Figura 4. Epidermis exocárpica del fruto de *E. stipitata* afectada por el ataque micótico de *Pestalotia* sp

#### Agradecimientos

Los autores agradecemos a La Universidad de la Amazonia en Florencia-Caquetá por el soporte económico en el desarrollo de la investigación. A los auxiliares de laboratorio de Microbiología de UA por su valiosa colaboración en el trabajo

práctico, a Hernando Valencia Z. y Maria Caridad Cepero por sus asesorías en la determinación taxonómica y a Ary Campo, por facilitar su cultivo frutal para la fase de campo.

#### Literatura citada

- Agrios, G.N. 1995. Fitopatología. 2a.ed. México, Uthea. 838 pp.
- Barnett, H. & B. Hunter. 1972. Illustrated Genera of Imperfect fungi. Third Edition. Burgess Publishing Company. 215 pp.
- Castaño, J. & L.R Mendoza. 1997- Manual para el diagnóstico de hongos, bacterias, virus y nematodos fitopatógenos. Primera Edición. Derechos reservados, Centro editorial Universidad de Caldas. Zamorano Academia Press. Honduras C.A. 210 pp.
- Clement, C. 1991. Recursos genéticos de especies fructíferas da Amazonia Brasileira. Revista Acta Amazónica. Vol XII.No.4. 75 pp.
- Dhingra O. D. & J. B. Sinclair. 1985. Basic Plant Pathology Methods. Fourth edition. Library of Congress Cataloging in Publication Data. CRC Press, Florida, USA. 355pp.
- Domsch K. H., W. Gams & T. H. Anderson. 1980. Compendium of soil fungi. Vol. I. Academic Press Ltd., London, England. 859 pp.
- Gonzalez, A. 2003. Jardín de frutales amazónicos del IIAP - Amazonia Peruana. Iquitos - Perú. 20 pp.
- Hazen E. M., A. Gordon & F. Curtis. 1970. Laboratory identification of pathogenic fungi simplified. Third edition. Charles C Thomas - Publisher, Springfield, Illinois, USA. 253pp.
- Instituto Geográfico Agustín Codazzi, IGAC. 1993. Aspectos ambientales para el ordenamiento territorial de occidente del Departamento del Caquetá. Tomo VI. Bogotá, Colombia. 673 pp.
- Koneman, E. W. & G. Roberts. 1987. Micología práctica de laboratorio. 3ª edición. Editorial Panamericana. 221 pp.
- Marín, J. P. 2000. Interacciones Planta-Hongo: Mecanismos de infección, patogénesis y resistencia.. Cap. 21, págs. 739-750 en: Llacer, G., López, M. M., Trapero, A. & Bello, A. (eds). Patología Vegetal. Phytoma-España, Madrid. urrey, England. 696pp.
- Pardo-Cardona, M. 1995. Hongos Fitopatógenos de Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias. Departamento de Biología. Medellín. 165 pp.
- Reyes, M.U. & R. Paul. 1995). Effect of storage temperature and thylene treatment on Guava (*Psidium guajava* L.) fruit ripening. *Post Biol and Tech* 6: 357-365 pp.
- Saldarriaga, Y. & F. Pineda. 2001. Manual de micología aplicada. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín. 103 pp.
- Samson, RA., E. S. Hoekstra & C.V. Oorschot. 1984. Introduction to food-borne fungi. 2º edition. Institute of the Royal Netherlands, Academic of the Arts and Sciences. London. 248 pp.
- Sutton C.B.1980. The Coelomycetes, fungi imperfect with pycnidia, acervuli and stromata. Firth edition. Commonwealth, s
- Trapero, A. 2000. Los hongos fitopatógenos. Cap. 20, págs. 713-739 en: Llacer, G., López, M. M., Trapero, A. & Bello, A. (eds). Patología Vegetal. Phytoma-España, Madrid.
- Vélez G.A. 1992. Los frutales amazónicos cultivados por las comunidades indígenas de la región del Medio Caquetá (Amazonía Colombiana). Colombia Amazónica 2 (5): 163-193.
- Von - Arx. J.A. 1974. The Genera of Fungi. Sporulating in Pure Culture. 315 pp.