

# Estudios biológicos y morfológicos del hongo causante de la pudrición apical de los frutos del guayabo (*Psidium guajava* L.)

## Biological and morfological studies of the fungi causing the styelar-end rot on guava fruits (*Psidium guajava* L.)

Recibido 30-01-92 Aceptado 25-05-92

Trabajo subvencionado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES), L.U.Z.

**Antonio Jiménez; Rixio Santos**

*Departamento Fitosanitario Facultad de Agronomía. (LUZ). Apartado 15205. Maracaibo, 4005. Zulia. Venezuela.*

### Resumen

Se estudió el desarrollo del hongo causante de la pudrición apical de los frutos del guayabo, en el municipio Mara, Estado Zulia, para detectar la presencia de esclerocios en el micelio y determinar la forma, tamaño y color de los picnidios y picnidiosporas presentes en los tejidos apicales de frutos de guayaba enfermos. Se estudió el efecto de la humedad relativa del ambiente, la temperatura, luz y nutrientes en el desarrollo del mico, formación de picnidios y esclerocios *in vitro* e *in vivo*. Macroscópicamente, el mico es de textura algodonoso e hialino, inicialmente, tornándose de color negro después de 96 horas. Microscópicamente, el micelio es de color marrón rojizo, con hifas septadas, algunas ramificadas en un ángulo de 90 grados, con una ligera constricción en la base de la nueva hifa. En los tejidos, los picnidios son globosos a elípticos, individuales, con un ostiolo central y un tamaño de 144,85 µm de largo por 154,36 µg de ancho. Las picnidiosporas son unicelulares, hialinas, con sus extremos redondeados, guteladas y un tamaño de 17,50 g de largo por 5,75 µm de ancho. En los tejidos enfermos no se observaron esclerocios, y en los medios de extracto de malta y pulpa de guayaba se observaron estructuras similares a los primordios iniciales de los picnidios, abundantes, de consistencia floja, irregulares, con diámetros entre 63,66 y 441,61 µg. Para la formación de picnidios en los tejidos enfermos, la temperatura óptima fue de 28-30°C, la humedad relativa de un 55-100% y la luz no tuvo influencia. Los nutrientes necesarios son la glucosa y el almidón. El micelio creció abundante a 28, 30 y 32-C. Las características morfológicas del hongo sugieren que pertenece al género *Fusicoccum* o al género *Macrophoma*. Se hace necesario estudiar su conidiogénesis para dilucidar definitivamente esta situación.

**Palabras claves:** guayaba, pudrición apical, *Fusicoccum*, *Macrophoma*.

### Abstract

It was studied the growth of the fungus causing the stylar-end rot of guava fruits, in the Mara county, Zulia state, to detect the presence of sclerotia in the mycelium and to determinate the form, color and size of the picnidia and picnidiospore present in the stylar tissues of disease guava fruits. It was studied the effect of the ambiental relative humidity, the temperature, light and nutrients in the mycelium growth, pycnidia and sclerotia formation in vitro and in vivo. Macroscopically the mycelium is of cottony texture and Malvine, initially, changing to color black after 96 hours. Microscopically the mycelium is red- brownish with septate hypha branched in a 90 grade angle with a constriction at the base of the new hypha. In the tissues the pycnidia are elliptical to globose, individuals, with a central ostiole and a size of 144,85  $\mu\text{m}$  in large and 154,36  $\mu\text{m}$  in width. The pycnidiospore are one celled, hialynes, with ends rounded, guttulate and a size of 17,50  $\mu\text{m}$  in large by 5,75  $\mu\text{m}$  in width. In the disease tissues no sclerotia were observed although in the malt extract and guava pulp media were observed structures similar to the initial formation of pycnidia, abundant, of loose consistency, irregulars, with diameters of 63,33-441,61  $\mu\text{m}$ . For the production of pycnidia in diseased tissues the optimum temperature was of 28-30 °C, the relative humidity of 55-100 %, and the light had no influence. The nutrients necessary are the glucose and the starch. The mycelium grew abundant at 28, 30 and 32°C. The morfological characteristic of the fungus suggest it belongs to the genus *Fusicoccum* or to the genus *Macrophoma*. It is necessary to study its conidiogenesis to delucidate definitively this situation.

**Key words:** Guava, stylar-end rot, *Fusicoccum*, *Macrophoma*.

## Introducción

El guayabo es una planta poco agente para su cultivo y de una gran resistencia a enfermedades, sin embargo, se han reportado diferentes tipos de enfermedades, tales como, la antracnosis, costra o roña del fruto, frutos momificados, podredumbre de los frutos y marchitamiento (8, 12, 14, 15, 16, 19,20, 22).

En diciembre de 1.984, en las plantaciones de guayabo del municipio Mara, Estado Zulia, se observó una podredumbre de la parte apical de los frutos con las características siguientes: los frutos con madurez intermedia y maduros presentaban en la zona apical una lesión de color marrón rojiza. Inicialmente, la lesión es una mancha de 0,5 cm de diámetro que avanza hasta cubrir toda la zona apical y en estados avanzados de la enfermedad llega a cubrir todo el fruto. En frutos totalmente podridos en su superficie se observa un micelio de color gris oscuro y la presencia de unas estructuras globosas de color negro (picnidios) en número abundante (19).

Considerando que la enfermedad estaba ampliamente distribuida en los municipios Mara y Maracaibo, provocando pérdidas en el momento de la cosecha de un 30 a un 40 por ciento de los frutos, y en casos graves, hasta más del 50 por ciento, en 1.985 se procedió a la identificación del agente causal de la pudrición de los frutos del guayabo. De los frutos enfermos y plantas de la maleza platanito (*Cleomen spinoso* L.) se aisló un hongo el cual mediante observaciones macroscópicas de su micelio y órganos de reproducción (picnidios) se identificó como perteneciente al género *Macrophomina*. La patogenicidad del hongo y su relación con la pudrición apical de los frutos del guayabo fue demostrada al inocular frutos sanos y observar que en ellos se desarrollaron los síntomas característicos de la enfermedad (19).

En el frijol, el hongo *Macrophomina phaseolina* produce chancros negros, deprimidos, con un margen bien definido y a menudo presenta anillos concéntricos. La infección puede destruir el punto de crecimiento de la planta y ocasionar el rompimiento del tallo, justo en el lugar debilitado por el chancro y continúa avanzando hacia la región del lúpocotilo y la raíz, o hacia los pecíolos de las hojas primarias (10).

Cuando la infección ocurre en la planta más vieja o en plantas adultas, puede presentarse raquitismo, clorosis de las hojas, defoliación prematura y muerte de la planta. La infección suele ser más pronunciada en un lado de la planta (6, 24).

En sorgo, *M. phaseolina* causa el acamamiento de las plantas y poca producción de granos. La fase esclerotial del hongo causante de esta enfermedad, invade el tallo a ras de tierra a través de las raíces, procediendo después a colonizar y desorganizar el tejido cortical de los entrenudos inferiores. La parte baja de los entrenudos afectados se vuelve suave y débil, resultando en el acamamiento de los mismos, doblándose el tallo en el segundo o en el tercer entrenudo. Si se corta longitudinalmente un tallo enfermo, se ve claramente que los haces vasculares están separados y cubiertos por pequeños esclerocios de color negro, dándole a la enfermedad el nombre de podredumbre carbonosa. La enfermedad es favorecida por condiciones de escasa humedad y elevada temperatura del suelo durante la formación del grano (23).

En guayaba, *Macrophomina* sp. causa en los frutos maduros una lesión en la zona apical de color marrón rojiza. que avanza hasta

cubrir todo el fruto. Inicialmente, la lesión es de consistencia firme, pero luego los tejidos se toman blandos como consecuencia de su destrucción y liberación de] agua contenida en ellos. En frutos depositados en el suelo alrededor de los árboles de guayabo, se observa el crecimiento de un micelio de un color gris oscuro y la presencia de unas estructuras de forma globosa (picnidios) en número abundante, con un cirro de esporas en su abertura (ostiole) (9, 21).

Kapoor y Tandon (13) reportan una nueva especie de *Macrophoma*, *M. allahabadensis*, causando una pudrición de frutos del guayabo en Allahabad, India. Los síntomas de la enfermedad descritos ... : "Manchas marrones oscuras en la piel de los frutos, avanzadas a partir del punto de infección, hasta cubrir todo el fruto. El micelio sobre la superficie de los frutos, de color naranja canela a verde, oscuro inicialmente, tomándose marrón oscuro a negra, cubriendo todo el fruto. En los últimos estados de la enfermedad, en la superficie de los frutos aparecen numerosos picnidios negros son similares a los observados en frutos de guayaba con la pudrición apical colectados en el municipio Mara, Estado Zulia.

En el género *Macrophomina* sólo se describe una especie, la *M. phaseolina* (Tassi) Goid, la cual según Haigh (1.930), citado por Dhingra y Sinclair (7), presenta un estado esclerotial, la *Rhizoctonia bataticola* que puede dividirse en tres grupos dependiendo del tamaño de los esclerocios: Grupo A, esclerocios de 200  $\mu\text{m}$  mayores; Grupo B, esclerocios de 120'á 200  $\mu\text{m}$ ; Grupo C, esclerocios de 120  $\mu\text{g}$  o menores. Así mismo, él señala que algunos aislamientos en el grupo C, forman picnidios, tanto en las plantas hospederas como en medios de cultivo, mientras que los aislamiento de los grupos A y B no lo hacen. Kendrick (1.933) y Reichert y Hellinger (1947), citados por Dhingra y Sinclair (7) sugirieron que el nombre picnidial (*Macrophomina phaseolina*) debe ser aplicado sólo a los aislamiento que forman picnidios o que formen picnidios y esclerocios, mientras que los aislamiento no picnidiales deben ser referidos por el nombre esclerotial (*Rhizoctonia bataticola*).

El género *Fusicoccum* y el género *Maerophoma* presentan características muy similares al género *Macrophomina*, a saber: *Fusicoccum*: Micelio inmenso, septado, ramificado, marrón pálido, estroma de más de 100  $\mu\text{m}$  en diámetro, inmerso, subepidermal, marrón oscuro a negro, multilocular (lóculos de más de 250  $\mu\text{m}$  en diámetro), ostiolas indistinguibles, lóculos deshicientes por rompimiento de los tejidos del huésped. Conidióforos hialinos, algunas veces septados y ramificados en la base, cilindros, de 14-24 x 2-3  $\mu\text{m}$ . Células conidiógenas holoblásticas, determinadas, hilanas, cilíndricas. Conidios acrógenos, individuales, de pared delgada, unicelulares, fusiformes, rectos, irregularmente gutelados, ápice obtuso, base truncada, de 18-25 x 4-4,5 $\mu\text{m}$  (1). *Macrophoma*: micelio aéreo, septado, marrón oscuro, ramificado. Picnidios semisumergidos en los tejidos, errumpentes de color negro, subgloboso, monoostiolados, de 350-500  $\mu\text{m}$ . Conidióforos cortos de 8-20  $\mu\text{m}$  de largo. Conidios acrógenos, simples, elipsoidales a subglobosos, mayores de 15-30 x 5-10 $\mu\text{m}$  (1). *Macrophomina*: micelio aéreo, crecimiento en anillos concéntricos, primero blanco, luego gris a negro. Hifas ramificadas en ángulo recto, creciendo paralelamente a la que le dio origen. Picnidios inmersos en los tejidos, errumpentes, mono o multiostiolados, ostiolo truncado, de 33-276  $\mu\text{m}$  en diámetro. Conidióforos hialinos, cortos, rectos, entre 10-15  $\mu\text{m}$  de largo. Conidios simples, de 15-30 x 5-10  $\mu\text{m}$ , acrógenos. Célula conidiógena anteroblástica, phialidal, hialina, con diminutos anillos en la base (annelación). Conidios hialinos, unicelulares, obtusos en ambos extremos, elongados, elípticos, algunas veces ligeramente curvados, Esclerocios negro azabache, lisos reticulados, esféricos a oblongos o irregulares, de 15-300  $\mu\text{m}$  (1, 7).

De los frutos de guayaba enfermos con pudrición apical y plantas de la maleza platanito (*Cloemens spinoso* L.) se aisló un hongo, el cual mediante observaciones macroscópicas y microscópicas de su micelio y órganos de reproducción (picnidios) fue identificado como perteneciente al género *Macrophomina* (9). En los estudios iniciales se observó que el hongo no produce esclerocios en los tejidos de los frutos enfermos y los produce en forma esporádica en el medio de papa-dextrosa-agar (PDA). Así mismo, el hongo produce picnidios en los tejidos enfermos y no los produce en PDA y sólo los produce en forma esporádica en los medios de Clavel y Leonina's. Esto no permitió confirmar si el hongo aislado pertenece a la especie *Macrophomina phaseolina* o si se trata de una nueva especie, la cual no forma esclerocios, pero si picnidios en los frutos enfermos, y forma esclerocios y picnidios en forma esporádica en medio de cultivo (9).

Kapoor y Tandon (13) reportan en la India a *Macrophoma allahabadensis* como causante de una pudrición de ápice de frutos del guayabo. Las características de esta especie son como sigue: micelio marrón claro, ramificado, septado, de 5,5  $\mu\text{m}$  en grosor. Picnidios negros sobre los frutos, usualmente individuales, algunas veces de grupos de 2 a 3, errumpentes, globosos, con un diámetro entre 42,5 y 206,2  $\mu\text{m}$  (promedio de 132,6 $\mu\text{m}$ ), ostiolados, con papila prominente provista de pelos bien definidos de color marrón oscuro, esféricos, con un diámetro entre 22,0 y 48,1  $\mu\text{m}$  (promedio de 33,3  $\mu\text{m}$ ), raramente con cuello, células de la pared picnidial gruesas, redondas a poligonales y de varias capas, con un diámetro entre 11,1 y 48,1  $\mu\text{g}$  (promedio de 92,6  $\mu\text{m}$ ). Conidióforos cortos, hialinos, esporas unicelulares, hialinas, guteladas, elipsoides a fusiformes, de 10,5-24,5 X 3,5-5,3  $\mu\text{m}$  (promedio de 16,7 X 4,3  $\mu\text{m}$ ), pocos picnidio; formados en el medio de cultivo "A" de Asthana y Hawker.

El presente trabajo tuvo como objetivo: establecer la presencia o ausencia de esclerocios en el hongo que se desarrolla en los teidos

apicales de frutos de guayaba; identificación de los picnidios y picnidiosporas presentes en tejidos apicales de frutos de guayaba enfermos; y producción e identificación de picnidios y esclerocios en diferentes medios de cultivo in vitro, del hongo aislado de frutos de guayaba enfermos con la pudrición apical.

## **Materiales y métodos**

Muestras de frutos de guayaba enfermos con el hongo se recolectaron en granjas del municipio Mara, Estado Zulia, con la presencia de micelio y picnidios en su parte apical. Estos frutos se conservaron en el laboratorio bajo refrigeración (5°C).

Se prepararon cortes finos de los tejidos apicales de los frutos de guayaba enfermos, usando un micrótopo de mano. Los cortes obtenidos tenían un espesor de 10 µg.

Los cortes se colocaron en una gota de agua sobre un portaobjeto, se cubrieron con cubreobjetos y se observaron con microscopio óptico para establecer la presencia o ausencia de esclerocios y observar el patrón de formación y distribución de los picnidios del hongo, en los tejidos de los frutos en guayaba enfermos, algunos de estos cortes se tiñeron colocándolos en una gota de azul de algodón o safranina, por un minuto (18).

De los frutos de guayaba enfermos que presentaron en sus tejidos picnidios se procedió a aislar un alto número de ellos, usando una aguja esterilizada para separarlos de los tejidos, observando a través de un estereoscopio. Los picnidios se colocaron en agua sobre un portaobjetos, a fin de observarlos con el microscopio óptico, Leitz-Wetzlar (objetivo 10 X ocular 10 X) para proceder a caracterizarlos. El tamaño de las picnidiosporas se determinó midiendo 100 de ellas y usando un microscopio óptico Leitz-Wetzlar, con objetivo 40 X ocular 10 X con lámina micrométrica incorporada (factor de conversión: 2,85).

Los tejidos apicales con la presencia de picnidios fueron colocados en cámara húmeda para inducir la formación de picnidiosporas. Cada 24 horas, se colocaron picnidios en gotas de agua sobre un portaobjeto, que fueron triturados, para observar con el microscopio óptico la presencia de las esporas y proceder a determinar su color, forma y tamaño.

Frutos de guayaba con una pudrición apical incipiente (mancha rojiza de 0,5 mm en diámetro, se colocaron en diferentes condiciones de luz, temperatura y humedad para evaluar su efecto sobre la formación de los picnidios (3, 4, 14).

Se colocaron en bandejas de plástico (35 X 25 cm.), tres lotes de 10 frutos enfermos cada uno, con michebo y sin picnidios en sus tejidos apicales. Estas bandejas estuvieron bajo luz artificial producida por tubos de neón blancos colocados a una altura de 1,30 m y en condiciones de oscuridad continua y de luz y oscuridad alternada cada 12 horas. Estas condiciones se mantuvieron durante cinco días.

Cada 24 horas, después de iniciado el experimento se observaron los frutos bajo el estereoscopio para detectar la presencia de picnidios.

Lotes de 10 frutos enfermos cada uno, se colocaron en estufas marca Fisher-Isotem calibradas a las temperaturas de 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40°C. Se realizaron observaciones de los frutos bajo el estereoscopio, empezando a las 24 horas y durante un período de 120 horas, para detectar la presencia de picnidios en los tejidos apicales.

Lotes de 10 frutos enfermos; cada uno se colocaron bajo condiciones de humedad relativa de 32 por ciento, 55 por ciento, y 100 por ciento. Los frutos se colocaron en bandejas a temperatura ambiente del laboratorio (22-24°C), que contenían una caja de petri con soluciones saturadas de CaCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (32 por ciento HR), Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O (55 por ciento HR) y agua destilada esterilizada (100 por ciento HR) (6). Este experimento se mantuvo por un período de 120 horas, cambiándose las soluciones cada 48 horas, para asegurar el mantenimiento de la humedad relativa, en cada una de las bandejas y observando cada 24 horas bajo el estereoscopio, para detectar la presencia de picnidios.

De frutos de guayaba se aisló el hongo, inicialmente en el medio de agar-agua (AA) y a las 24 horas se transfirió el micelio al medio de PDA, hasta obtenerlo en forma pura y en el cual se mantuvo, para ser transferido a los otros medios utilizados para observar la producción de picnidios y esclerocios.

Los diferentes medios de cultivo utilizados (5, 17, 18) fueron: Medio de cultivo básico, a base de almidón, glucosa, sales y agar. La cantidad de glucosa y almidón varió su porcentaje en la forma siguiente: 0 %, 0,2 %, 1 %, 2 % y 4 %; Medio de cultivo con extracto de frutos de guayaba sanos. El extracto se preparó utilizando diferentes cantidades de pulpa y piel: 50, 100, 150 y 200 g; medio de cultivo de harina de soya, papel de filtro y agar; medio de cultivo de Leonian's; medio de cultivo de extracto de malta; medio de

cultivo de papa de soja, papel de hilo y agar, medio de cultivo de Leishman's, medio de cultivo de extracto de papa, medio de cultivo de avena-agar; medio de cultivo de papa-zanahoria-agar; medio de cultivo de agar-infusión de heno; los cuales se colocaron bajo temperaturas controladas (22-24 ° C) y en condiciones de luz fluorescente alternada (12 horas luz-12 horas oscuridad). Así mismo, se colocaron cajas de petri con los medios de cultivos a diferentes periodos de exposición a la luz solar (1,3,4,5 y 12 horas). Las cajas con los medios de cultivos se observaron por un mes para comprobar la formación de picnidios y esclerocios, y proceder así a su caracterización (forma, color y tamaño).

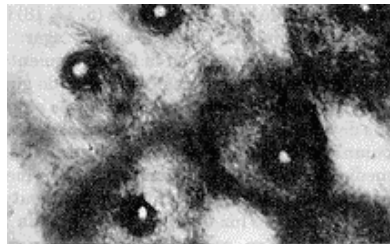
Con la finalidad de conocer el efecto de la temperatura sobre el crecimiento del micelio del hongo y en la producción de picnidios y esclerocios, cuando el mismo estaba en pleno desarrollo en los diferentes medios de cultivo, se realizó el siguiente experimento:

En placas de petri que contenían los diferentes medios de cultivo se colocaron discos de PDA (diámetro de 4 mm) con el micelio del hongo en la parte central del medio (18). Por cada tipo de medio de cultivo se usaron 5 placas de Petra. Luego de colocar el disco de PDA más micelio en las placas de petri, éstas se colocaron en estufas a la temperatura de 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40°C.

La observación del crecimiento del micelio se comenzó a las 18 horas de colocadas las cajas de petri en las diferentes temperaturas. Así mismo, se midió el avance del hongo cada 12 horas, midiendo el diámetro de crecimiento del micelio, para luego calcular el área de crecimiento del hongo en ese periodo, todo de acuerdo al método de French y Hebert (11).

## Resultados

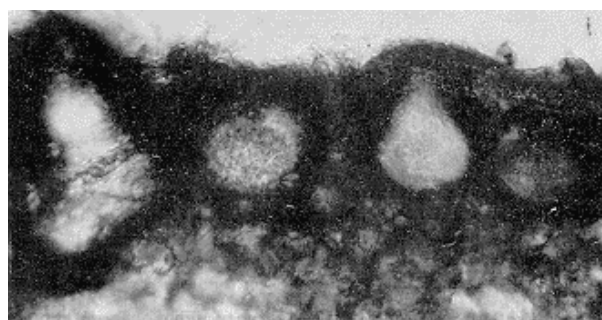
Se visitaron un total de 10 granjas, correspondientes a seis sectores Los Membrillos, Monte Claro, Los Lechosos, El Totumo, Las Cruces, Manantial; escogidos al azar del municipio Mara del Edo. Zulia. De los frutos colectados se detectó siempre la presencia de un micelio de color marrón rojizo y picnidios globosos de color negro con un ostiolo en su parte central superior (Fig.1) en la superficie de los tejidos enfermos y en condiciones de alta humedad del ambiente se observa un cirro de conidios (color blanco sucio) saliendo del ostiolo.



**Fig. 1. Picnidios individuales presentes en la superficie de los tejidos apicales de frutos de guayaba enfermos. Nótese el ostiolo central. (400x)**

En los cortes finos de tejidos enfermos se observó la presencia, de picnidios y micelio, pero no se detectó la presencia de esclerocios. Los picnidios se observan en forma individual, cubriendo toda la superficie del tejido enfermo, semi sumergidos en el tejido. El micelio se observa tanto inter como intracelularmente.

El espesor (10 µg) de los cortes; finos de los tejidos enfermos no permitió observar en detalle el interior de los picnidios (Fig. 1), por lo que no se pudo determinar en ellos el tipo de origen de los conidios. La forma de los picnidios varió de globosa a elíptica, con un cuello corto (a veces difícil de detectar) (Fig. 2). El tamaño de los picnidios se determinó al observar 100 picnidios usando un microscopio óptico Leitz Wetzlar, observando con el objetivo 10 X y con el ocular 10 X con lámina micrométrica incorporada (factor de conversión: 12,65). El tamaño de los picnidios fue, largo: 144,85 µm y ancho: 154,36 µm (en promedio).





**Fig. 2. Picnidios individuales a elípticos, negros, de 144,85  $\mu\text{m}$  de largo por 156,36  $\mu\text{m}$  de ancho (400 x)**

De los picnidios colocados en una gota de agua se liberaron las picnidiosporas, las cuales son unicelulares, hialinas, con sus extremos redondeados, y con la presencia de gutelos en su citoplasma, formadas de modo acrógeno en el conidióforo (Fig.3). El tamaño promedio de las picnidiosporas fue de, largo: 17,5  $\mu\text{m}$  y ancho : 5,75  $\mu\text{m}$  (en promedio) (proporción de 3:1).



**Fig. 3. Picnidios hialinas, con un extremo ahusado y otro truncado, gateladas, de 17,50  $\mu\text{m}$  de largo por 5,75  $\mu\text{m}$  de ancho. (3:1). (800).**

A las 72 horas de estar los frutos de guayaba enfermos bajo la exposición a luz artificial continua, oscuridad continua y luz artificial y oscuridad en forma alternada, se observó la zona apical de un color negro, sin la presencia de picnidio ni micelio. A las 96 y 120 horas los resultados fueron similares, notándose sólo el avance del color negro en los tejidos hacia el resto del fruto.

A las 144 horas se detectó la presencia de picnidios en forma abundante en la parte media superior y en el ápice de los frutos de guayaba enfermos, bajo los diferentes tratamientos de luz y oscuridad.

A las 72 horas, los frutos colocados a temperaturas de 28, 30, 32, 34 y 36  $^{\circ}\text{C}$ , presentaron el ápice de color negro. A las temperaturas de 38 y 40  $^{\circ}\text{C}$ , los frutos se observaron completamente deshidratados, duros y ennegrecidos. A las 96 y 120 horas, en los frutos además de observarse el ápice de color negro, presentaron una pudrición avanzada y un micelio de color gris verdoso cubriendo todos los tejidos dañados.

A las 144 horas, a las temperaturas de 28 y 30  $^{\circ}\text{C}$ , los frutos tenían consistencia floja y presentaban en los tejidos ennegrecidos picnidios en forma abundante y un micelio de color gris-verdoso. A las temperaturas de 32 y 34  $^{\circ}\text{C}$ , los frutos tenían consistencia dura, escaso micelio y picnidios en forma moderada. A la temperatura de 36  $^{\circ}\text{C}$ , los frutos tenían consistencia dura, sin micelio y escasos picnidios.

Se observó que a medida que aumentaba la humedad relativa del ambiente, se incrementaba la producción de picnidios. A la humedad relativa de 32 por ciento en los frutos se notó una producción escasa de picnidios; a la humedad relativa de 55 por ciento la producción de picnidios fue abundante y a un 100 por ciento de humedad relativa la producción de picnidios fue muy abundante.

Alas 24 horas de aislado el tejido enfermo en el medio de AA se observó el crecimiento de un micelio de color blanco. Este mico al ser pasado al medio de PDA creció rápidamente, tomando un aspecto algodonoso, cubriendo toda la superficie del medio (9 cm de diámetro) a las 96 horas de haber sido aislado, momento en el cual, el micelio presentó un color negro en el centro de la placa y blanco grisáceo en los bordes.

Microscópicamente, el micelio se observó hialino, al iniciar su crecimiento, para luego tomar un color marrón rojizo. Las hifas presentaron septas y se observó su ramificación en un ángulo de 90 grados, con una ligera constricción en la base de la nueva hifa.

En los diferentes medios de cultivos, el hongo creció en la forma siguiente:

**Medio de Cultivo Básico:** En las concentraciones de 1, 2 y 4 por ciento de glucosa y almidón el hongo creció produciendo

**Medio de Cultivo Básico:** En las concentraciones de 1, 2 y 4 por ciento de glucosa y almidón el hongo creció, produciendo picnidios, pero no esclerocios. En la concentración de 0,2 por ciento de glucosa y almidón el hongo creció lenta y escasamente, sin producir picnidios. En la concentración de 0 por ciento de glucosa y almidón el hongo no creció.

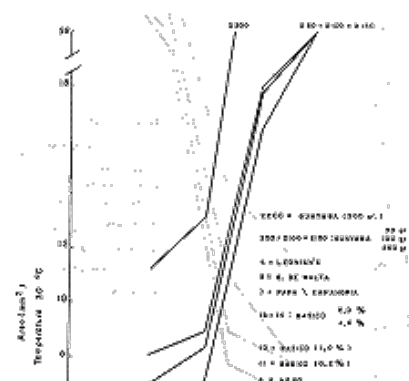
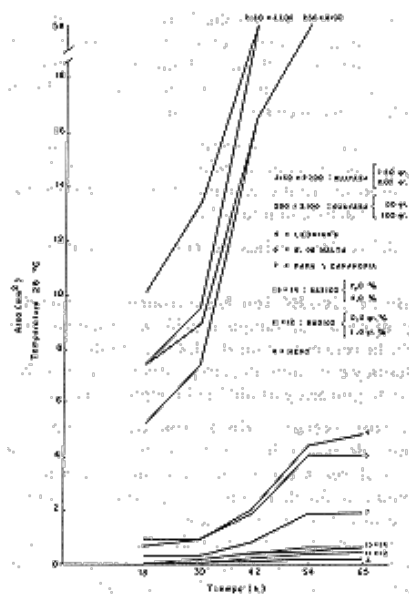
**Medio con extracto de Pulpa de Guayaba:** en las diferentes concentraciones de pulpa de guayaba el hongo creció y formó picnidios y estructuras similares a esclerocios muy abundantemente (grado 5 de la escala). Su formación fue de manera irregular en los diferentes aislamientos efectuados en diferentes épocas del año, observándose sólo algunas veces su presencia. Estas estructuras eran de consistencia floja, formadas por entrelazamiento de hifas del micelio, de color negro, de forma irregular (amorfas a globosas), con diámetros de 63,36; 144,36; 278,30 y 441,61  $\mu\text{m}$  (en promedio).

**Medios de Extracto de Malta, Avena, Papa-Zanahoria:** en estos medios el hongo creció moderadamente con estructuras similares a esclerocios, pero no picnidios.

**Medio de Leonian's y medio de infusión de heno:** el hongo creció lenta y escasamente, sin producción de picnidios ni esclerocios.

**Medio de harina de soya con papel de filtro:** el hongo no creció.

Los resultados de calcular el área de avance del micelio del hongo en los diferentes medios de cultivo a las temperaturas de 28, 30, 32 y 34  $^{\circ}\text{C}$ , temperaturas donde se observó el crecimiento del mico, se muestran en las figuras (4, 5, 6, 7).



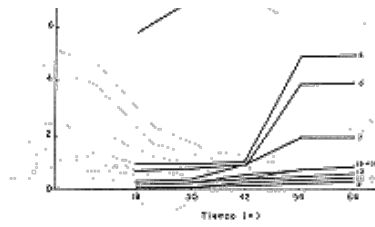


Fig. 5. Area de avance del micelio del hongo en diferentes medios de cultivos expuestos a la temperatura de 30 2°C.

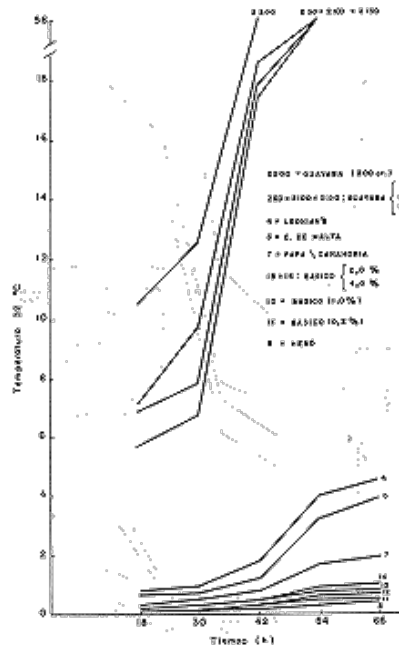
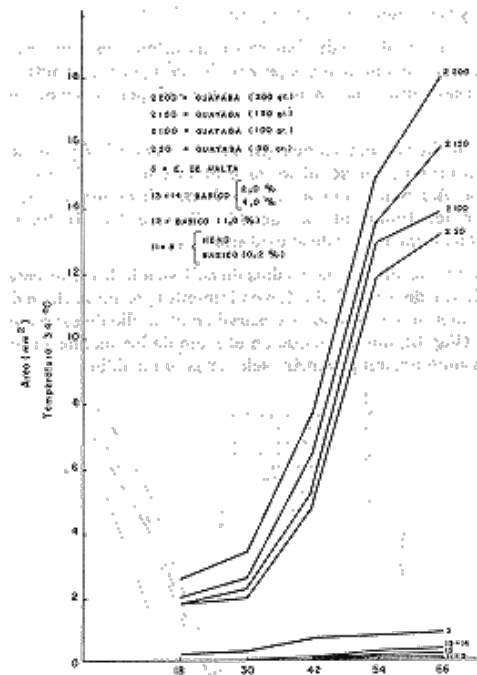


Fig. 6. Arca de avance del micelio del hongo en diferentes medios de cultivos expuestos a la temperatura de 32°C.





### Fig. 7. Area de avance del micelio del hongo en diferentes medios de cultivos expuestos a la temperatura de 34°C.

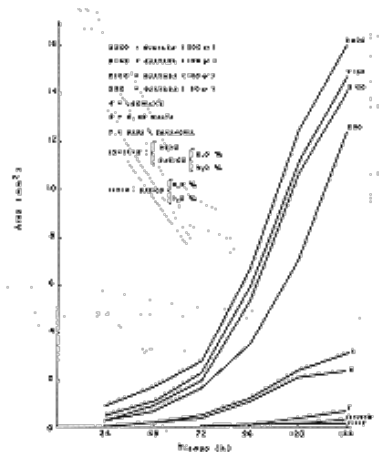
El hongo creció en forma muy abundante en el medio de extracto de pulpa de guayaba, a las temperaturas de 28, 30 y 32 11 °C; y en forma abundante a la temperatura de 34°C. Asimismo, a estas temperaturas se observa la presencia de esclerocios y picnidios a los 9 días de iniciado el experimento.

El hongo creció en forma escasa en los medios de Leonian`s y extracto de malta, a las temperaturas de 28, 30 y 32 11°C. En estos medios el hongo creció lenta y escasamente a la temperatura de 34°C.

En los medios de medio básicos (a las diferentes concentraciones de almidón y azúcar), avena-agar, papa-zanahoria-agar y agar-infusión de heno el hongo creció lenta y escasamente, a las temperaturas de 28, 30, 32 y 34°C.

En los medios de harina de soya más papel de filtro y medio básico sin glucosa y almidón, no se observó crecimiento del hongo a ninguna temperatura. Así mismo, el hongo no se desarrolló en ninguno de los medios de cultivo a las temperaturas de 36, 38 y 40 11 C; inclusive, a estas temperaturas los medios se deshidrataron.

Al exponer los diferentes medios de cultivo a la luz fluorescente por 12 horas y 12 horas de oscuridad (alternadamente) por un período de 5 días, el mayor crecimiento del micelio se observó en el medio de extractos de pulpa de guayaba (Fig. 8), mientras que en el resto de los medios el hongo creció lenta y escasamente, sin producir esclerocios ni picnidios.



### Fig 8. Area de avance del micelio del hongo en diferentes medios de cultivos expuestos a la luz fluorescente (12 horas) y oscuridad (12 horas) durante 5 días.

En los medios expuestos a la luz solar, se observó el desarrollo del micelio del hongo en forma escasa durante el día y durante una exposición no mayor de 2 horas aunque durante la noche el micelio era capaz crecer, avanzando radicalmente sobre la superficie del medio.

## Discusión

De los aislamientos realizaron de los frutos de guayaba enfermos con la pudrición apical, colectados en diferentes granjas del municipio Mara en diferentes estados de desarrollo de la pudrición apical y en diferentes épocas del año, en tejidos apicales enfermos se detectó la presencia de picnidios semimersos, de color ceniza a negro y la presencia de micelio septado, marrón rojizo, pero no se observaron esclerosis; confirmando esto los resultados obtenidos por Domínguez (9).

La producción *in vitro* de picnidios y picnidiosporas, en los tejidos de frutos de guayaba enfermos con la pudrición apical es favorecida por temperaturas entre 28 y 32 °C y una humedad relativa del ambiente entre 55 y 100 por ciento mientras que la luz no tiene ninguna influencia. Estas condiciones ambientales son similares a las que se observan en plantaciones de árboles de guayaba de más de 8 años de edad, en las cuales las ramas de los árboles se entrecruzan impidiendo la entrada del viento, lo que no permite que las temperaturas sean bajas (menores de 28 °C); esto va unido a la alta humedad existente en el ambiente (60-100 por ciento) por el exceso de agua aplicado, mediante el sistema de ciego por pocetas. Por ello, ambas cosas en conjunto podría favorecer la producción de picnidios y picnidiosporas en los frutos de guayaba enfermos con la pudrición apical, que son dejados en el suelo de las plantaciones luego de la cosecha.

El crecimiento del micelio del hongo fue rápido y abundante en los medios básicos con 1, 2 y 4 por ciento de glucosa y almidón y en los medios con extractos de corteza y pulpa de frutos de guayaba, medios ricos en azúcares. Así mismo, en estos micelios se detectó la formación de picnidios y picnidiosporas con características de forma, color y tamaño iguales a los observados en los tejidos apicales de frutos de guayaba enfermos con la pudrición apical. El crecimiento del micelio del hongo en los diferentes medios de cultivo bajo el efecto de diferentes temperaturas fue similar a las temperaturas de 28, 30 y 32 °C, reduciéndose el crecimiento a la temperatura de 34 °C. El crecimiento fue más abundante en los medios con extracto de corteza y pulpa de guayaba, sugiriendo la preferencia del hongo a medios artificiales y naturales con altas concentraciones de azúcares, posiblemente en la forma glucosa y almidón.

En los tejidos de los frutos enfermos no se observó la presencia de esclerocios. En los diferentes medios de cultivo en los cuales se sembró el hongo, sólo en los medios de extracto de malta y los que contenían extracto de pulpa de guayaba, en concentraciones entre 50-100 g, se observó la formación de estructuras similares a esclerocios en forma abundante. Estas estructuras; se formaban de más de un mes de edad, e inconsistentemente en los aislamientos realizados del hongo, eran de compactación floja, de forma irregular a globosa, con un diámetro de 63,36; 144,66; 78,30 y 441,61 µm.

En otro orden de ideas, estas estructuras podrían ser, algunas de ellas las de mayor diámetro- picnidios inmaduros en formación. Esto se trató de confirmar triturando las estructuras para observar su interior, consistiendo siempre el mismo de hifas flojamente entrelazadas y sin la presencia de conidióforos ni picnidiosporas, lo cual no niega la idea de que las estructuras sean picnidios inmaduros, pero su morfología indica que no son esclerocios. Esto debe ser estudiado con detalle para definir las fases de formación de los picnidios y las condiciones del medio de cultivo y del ambiente que favorecen su producción *in vivo*.

El hongo creció escasamente al estar expuesto a la luz solar, debido quizás, no a un efecto negativo de la luz, sino a la alta temperatura (mayor de 40 °C) generada en el interior de las cajas de petri por tiempos de exposición prolongada (entre 2 y 10 horas), activándose su crecimiento durante la noche al bajar la temperatura del medio ambiente y por ende, en el interior de las cajas de petri; esto no permite estimar si la luz solar tiene un efecto negativo o positivo sobre el crecimiento del hongo.

Las características morfológicas determinadas al hongo aislado e los frutos de guayaba con la pudrición apical fueron las siguientes: micelio inicialmente blanco tornándose con la edad, en un micelio negro, que microscópicamente se observa de un color marrón rojizo, septado, ramificado en un ángulo de 90 grados, con una ligera constricción en la base de la nueva hifa. En la superficie de los tejidos enfermos se producen picnidios globosos, de color gris a negro, individuales o confluentes, errumpentes, con un ostiolo central papilado, sobre el cual, en condiciones de alta humedad del ambiente se observa un cirro de picnidiosporas de color blanco sucio. El tamaño (promedio) de los picnidios fue de 144,85 µm de largo por 154,36 µm de ancho. Las picnidiosporas se forman acrógenicamente sobre conidioforos hialinos, cortos y rectos, son hialinas, rectas o ligeramente contornadas o curvadas, unicelulares, guteladas, con sus extremos redondeados y con un tamaño (promedio) de 17,5 µg de largo y 5,75 µg de ancho (proporción de 3: 1). Estructuras similares a esclerocios producidas inconsistentemente, de consistencia floja, formadas por hifas entrelazadas, de color negro, irregulares (amorfo a globosos) con diámetros entre 63,36 - 441,6 µm.

Al comparar estas características morfológicas del hongo con las reportadas para hongos de los géneros *Macrophoma*, *Fusicoccum* y *Macrophomina*, se observa que las características del hongo son muy similares a las del género *Macrophomina*, con algunas diferencias, especialmente en lo referente a la no formación de esclerocios, lo cual no permite adscribir el hongo a este género. El hongo se asemeja mucho a los géneros *Macrophoma* y *Fusicoccum*, con pequeñas diferencias que podrían permitir adscribir el hongo a uno de estos géneros.

Kapoor y Tandon (13) reportan una nueva especie de *Macrophoma*, *M. allahabadensis*, causando una pudrición de fruto de guayaba en Allahabad, India. Los síntomas de la enfermedad y las características de la especie, descritos por ellos, son similares a los observados en fruto de guayaba con la pudrición apical colectado en el Municipio Mara estado Zulia con algunas diferencias.

los observados en fruto de guayaba con la pudrición apical coronada, en el municipio Itaba, Estado Zulia, con algunas similitudes, que no permiten asignar al hongo aislado de fruto de guayaba enfermos con la pudrición apical a esta especie.

Sin embargo, los que mencionan Díaz Polanco y Rondón (8)... "muchos géneros han sido creados alrededor de organismos parecidos a los incluidos en el género *Macrophomina*, basta mencionar *Phyllosticta*, *Botryodiplodia*, *Phoma* y *Macrophomina* y los más recientes, *Peyronellae* y *Deuterophomina*. Grove y Alexopoulos comentan con acierto que las diferencias entre estos organismos son artificiales en su mayoría, ya que poseen coincidencias notables en morfología y fisiología". . . , muestra la confusión existente en la identificación de organismo similares a los géneros mencionados. Por ello, para esclarecer esta situación se hace necesario el realizar estudios de la conidiogénesis (forma de producción de picnidiosporas sobre los conidiosporos, a partir de la célula conidiogéna) de las picnidiosporas mediante el uso de la microscopía electrónica, característica consistente en la reproducción de los hongos y actualmente utilizada como primaria por los taxónomos de hongos en su identificación, para así adscribir en forma definitiva al hongo estudiado a una especie de los géneros *Macrophoma* o *Fusicoccum* o crear una nueva especie en uno de estos dos géneros.

## Literatura citada

1. AINSWORTH, G. C., F. K- SPARROW and A. S. SUSSMAN. 1973. The fungi, an advance treatise. Vol. IV A: Ataxonomic review with keys: Ascomycetes and Fungi Imperfecti. Chapter 11: Coelomycetes by B. C. Sutton. pp. 513 - 574.
2. AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY 1973. A compendium of corn diseases. St. Paul. Minn. pp. 40 - 41.
3. AMERICAN PHYTOPATROLOGICAL SOCIETY. 1976. Source book of laboratory exercise in plant pathology. W Freeman and Company Press. London. 385 p.
4. BERNAL, N. y C. ZAMBRANO. 1984. Efecto de la luz, temperatura, humedad y dos biocidas sobre *Metharrizium anisopline sorokin* (Metch). SVIA XI Jornadas Agronómicas. Maracaibo.
5. DADE, H. A. and J. GUNNELL. 1969. Class work with fungi. Notes for teachers. 2nd. ed. Kew, Surrey. England. 64 p.
6. DHINGRA, O. D. and J. B. SINCLAIR. 1977. An annotated bibliography of *Macrophomina phaseolina*. Universidade Federal de Viscosa Brasil 105 p.
7. DHINGRA, O. D. and J. B. SINCLAIR. 1978. Biology and pathology of *Maerophomina phaseolina*. Impresa Universitaria. Universidade Federad de Viscosa. Brasil. 116 p.
8. DÍAZ POLANCO, C y A- RONDÓN. 1971. Un tipo de Maerophomina patógeno en frutos de guayaba. Agron Trop. 11:111-118.
9. DOMINGUEZ, N. 1985. Identificación del agente causal de pudrición de frutos de guayaba. Tesis de Grado. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. 55p.
10. ELLIES, M. A-, G. E. GANEZ y J. B. SINCLAIR. 1976. Hongos internamente portados por la semilla y la calidad de la semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cosechadas en fincas de pequeños agricultores en cuatro departamentos. Notas Fltopatológicas. 5:79-82.
11. FRENCH, B. R. y T M HEBERT. 1989. Métodos de invocación fitopatológica. IICA. San José, C. P- 289 p.
12. INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. 1977. Programa Nacional de Hortalizas y Frutales. Manual de Asistencia Técnica N 4. 2da. ed. Tomo II. pp. 223-247.
13. KAPOOR, I. J. and R. N. TANDON. 1970. A new appecies of *Macrophoma* causing rot of guava (*Psidium guajava*). Indian Phytopathology. 23: 122-125.
14. KAPUR, S. P. and J. S. CHORM. 1974. Factors affecting infection and development of fruit rot in papaya by *Macrophomina phaseoli*. Indian Phytopathology. 27: 248-249.
15. KUMINOTO, R. K, R J. ITIO and W H. KO. 1977. Mucor rot guava fruits caused by *Mucor hienalis* Trop. Agric. (Trinidad) 54:185-187.
16. LEU, L. S., C.W. KAO, C. C. WANG, W.J. LIANG and S. P. Y. HSIEH. 1979. *Myxosporium* wilt of guava ands its control. Plan Disease Reporter. 63:1075-1077.
17. MACHADO, C. 1980. Esporulação de *Matrophomina phaseolina* (Tassi) Goid e viabilidae do metodo de inoculação de esporos em estudos de selerço de germoplasma resistente. Tesis de Grado. Piracicaba. Sao Paulo. Brasil. pp.15-18.
18. MYCOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA- 1974. Mycological Guidebook. Rusell Stevens, ed. University of Washington Press. Seattle. pp 657 -692.
19. OLARTE ESPINOZA, W 1972. Control fitosatarario en plantaciones de guayaba. Fondo Colombiano de Investigaciones Científicas y Proyectos Especiales "Francisco José Caldas". Bucaramanga, Col. 116 p.
20. RAJGOLAPAN, B. and K- I WILSON. 1972. *Diplodia natalensis* causing dry rot of guava fruit in South India. Plant Disease Reporter. 56:323-324.
21. SANTOS. R.. R. CARVAJAI, v R. MONTIEI.. 1989. Evaluación de cinco fungicidas en el control de la nudrición anical de

- ... los frutos de guayaba (*Psidium gajava* L.) Resúmenes III. Jornadas Científicas y Técnicas de la Facultad de Agronomía (LUZ). Maracaibo 16 -19 Octubre.
22. THURXTON COOK, M. 1939. Enfermedades de las plantas oconómicas de las Antillas Puerto Rico. 325 p.
  23. WILLAMS, R. J., R. A. FREDERIKSEN and J. C. GIRARD. 1978. Manual para la identificación de las enfermedades de sorgo y mijo. ICRISAT. Boletín Informativo No. India 41 p.
  24. ZAIWYER, W J. and H. R. THOMAS. 1957. A monographic study of bean diseases and methods for their control. USDP-Agricultural Technical Bulletin pp. 255-268.