

Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2015, 32: 309-324

## Eventos de pre-penetración, penetración y colonización de *Colletotrichum gloeosporioides* en flores y frutos de guayabo (*Psidium guajava* L.)

Pre-penetration, penetration and colonization events of *Colletotrichum gloeosporioides* in flowers and fruits of guava (*Psidium guajava* L.)

C. Guédez<sup>1</sup>, D. Rodríguez<sup>2</sup>, R. Olivar<sup>1</sup>, L. Cañizalez<sup>1</sup> y C. Castillo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico “Carlos Díaz Polanco”, Universidad de Los Andes, Núcleo Rafael Rangel, Trujillo, Venezuela.

<sup>2</sup>Postgrado de Fitopatología, Agronomía, Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”. Cabudare, Lara, Venezuela.

### Resumen

*Colletotrichum gloeosporioides* causa la antracnosis en frutos de guayabo, responsable del 40% de pérdidas a nivel mundial. Se determinó los eventos de infección de *C. gloeosporioides* en flores y frutos de guayabo. Frutos con madurez fisiológica y flores se inocularon con el hongo ( $1 \times 10^6$  conidios.mL<sup>-1</sup>), al tratamiento control se aplicó agua destilada estéril, se cubrieron con bolsas de papel blanco (27,2°C y 74% HR). Se tomaron muestras cada 2 h hasta las 12 h y cada 24 h hasta 120 h, fijadas inmediatamente en FAA (formaldehído, alcohol, ácido acético), deshidratadas en etanol (50, 70, 96 y 100%) y observadas en el microscopio electrónico de barrido. La germinación inició 3-4 h después de la inoculación (hdi) en flores y frutos, a las 24 hdi habían germinado más del 45% de conidios. El tubo germinativo varió de tamaño (40-70  $\mu$ m), con escasa formación de apresorios. La penetración del hongo ocurrió entre las 8 y 12 hdi. A las 12 hdi se inicia la colonización de tejidos, 48 hdi se formaron conidióforos y producción de conidios secundarios. A las 72 hdi aparecieron los síntomas de la antracnosis al microscopio de barrido, 96 hdi se observaron en el microscopio estereoscópico pequeñas lesiones en frutos y a simple vista a las 120 hdi; sin diferencias significativas ( $P > 0,005$ ) entre los eventos de pre-penetración, penetración y colonización en flores y frutos. En el control no se observó presencia del hongo. Se observaron los eventos de infección de *C. gloeosporioides*, información básica e importante para estudios epidemiológicos y control.

**Palabras clave:** penetración, germinación, colonización, antracnosis, microscopía electrónica.

## Abstract

*Colletotrichum gloeosporioides* causes anthracnose on guava fruits and it produces 40% of losses worldwide. The infection process of *C. gloeosporioides* was determined in guava flowers and fruits. Physiological maturity fruits and flowers were inoculated with the fungus ( $1 \times 10^6$  conidia / mL), the control treatment sterile distilled water was applied, covered with white paper (27.2°C and 74% RH). Samples were taken every 2 hours to 12 hours and every 24 hours up to 120 hours, fixed immediately in FAA (Formaldehyde, alcohol, acetic acid), dehydrated in ethanol (50, 70, 96 and 100%) and observed in the electron microscope scanning. Germination occur 3-4 h after inoculation (hdi) in flowers and fruits, to 24 hdi had germinated over 45% of conidia. The germ tube varied in size (40-70  $\mu\text{m}$ ), with little formation of appressoria. Fungal penetration occurred between 8 and 12 hdi. At 12 hdi tissue colonization starts, 48 hdi appear coarse conidiophores and conidia. At 72 hdi anthracnose symptoms observed at the scanning microscope, 96 hdi stereomicroscope observed in fruits and small lesions 120 hdi; no significant differences ( $P > 0.005$ ) between the events of pre-penetration, penetration and colonization of flowers and fruits. Not control the fungus was observed. Infection events of *C. gloeosporioides*, information basic and important epidemiological studies and control.

**Key words:** penetration, germination, colonization, anthracnose, transmission electron microscopy.

## Introducción

La antracnosis es una enfermedad del fruto de guayabo (*Psidium guajava* L.) causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc; es la más importante en pre y postcosecha de este cultivo, en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Barkai-Golan, 2001; Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2002; Moraes *et al.*, 2013).

Los síntomas causados por *C. gloeosporioides* normalmente se observan al comienzo de la maduración del fruto, sin embargo, la infección puede ocurrir en cualquier estado de formación del fruto, permaneciendo quiescente antes de la maduración, que luego se manifiestan como lesiones re-

## Introduction

Anthracnose is a disease of guava fruits (*Psidium guajava* L.) caused by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc; it is the more important pre and post harvest of this crop in the tropical and sub-tropical regions of the world (Barkai-Golan, 2001; Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2002; Moraes *et al.*, 2013).

The symptoms caused by *C. gloeosporioides* are normally observed at the beginning of the fruit ripening; however, the infection might occur in any forming phase of the fruit remaining quiescent before ripening; later the symptoms are rounded, plunged with dark-brown center that when get together produce necroses in

dondas, hundidas con el centro de color castaño oscuro, que al unirse producen una necrosis en los frutos maduros (Soares *et al.*, 2008; Lakshmi *et al.*, 2011).

El conocimiento de la biología del patógeno y el proceso epidemiológico de la antracnosis suelen ser eventos específicos de cada patosistema, sin embargo, el estudio de la infecciones cruzadas en diferentes frutas en el trópico, son esenciales para un mejor manejo pre y postcosecha de la antracnosis (Bruce Da Silva y Michereff, 2013). La infección por especies de *Colletotrichum* incluye una secuencia de eventos en el proceso de infección, entre los que se pueden mencionar: 1. Llegada del conidio a la superficie de la planta, 2. Adhesión del conidio, 3. Germinación del conidio, 4. Formación de apresorio, 5. Penetración de la epidermis, 6. Crecimiento y colonización de los tejidos y 7. Producción de acérvulos y esporulación (Bailey *et al.*, 1992; Bruce Da Silva y Michereff, 2013; Jeffries *et al.*, 1990; O'Connell *et al.*, 2000; Prusky *et al.*, 2000; Rodríguez-López *et al.*, 2009).

Los conidios de *C. gloeosporioides* son epidemiológicamente importantes, en campo son dispersados por agua de lluvia y la germinación e infección ocurre a temperaturas moderadas entre 25 y 30°C y la germinación de los conidios es muy variable y puede ocurrir entre 3 y 48 h después de la inoculación (López, 2001).

Los frutos pueden ser infectados en cualquier etapa de desarrollo, permaneciendo latente en forma de apresorio (estructura adhesiva, achatada, a partir de la cual se origi-

the ripened fruits (Soares *et al.*, 2008; Lakshmi *et al.*, 2011).

The knowledge of the pathogen biology and the epidemiologic process of the anthracnose are normally specific events of each patho-system; however, the study of crossed infections in different fruits in the tropic are essential for a better pre and post harvest handling of the anthracnose (Bruce Da Silva and Michereff, 2013).

The infection by *Colletotrichum* species include a sequence of events in the infection process, among which are: 1: Arrival of the conidial to the plant surface, 2. Adhesion of the conidia, 3. Germination of the conidia, 4. Appressoria formation, 5. Penetration of the epidermis, 6: Growth and tissue colonization and 7. Production of acervulus and sporulation (Bailey *et al.*, 1992; Bruce Da Silva and Michereff, 2013; Jeffries *et al.*, 1990; O'Connell *et al.*, 2000; Prusky *et al.*, 2000; Rodríguez-López *et al.*, 2009).

Conidias of *C. gloeosporioides* are epidemiologically important, in the field these are dispersed by rain water and the germination and infection occur at moderate temperatures from 25 to 30°C and the germination of the conidias varies and can occur from 3 up to 48h after the inoculation (López, 2001).

Fruits might be infected in any developmental phase remaining latent in appressoria-shape (adhesive and flat structure after which originates a sharp hypha that breaks the cuticle of an epidermis cell of the host by puncture allowing the penetration of the mycelia to establish the infection of a fungus) and the development of the disease normally starts in the

na una hifa afilada que rompe la cutícula de una célula epidérmica del huésped por punción permitiendo la penetración del micelio para establecer la infección de un hongo) y el desarrollo de la enfermedad por lo general comienza en la maduración (Lim y Manicom, 2003; Ploetz, 2005). Según Bailey *et al.*, (1992), la adhesión del apresorio asegura que el patógeno permanezca en contacto con el hospedante el tiempo suficiente para originar la punta de penetración y posteriormente la penetración.

La infección se ve favorecida por temperaturas cercanas a 30°C por largos períodos (Lim y Manicom, 2003). Después de penetrar el hongo emplea dos estrategias distintas de colonización: hemibiotrófica intracelular o intramural subcuticular o la combinación de ambas (Bailey *et al.*, 1992). Según Gomes-Moraes *et al.*, (2013), en frutos de guayaba la germinación ocurre a las 6 hdi, seguida de la formación del tubo germinativo y apresorios, la punta de penetración del apresorio se origina a las 48 hdi, con penetración directa en el epicarpio del fruto y el hongo coloniza el tejido entre las 96 y 120 hdi.

El objetivo de este estudio es describir los eventos de infección de *C. gloeosporioides* en frutos de guayabo (*P. guajava*) a través del microscopio electrónico de barrido, información necesaria en cada patosistema para definir eficientes estrategias de control.

## Materiales y métodos

**Ubicación del ensayo:** se realizó en la Finca RFA, ubicada en el sector Concesión 7, parroquia Liber-

ripening (Lim and Manicom, 2003; Ploetz, 2005). According to Bailey *et al.*, (1992), the adhesion of the appressoria assures that the pathogen remains in contact to the host enough time as to originate the penetration and after the penetration.

The infection is favored by temperatures close to 30°C by long periods (Lim and Manicom, 2003). After penetrating, the fungus employs two different colonization strategies: intracellular hemibiotrophic or subcuticle intramural or the combination of both (Bailey *et al.*, 1992). According to Gomes-Moraes *et al.*, (2013), in guava fruits the germination occurs at 6 hdi, followed by the germinative and appressory tube, the penetration point of the appressoria originates at 48 hdi with direct penetration in the fruit epicarp and the fungus colonizes the tissue from 96 to 120 hdi.

The aim of this research was to describe the infection events of *C. gloeosporioides* in guava fruits (*P. guajava*) through the electronic scanning microscope, information that is necessary for each pathosystem to define efficient control strategies.

## Materials and methods

**Location of the essay:** it was carried out at RFA farm, located at Concesion 7 area, Libertador parish, Baralt municipality, Zulia state, Venezuela (09°36'02" NL, 70°58'33" WL) (Sánchez *et al.*, 2009). This area presents typical flower elements of a dry tropical forest (Ewel and Madriz, 1968), precipitation of 1320 mm, temperature of 27°C and average

tador, municipio Baralt, estado Zulia, Venezuela (09°36'02" LN, 70°58'33" LO) (Sánchez *et al.*, 2009). Esta zona presenta elementos florísticos característicos de un bosque seco tropical (Ewel y Madriz, 1968), precipitación de 1320 mm, temperatura de 27°C y humedad relativa (HR) de 77% en promedio anual.

**Patógeno:** El hongo *C. gloeosporioides* se aisló de frutos de guayaba en madurez fisiológica y con síntomas de antracnosis, procedentes de la Finca RFA, se desinfectaron con solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 3 minutos y pequeños cortes del tejido enfermo del epicarpio del fruto fueron sembrados en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA).

**Material vegetal:** Se seleccionaron 10 árboles de guayabo de meso y endocarpio Rojo, de doce años de edad, sembrada a una distancia entre plantas y entre hileras de 7 x 7 m, con flores abiertas y frutos con madurez fisiológica, designadas como plantas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y se marcaron con cintas de color blanco.

**Inoculación de flores y frutos:** Las flores abiertas y frutos seleccionados se limpiaron con un algodón impregnado con agua destilada estéril, se cubrieron con una bolsa de papel blanco abierta por la base por donde se asperjó con la suspensión del hongo a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios.mL y selladas hasta su fijación en FAA. Las muestras de flores y peridermis del fruto (tamaño 5 x 5 mm) se realizó cada 2 h hasta las 12 h y luego cada 24 h hasta completar 72 h. Las flores y frutos testigos se asperjaron con agua destilada estéril.

relative humidity (RH) of 77% annually.

**Pathogen:** *C. gloeosporioides* fungus of ripened guava fruits and with anthracnose symptoms isolated, coming from the RFA farm, were disinfected with sodium hypochlorite solution at 2% for 3 minutes and small cuts of sick tissue of the fruit epicarp were sowed in a potato-dextrose-agar (PDA) culture medium.

**Vegetal material:** 10 guava trees were selected of red meso and endocarp, aging twelve years old and sowed at a distance of 7 x 7 m between plants and rows, with open flowers and fruits with physiological maturity designed as plants 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 and marked with white tape.

**Inoculation of flowers and fruits:** open flowers and selected fruits were cleaned with a cotton and sterile distilled water, were covered with a white plastic bag opened on the base where it sprayed with the fungi suspension at a concentration of  $1 \times 10^6$  conidia.mL and sealed in FAA until its fixation. The samples of flowers and fruit peridermis (5 x 5 mm) was performed every 2 h until 12 h and later every 24 h until completing 72 h. The flowers and witness fruits were sprayed with sterile distilled water.

**Statistical analysis:** a randomized design was used with four treatments:

T1: Application of *C. gloeosporioides* to the fruits

T2: Application of *C. gloeosporioides* to the flowers

T3: Application of sterile distilled water to the fruits

**Análisis estadístico:** El diseño del experimento fue completamente al azar, con cuatro tratamientos:

T1: Aplicación de *C. gloeosporioides* a frutos.

T2: Aplicación de *C. gloeosporioides* a flores.

T3: Aplicación de agua destilada estéril a frutos.

T4: Aplicación de agua destilada estéril a flores.

De los diez árboles seleccionados, en seis árboles se aplicó el T1 y T2 (tres árboles por tratamiento) y en cuatro árboles el T3 y T4 (dos por tratamiento). Se inocularon 3 frutos y 3 flores abiertas por árbol, para un total de 9 frutos para T1 y 9 flores para T2. Las muestras en campo en el caso de las flores, se tomaron tres pétalos por muestra y para frutos se tomaron realizando cortes (cinco cortes) del epicarpio de los frutos, aún en el árbol y fijados en FAA inmediatamente, dejando el fruto para los siguientes muestreos.

Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico SAS versión 9.1., a través de un análisis de la varianza y prueba de medias de Tukey ( $P < 0,05$ ).

**Observación de los mecanismos de infección por microscopía electrónica de barrido (MEB):** Las muestras de flores y frutos tomadas a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h después de la inoculación y fijadas en FAA, trozos de tamaño 2 x 2 mm, se deshidrataron en una serie creciente de concentraciones de alcohol etanol (50, 70, 96 y 100%) (Glavert, 1975), secadas con papel absorbente y cortados los tejidos a observar 5 x 5 mm, antes de ser colocada por 100 se-

T4: Application of sterile distilled water to the flowers

In six trees, out of the ten selected, T1 and T2 were applied (three trees per treatment) and T3 and T4 were applied in four trees (two per treatment). Three fruits and three opened flowers were inoculated per tree for a total of 9 fruits for T1 and 9 flowers for T2. In the case of the flowers, three petals were taken per sample, and the samples in the fruits were taken doing cuts (five cuts) of the fruit epicarp, still in the tree and immediately fixed in FAA, leaving the fruit for the following samples.

The data was analyzed using the statistical program SAS, version 9.1, with a variance analysis and Tukey mean test ( $P < 0.05$ ).

**Observation of the infection mechanisms by electron microscope scanning (EMS):** the samples of flowers and fruits taken at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96 and 120 h after the inoculation and fixed in FAA, with 2 x 2 mm of the size, were dehydrated in a crescent order of ethanol alcohol concentration (50, 70, 96 and 100 %) (Glavert, 1975), dried with absorbing paper and cut at 5 x 5 mm, before putting them for 100 seconds in an ionic cover SPI-Module™, at 300 angstrom where were covered with a gold plate.

This research was done at the laboratory of chemical and structure analysis (LAQUEM) of the Science Faculty of Universidad de los Andes, where samples were examined using the electron microscope scanning HITACHI 2500 with an analysis unit with EDFS.

gundos en un recubridor iónico SPI-Module™, a 300 angstrom donde fueron cubiertas con un baño de oro.

Este estudio se realizó en el Laboratorio de análisis químico y estructural de materiales (LAQUEM) de la Facultad de Ciencias de la Universidad del Los Andes, donde fueron examinadas en el microscopio electrónico de barrido HITACHI 2500 acoplado con unidad para análisis con EDFS.

## Resultados y discusión

### Eventos de Pre-penetración de *C. gloeosporioides* sobre flores y frutos de guayabo.

**Germinación y formación de apresorios:** La germinación se inició dentro de las primeras 4 h después de la inoculación (hdi), tanto en flores como en frutos (27,2°C y 74% HR), mediante la formación de un tubo germinativo desde uno de los extremos del conidio. A las 24 hdi habían germinado un 46,4% en flores y 48,8% en frutos (cuadro 1). Similares resultados encontró Gomes-Moraes *et al.* (2013) en *C. gloeosporioides* en frutos de guayabo y Curry *et al.* (2002) y Villanueva *et al.* (2006) en plantas de fresa. En frutos de lechosa la germinación de *C. gloeosporioides* ocurrió 48 hdi, la emergencia del tubo germinativo lateralmente (sin presencia de apresorios) por lo que influye la peridermis del fruto (Casarrubias *et al.*, 2002).

Los apresorios jóvenes son ligeramente pigmentados o hialinos y con el tiempo sus paredes se tornan gruesas y pigmentadas de melanina. Así mismo, la morfología del apresorio de una especie es constante dentro de un

## Results and discussion

### Pre-penetration events of *C. gloeosporioides* about flowers and guava fruits

**Germination and formation of appressoria:** the germination initiated the first 4 h after the inoculation (hdi) in both the flowers and the fruits (27.2°C and 74% RH), through the formation of a germinative tube from one of the conidia extremes. At 24 hdi, 46.4% had germinated in flowers and 48.8% in fruits (table 1). Similar results were found by Gomes-Moraes *et al.* (2013) in *C. gloeosporioides* in guava fruits and Curry *et al.* (2002) and Villanueva *et al.* (2006) in strawberry plants. In papaya fruits the germination of *C. gloeosporioides* occurred 48 hdi, the emergency of the lateral germinative tube (without presence of appressoria); thus, influencing the peridermis of the fruit (Casarrubias *et al.*, 2002).

Young appressoria are generally pigmented and with the time their walls become thick and pigmented with melanin. Likewise, the morphology of the appressoria of specie is constant on a limited variation rank. In some species, when ripening these become globose to oval or lobular (Jeffries *et al.*, 1990).

Occasionally, lateral germinative tubes were observed (figure 1A). Appressoria were observed at 4 hdi, and at 8 hdi these were already melanized. Similar results were found by Gomes-Moraes *et al.* (2013) in guava fruits; and the formation percentage of appressoria at 24 g in both flowers and fruits exceeded 60% (table 1).

**Cuadro 1. Porcentaje de germinación de conidios y formación de apresorios de *Colletotrichum gloeosporoides* en flores y frutos de guayabo (*Psidium guajava* L.) a 27,2°C y 74% HR, en la Finca RFA.**

**Table 1. Germination percentage of conidia and appressoria formation of *Colletotrichum gloeosporoides* in flowers and fruits of guava (*Psidium guajava* L.) at 27.2 °C and 74 % RH at RFA farm.**

Evento de infección	Órganos vegetales	Horas después de la inoculación (hdi)							
		2	4	6	8	10	12	24	
% Germinación conidios	Flores	0	3,2	6,8	11,6	20,4	35,6	46,4 <sup>a</sup>	
	Flores (Testigo)	0	0	0	0	0	0	0 <sup>b</sup>	
	Frutos	0	4,8	8,8	16,0	24,4	43,2	48,8 <sup>a</sup>	
% Formación apresorios	Frutos (Testigo)	0	0	0	0	0	0	0 <sup>b</sup>	
	Flores	0	3,6	6,4	18,4	26,4	30,8	60,4 <sup>a</sup>	
	Flores (Testigo)	0	0	0	0	0	0	0 <sup>b</sup>	
	Frutos	0	6,0	14,0	30,0	28,8	34,4	62,4 <sup>a</sup>	
	Frutos (Testigo)	0	0	0	0	0	0	0 <sup>b</sup>	

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente ( $P < 0,05$ ) para la prueba de comparación de medias de Tukey.



rango de variación limitado. En algunas especies, al madurar son de forma globosa a oval, o bien lobular (Jeffries *et al.*, 1990).

Ocasionalmente, fueron observados tubos germinativos laterales (figura 1A). Los apresorios se observaron a las 4 hdi y a las 8 hdi ya presentaban melanización; similares resultados encontró Gomes-Moraes *et al.* (2013) en frutos de guayaba; y el porcentaje de formación de apresorios a las 24 h tanto en flores como en frutos superaban el 60% (cuadro 1).

El estudio de los eventos de infección mediante microscopía electrónica de barrido, de *C. gloeosporioides* reveló un comportamiento similar tanto en frutos como en flores, sin diferencias estadísticamente significativas, mientras que si se presentaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con el testigo. El tubo germinativo presentó variabilidad en el tamaño desde 40  $\mu\text{m}$  hasta 70  $\mu\text{m}$  y en los extremos se formó un apresorio irregular o clavado, 4 hdi, lo cual coincide con lo encontrado por Gomes-Moraes *et al.* (2013) en *C. gloeosporioides* de frutos de guayaba.

En flores y frutos de guayaba inoculados a condiciones de 27,2°C y 74% HR, los apresorios se originaron desde largos tubos germinativos de longitud variable (figura 1C). Similar comportamiento en el desarrollo del tubo germinativo fue encontrada por O'Connell y Ride (1990) en *C. lindemuthianum*. Van Dyke y Mims (1991) consideran que la longitud del tubo germinativo se relaciona directamente con las condiciones de humedad, siendo más largo a medida que aumenta la humedad.

The study of the infection events through electron microscope scanning of *C. gloeosporioides* revealed a similar behavior in both fruits and flowers without significant statistical differences. However, there were significant differences with the witness ( $P < 0.05$ ). The germinative tube presented variability in the size from 40  $\mu\text{m}$  to 70  $\mu\text{m}$  and in the extremes an irregular appressoria formed, 4 hdi, which agrees to Gomes-Moraes *et al.* (2013) in *C. gloeosporioides* of guava fruits.

In flowers and guava fruits inoculated at 27.2°C and 74% RH, the appressoria originated from long germinative tube of variable length (figure 1C). Similar behavior in the development of the germinative tube was found by O'Connell and Ride (1990) in *C. lindemuthianum*. Van Dyke and Mims (1991) consider that the longitude of the germinative tube relates directly to the humidity conditions, being longer as humidity increases.

#### **Penetration events of *C. gloeosporioides*.**

**Infection:** The penetration mostly occurred (80%) directly to the epicarp from 8 to 12 hdi and was less common by natural openings such as the stomas. Gomes-Moraes *et al.* (2013) agree in the fact that the type of penetration in guava fruits is directly through the penetration of the appressoria and occurred at 48 hdi. Pandey *et al.*, (2012) found that the penetration of *C. gloeosporioides* in mango fruits occurred at 48 hdi, and at 72 hdi sub-cuticle infection was observed. The pre-infection phases in *Colletotrichum* are similar, these include adhesion of the conidia, germination, formation of the appressoria and penetration (Du *et al.*,



**Figura 1.** Microfotografías (microscopia electrónica de barrido) del desarrollo conidial de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre flores de guayaba. A y B. conidios germinados (3-4 hdi), C. conidios germinado e inicio de la formación de apresorio desde un tubo germinativo largo (8 hdi), en flores. D. Apresorio melanizado. a=apresorio; c=conidio; tg=tubo germinativo; gl=germinación lateral.

**Figure 1.** Micro-photographs (electron microscope scanning) of the conidial development of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava flowers. A and B. germinated conidias (3-4 hdi), C. Germinated conidias and beginning of the appressoria formation from a long germinative tube (8 hdi) in flowers. D. Melanized appressoria. A= appressoria; c= conidia; tg= germinative tube; gl= lateral germination.

#### Eventos de penetración de *C. gloeosporioides*.

**Infección:** La penetración ocurrió mayoritariamente (80%) de forma directa al epicarpio entre las 8 y 12 hdi y menos común por aberturas naturales como los estomas, sólo esporádicamente. Gomes-Moraes *et al.* (2013), coinciden en que el tipo de penetración en frutos de guayaba es directa a través de la punta de penetración del apresorio y ocurrió a las 48 hdi. Pandey *et al.*, (2012), encontró que la penetración de *C. gloeosporioides* en

2005; Rojas *et al.*, 2010). It has been reported that there are different ways to penetrate: by natural openings (stomas), wounds or direct penetration of the cuticle of the plants, being the latter the most common way (Bailey *et al.*, 1992).

**Colonization:** the latent phase of fungi was not observed, and at 12 hdi the colonization of the tissues initiated (figure 2A and 2B) through the superficial observation of a lateral cut. The progress of the infection towards the parenchyma originated damage of the

frutos de mango ocurrió a las 48 hdi y a las 72 hdi observó infección subcuticular. Los estados de preinfección en especies de *Colletotrichum* son similares, incluye adhesión de la conidio, germinación, formación del apresorio y penetración (Du *et al.*, 2005; Rojas *et al.*, 2010). Se ha reportado que existen diferentes modos de penetración: por aberturas naturales (estomas), heridas o penetración directa de la cutícula de las plantas; siendo esta última la forma más común (Bailey *et al.*, 1992).

**Colonización:** la fase de latencia del hongo no se observó y 12 hdi se inició la colonización de los tejidos (figura 2A y 2B) a través de la observación superficial de un corte lateral. El avance de la infección hacia el parénquima originó daño de tejidos y la colonización fue intracelular e intercelular. A las 48 hdi, comenzaron a surgir los primeros conidióforos generalmente por los estomas y producción de conidios secundarios (figura 2C y 2D), aún no hay síntomas visibles. A las 72 hdi comenzó a deteriorarse la epidermis donde se manifiestan los síntomas microscópicos de la antracnosis y algunos acérvulos (figura 2E y 2F), observados por microscopía de barrido. A las 96 hdi se podían observar en microscopio estereoscópico y a las 120 hdi a simple vista.

A las 12 hpi, se apreciaron fenómenos de lisis y colapso de las estructuras fúngicas sobre la superficie del fruto (figura 3A). Estos procesos han sido también observados por Leandro *et al.*, (2001) en *C. acutatum* sobre hojas de fresa escindidas. Las causas de este deterioro no se conocen pero algunos autores (Makowski y

tissues, and the colonization was intra and inter cellular. At 48 hdi, the first conidiophores started to emerge, generally by the stomas and the production of secondary conidias, still without visible symptoms. At 72 hdi, the epidermis, where the first microscope symptoms of anthracnose start to show up, started to deteriorate as well as some acervuli (figure 2E and 2F), observed by scanning microscope. At 96 hdi these were observed in stereoscope microscope and at 120 hdi these were observed at first sight.

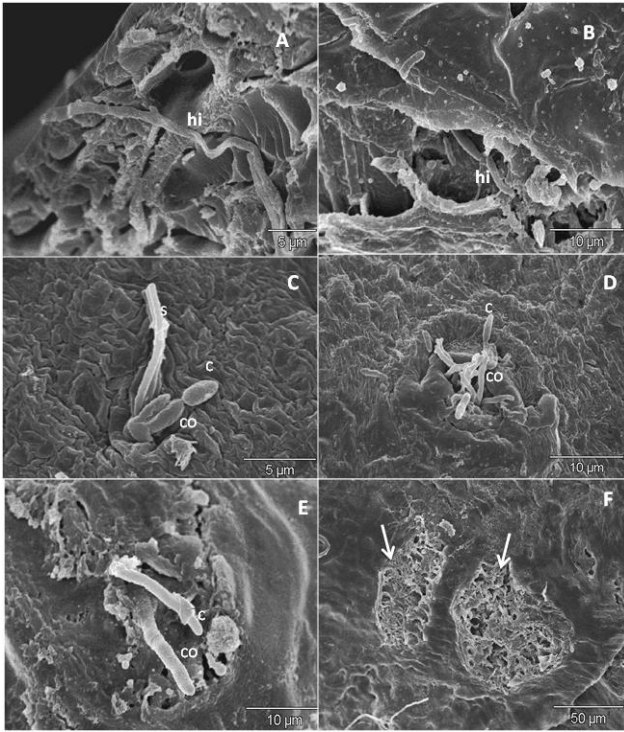
At 12 hpi, lysis phenomena were observed as well as collapse of the fungal structures on the fruit surface (figure 3A). These processes have also been observed by Leandro *et al.*, (2001) in *C. acutatum* on strawberry leaves. The cause of this deterioration is unknown but some authors (Makowski and Mortensen, 1998) attribute it to substances or exudates with toxic activity present in the foliar surface.

The production of secondary conidia or micro-cyclic conidia has been reported by Arroyo (2004) and Leandro *et al.*, (2001) in *C. acutatum* on split strawberry leaves.

Knowing the interaction of *C. gloeosporioides*-*Psidium guajava*, allow to know the time between the infection events (figure 4), characteristic of each patho-system and necessary to define an efficient handling of the disease.

## Conclusions

The knowledge of pre-penetration, penetration and



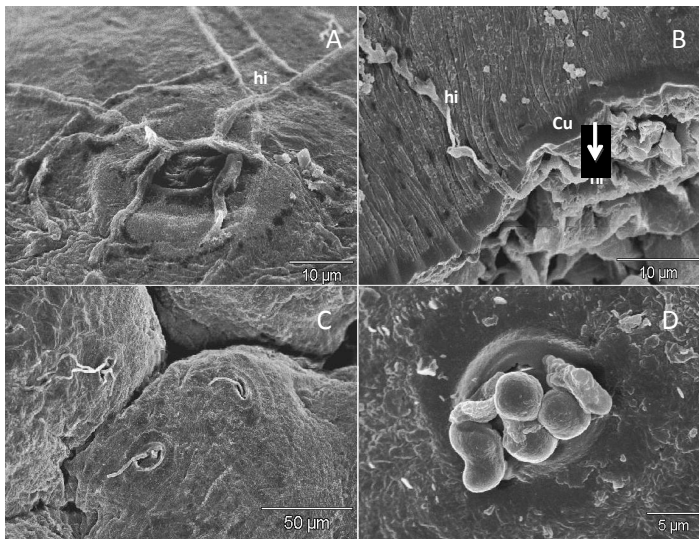
**Figura 2.** A y B. Colonización de tejidos en un corte transversal (48 hdi). C. Conidióforos y conidios secundarios. D. Emergencia de conidióforos y conidios secundarios a través de un estoma. E. F. Deterioro de la epidermis, posiblemente formación de acérvulos (Flechas) debido a la colonización y emergencia de conidióforos, se desarrolla el sintoma microscópico (72 hdi) en frutos de guayabo. c=conidio, co=conidióforo, hi=hifa, s=setas.

**Figure 2.** A and B. Collonization of tissues in a transversal cut (48 hdi). C. Emergency of conidiophores and secondary conidia through a stoma. E. F. Deterioration of the epidermis, possible formation of acervuli (arrows) due to the colonization and emergency of conidiophores, the microscope symptom develops (72 hdi) in guava fruits. C= conidia, co= conidiophores, hi= hypha, s= fungi.

Mortensen, 1998) lo atribuyen a sustancias o exudados con actividad tóxica presentes en la superficie foliar.

La producción de conidios secundarios o conidiación microcíclica ha sido

colonization events of the fungi *C. gloeosporoides* is relevant since it is a pathogen that causes considerable losses in the guava crop and other fruits.



**Figura 3. Microfotografías del desarrollo conidial de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre frutos de guayabo. A. procesos de desintegración y lisis de hifas y conidios sobre frutos (48 hdi). B. Corte transversal del fruto mostrando la penetración y crecimiento de la hifa a través de las células (60 hdi). C y D. Conidióforos emergiendo de estomas. (72 hdi) hi=hifa, cu=cutícula, flecha=hifa dentro del tejido.**

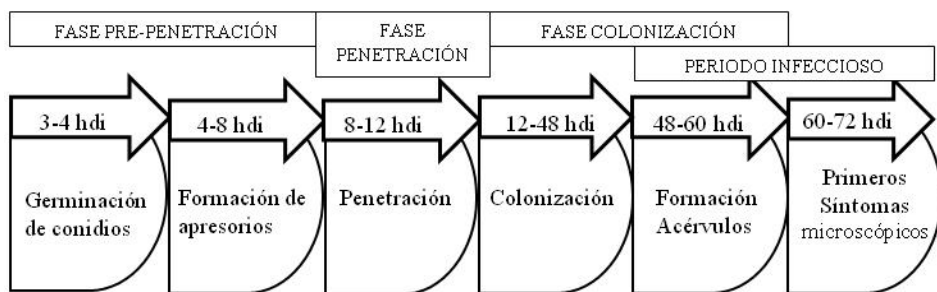
**Figure 3. Micro-photographs of the conidial development of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava fruits. A. disintegration process and lysis of hyphas and conidias on fruits (48 hdi). B. transversal cut of the fruit showing the penetration and growth of the hypha through the cells (60 hdi). C and D. Conidiophores emerging from stomas (72 hdi) hi= hypha, cu= cuticle, arrow= hypha inside the tissue.**

reportada por Arroyo (2004) y Leandro *et al.*, (2001) en *C. acutatum* sobre hojas escindidas de fresa.

El conocimiento de la interacción *C. gloeosporioides*-*Psidium guajava*, nos permite conocer el tiempo en que ocurren los eventos de infección (figura 4) que son propios de cada patosistema y son necesarios para definir un eficiente manejo de la enfermedad.

The infection process allows knowing the more accurate time to apply control measures which must be implemented before flowering.

*End of english version*



**Figura 4. Cronología de eventos del proceso de infección de *C. gloeosporioides* en flores y frutos de guayaba (*P. guajava* L.).**

**Figure 4. Event chronology of the infection process of *C. gloeosporioides* in flowers and fruits of guava (*P. guajava* L.).**

## Conclusiones

El conocimiento de los eventos de pre-penetración, penetración y colonización del hongo *C. gloeosporioides* son de relevancia, por tratarse de un patógeno que causa pérdidas considerables en el cultivo del guayabo y otros frutales.

El proceso de infección nos permite conocer el momento más oportuno para aplicar medidas de control, los cuales deben implementarse antes de la floración.

## Literatura citada

- Arroyo, F. 2004. Caracterización del proceso de infección de *Colletotrichum acutatum* Simmonds en plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.): Estructura y Ultraestructura. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. España. 212 p.
- Bailey, J., R. O'Connell, R. Pring y C. Nash. 1992. Infection strategies of *Colletotrichum* species. p. 88-120. In: *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (Eds.). CAB International. Wallingford, U.K.
- Barkai-Golan, R. 2001. Postharvest diseases of fruits and vegetables: development and control. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. 395 p.
- Bruce Da Silva, C. y S. Michereff. 2013. Biology of *Colletotrichum* spp. and epidemiology of the anthracnose in tropical fruit trees. *Revista Caatinga*. 26:130-138.
- Casarrubias U., E. Cárdenas, D. Nietoángel y J. Gutiérrez. 2002. Histopatología de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) infectados por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 20:88-93.
- Curry, K., M. Abril, J. Avant y B. Smith. 2002. Strawberry anthracnose: Histopathology of *Colletotrichum acutatum* and *C. fragariae*. *Phytopathology* 92:1055-1063.
- Du M., C. Schardl, E. Nuckles y L. Vaillancourt. 2005. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. *Mycologia* 97:641-658.
- Ewel, J. y A. Madriz. 1968. Zonas de vida de Venezuela. Memoria explicativa sobre el mapa ecológico. Ediciones del Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Editorial Sucre. Caracas, Venezuela. 265 p.

- Glavert A. 1975. Fixation, dehydration and embedding of biological Specimens. American Elsevier Publishing Co. New York. p. 197.
- Gomes-Moraes, S., F. Tanaka y N. Massola-Júnior. 2013. Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). Revista Brasileira de Fruticultura. 35(2):657-664.
- Gutiérrez-Alonso O., D. Nieto-Ángel, J. Gutiérrez-Alonso, F. Delgado-Sánchez y J. Domínguez-Alvarez. 2002. Características morfológicas, culturales y patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.). Revista Mexicana de Fitopatología. 20:24-30.
- Jeffries, P., J. Dodd, M. Jeger y R. Plumbly. 1990. The biology of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. Plant Pathology. 39:343-366.
- Lakshmi, B. K. M., P. N. Reddy y R. D. Prasad. 2011. Cross-infection potential of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolates causing anthracnose in subtropical fruit crops. *Tropical Agricultural Research*. 22 (2):183-193.
- Leandro, L., M. Gleason, F. Nutter, Jr., S. Weguloy P. Dixon. 2001. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. *Phytopathology* 91:659-664.
- Lim, T. y B. Manicom. 2003. Diseases of guava. p. 276-277. In: Ploetz, R.C. (Ed.). Diseases of tropical fruit crops. University of Florida (UFAS). Florida.
- López, A. 2001. Taxonomía, patogénesis e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. Revisão Anual de Patologia de Plantas. 9:291-339.
- Makowski R. y K. Mortensen. 1998. Latent infections and penetration of the bioherbicide agent *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* in non-target field crops under controlled environmental conditions. *Mycological Research*. 102:1545-1552.
- Moraes, S., F. Tanaka, y N. Massola-Júnior. 2013. Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). Revista Brasileira de Fruticultura, 35(2):657-664.
- O'Connell R. y J. Ride. 1990. Chemical detection and ultrastructural localization of chitin in cell walls of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 37:39-53.
- O'Connell, R., S. Perfect, B. Hughes, R. Carzaniga, J. Bailey y J. Green. 2000. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. p. 57-77. In: *Colletotrichum: Host specificity, pathogenicity, and host-pathogen interactions*. Prusky, D., S. Freeman y Dickman, M.B. (Eds.). APS Press. St. Paul, Minnesota, USA.
- Pandey A., B. K. Pandey, M. Muthukumar, L.P. Yadava y U.K. Chauhan. 2012. Histopathological study of infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz and Sacc. on *Mangifera indica* L. *Plant Pathology Journal*. 11 (1):18-24.
- Ploetz, R. 2005. Tropical fruit crops and the diseases that affect their production. UNESCO-Encyclopedia of life support systems (EOLSS). Vol. III. Florida.
- Prusky, D., I. Kobiler, R. Ardi, D. Ben-Moalem, N. Yakoby y N. Keen. 2000. Resistance mechanisms of subtropical fruits to *Colletotrichum gloeosporioides*. p. 232-244. In: *Colletotrichum: Host specificity, pathogenicity, and host-pathogen interactions*. Prusky D., S. Freeman y M. B. Dickman, (Eds.). APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA.
- Rodríguez-López, E., J. González-Prieto y N. Mayek-Pérez. 2009. La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos bioquímicos y genéticos. Revista Mexicana de Fitopatología. 27:53-63.

- Rojas E., S. Rehner, G. Samuels. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia*, 102(6):1318–1338.
- Sánchez, A., E. Suárez, M. González, Y. Amaya, C. Colmenares y J. Ortega. 2009. Efecto del ácido indolbutírico sobre el enraizamiento de acodos aéreos de guayabo (*Psidium guajava* L.) en el municipio Baralt, Venezuela. Evaluación preliminar. *Revista UDO Agrícola* 9 (1):113-120.
- Soares A., S. Lourenco y L. Amorim. 2008. Infection of guava by *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum* under different temperatures and wetting periods. *Tropical Plant Pathology* 33(4):265-272.
- Van Dyke, G. y C. Mims. 1991. Ultrastructure of conidia, conidium germination and appressorium development in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum truncatum*. *Canadian Journal of Botany*. 69 (11):2455-2467.
- Villanueva, R., E. Cardenas, A. Hernández, A. Mora y D. Téliz. 2006. Patogénesis de la antracnosis (*Colletotrichum fragariae*) en frutos de chirimoya. *Agrociencia*. 40 (6):773-782.