

ESTUDIO DE LA ANTRACNOSIS EN GUANABANA (*Annona muricata* L.). I. EFECTO EN LA MORFOLOGIA DE LAS HOJAS¹

J. F. SUBIROS*
E. M. FLORES*
E. VARGAS**

Summary

Leaves of Annona muricata L. (soursop) were inoculated with a suspension of Colletotrichum gloeosporioides Penz. conidia under greenhouse conditions. Samples were taken at different time intervals and prepared for light and electron microscopy observation. Most of the spore germination occurred between 24 and 36 hours after inoculation. Penetration through stomata was not observed. Appressoria started to develop infective hypha 24 hours later, without penetration of the cytoplasm. After 60 hours, the palisade and spongy parenchyma were damaged. Four or five days later, the cell walls in contact with appressoria and mycelia were destroyed. At the end of fifty days, the leaves were completely damaged. It is suggested that the fungus degrades the cuticle and the epidermal cell walls enzymatically.

Introducción

A*nnona muricata* L. (Annonaceae) en un cultivo pantropical. El fruto es rico en vitaminas y minerales y se utiliza en la elaboración de helados, jugos, concentrados aromáticos, gelatina, confites, sorbetes y siropes (6, 8, 10, 17, 19, 25). Las semillas pueden emplearse como suplemento en la alimentación de vacunos y también en la industria del jabón (6).

Con frecuencia *Colletotrichum gloeosporioides* (Deuteromycetidae), afecta la planta y produce la antracnosis; que ocasiona daños muy severos en tallos, hojas, flores y frutos (2, 4, 23, 24). En Costa Rica la enfermedad es severa en zonas de alta precipitación (23). Pequeñas manchas de color verde claro son los síntomas iniciales; éstas se agrandan con alta humedad relativa y forman grandes lesiones que se expanden hasta que toda la hoja es afectada y finalmente

defolia. El patógeno se disemina de la lámina foliar a los peciols y luego alcanza los tallos jóvenes, provocando la muerte descendente de las ramas (2, 3, 4, 16, 23, 25, 27).

El presente trabajo describe las alteraciones morfológicas que produce el hongo en las hojas de guanábana.

Materiales y métodos

En esta investigación se utilizaron plantas de guanábana (*Annona muricata*) de 25 a 30 cm de altura, que crecieron en condiciones de invernadero. Se inoculó las hojas jóvenes con un asa, en forma localizada y con el cuidado de no provocar heridas. Para ello, se empleó una suspensión de conidios de *C. gloeosporioides* aislados de lesiones foliares en plantas infectadas y cultivados en un medio nutritivo de papa dextrosa y agar en platos de Petri.

Los conidios de 15 días de edad fueron removidos con agua destilada y concentrados por centrifugación. En el lugar de aplicación de las esporas se colocó una cobertura de algodón y papel de filtro humedecido con agua destilada; se sostuvieron con piezas de papel plástico y se selló los bordes con cinta adhesiva para favorecer la germinación de las esporas. El ensayo se realizó durante los meses de agosto, setiembre y octubre de 1982.

¹ Recibido para publicación el 9 de marzo de 1984. Este trabajo es parte de la tesis presentada por el autor principal a la Escuela de Fitotecnia de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar el grado de Licenciado en Ingeniería Agronómica.

* Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica.

** Escuela de Fitotecnia, Universidad de Costa Rica.

Se colectaron muestras de hojas jóvenes inoculadas y secciones sanas cada ocho horas hasta completar 24 horas; cada 12 horas hasta completar 48 horas y cada 24 horas hasta completar cinco, siete, nueve y cincuenta días.

Los materiales para microscopía de luz fueron fijados en FAA (15) y/o glutaraldehído (16). Luego se lavaron con agua destilada, se deshidrataron por medio de una serie de alcohol butílico terciario (14) y se infiltraron en parafina. Se practicaron cortes transversales, longitudinales y paradermales de 10 μm de grosor. Se tiñó las secciones utilizando la técnica de Sharman (32).

Los materiales para microscopía de barrido fueron fijados en glutaraldehído al 4% en buffer de fosfatos a pH 7.0. Luego se lavaron con una solución buffer, se deshidrataron por medio de una serie ascendente de alcohol y acetato de amilo. Las muestras se secan en bases de aluminio, se cubrieron con oro y se examinaron al microscopio electrónico de barrido.

Resultados

Descripción morfológica de las hojas sanas

Las hojas son alternas, simples, enteras, exestipuladas y dorsiventrales. La epidermis abaxial y adaxial es uniseriada. Las células epidérmicas son rectangulares en la superficie abaxial y más cortas y redondeadas en la superficie adaxial. En ambos casos son uninucleadas y de bordes sinuosos (Figura 1). El grosor aproximado de la lámina foliar es de 0.15 mm aunque en la zona de la vena media alcanza hasta 0.33 mm. La cutícula tiene un grosor similar en ambas superficies. En estadios tempranos la superficie foliar es muy corrugada; esta característica desaparece cuando la hoja se desarrolla por completo.

En el haz y el envés hay idioblastos de tipo secretor, de forma redondeada, asociados a las células epidérmicas. La hoja es hipostomática. Los estomas son de tipo paracítico (rubiáceo) y alrededor de éstos se observan estrías bastante profundas (Figura 2).

La lámina foliar posee tricomas solitarios y bicelulares; a veces, éstos son multicelulares y de base compuesta. Son numerosos en la superficie abaxial, cerca de la vena media (Figura 2). El extremo distal de los tricomas, presenta acúmulo de sustancias fenólicas. En forma esporádica se observan esclereidas en el mesofilo.

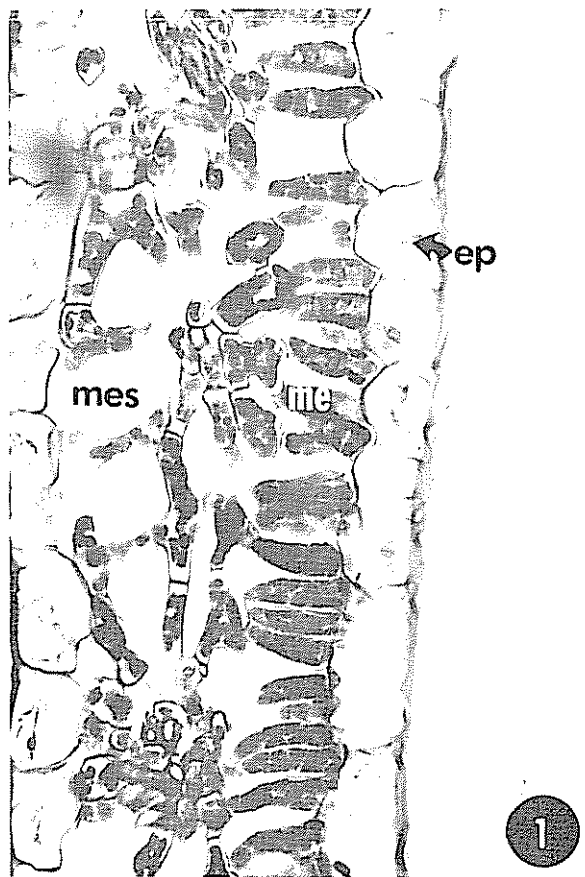


Fig 1 Sección transversal de una hoja sana (196X).
ep: epidermis, me: mesofilo de empalizada mes:
mesofilo esponjoso

Germinación de las esporas y efecto del hongo en las hojas

A las 16 horas de efectuada la inoculación, los conidios comienzan a germinar, pero no es sino hasta 24 ó 36 horas después que ocurre la mayor germinación. Los últimos forman de inmediato el apresorio, o recorren un trecho bastante largo sobre la superficie de la hoja antes de diferenciar dicha estructura. Este es periforme, estrecho en la base y ancho en el extremo distal (Figuras 3 y 5). La mayoría se forma entre las 16 y 48 horas. Algunas veces se producen divisiones bifidas del tubo germinativo; en cada una de ellas se origina un apresorio terminal. La formación de tubos germinativos por varios puntos de un mismo conidio se observó en algunos casos (Figura 3). En ningún estadio se vio penetrar el hongo por vía estomática, aún cuando el tubo germinativo pasara sobre el ostiolo.

Los apresorios se desarrollan intercelularmente e intracelularmente.

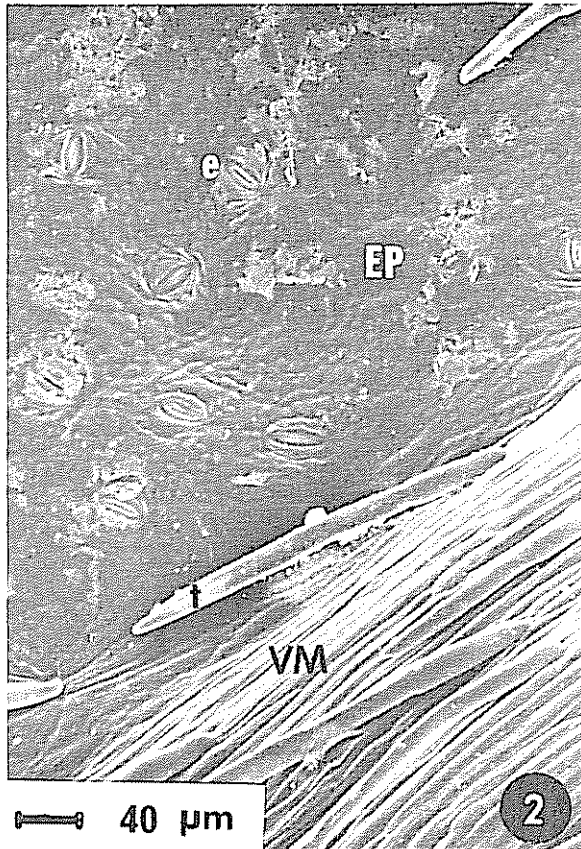


Fig. 2. Superficie abaxial de la hoja sana, observada al microscopio electrónico de barrido. t: tricoma, vm: vena media, ep: epidermis, e: estoma.

A las 24 horas de efectuada la inoculación, algunos apresorios desarrollan hifas infectivas que penetran la pared epidérmica. A las 36 horas, se forman pequeños puntos circulares de una coloración pardo oscura, apenas perceptibles a simple vista, distribuidos en diferentes puntos de la zona inoculada. Doce horas más tarde, algunos haces vasculares se oscurecen, pero no hay evidencia de que sea a causa de la actividad del hongo.

La mayoría de los apresorios no desarrollan hifas infectivas que penetren las células, y son, en apariencia, estructuras latentes. En las células donde se localizan apresorios con hifas infectivas se produce un aumento de la densidad del citoplasma; además, algunos agregados se ubican debajo de la estructura sin producir distorsión celular.

A las 48 horas de inoculada la hoja, existe una gran cantidad de micelio en la superficie foliar y hay alteración cuticular. En apariencia, el hongo efectúa una acción enzimática tendiente a disolverla.

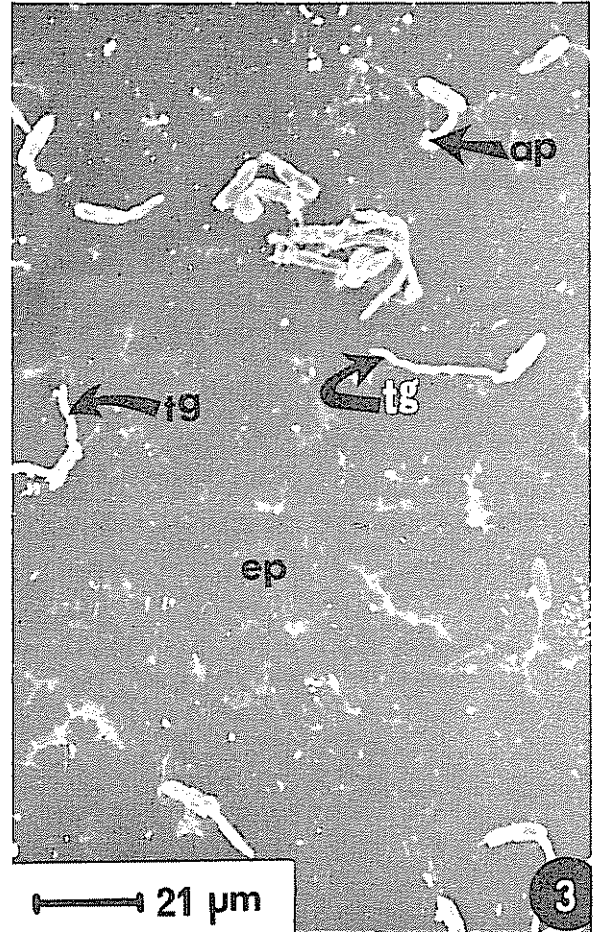


Fig. 3. Germinación de los conidios 24 horas después de realizada la inoculación. Nótese la formación de varios tubos germinativos a partir de un conidio y la formación temprana de apresorios. ap: apresorio, ep: epidermis, tg: tubo germinativo.

Sesenta horas después de la inoculación, además de observarse los síntomas de los estadios anteriores, se identificaron pequeñas áreas oscuras en la epidermis, inconspicuas lesiones esporádicas y reproducción superficial de conidios. En estas últimas lesiones la epidermis se necrosa, las paredes anticlinales se distorsionan, forman pliegues y el contenido celular se torna más denso, adquiriendo una tonalidad oscura. El tamaño del núcleo aumenta en algunos casos. El mesofilo de empalizada también se necrosa y las células pueden sufrir hipertrófia. Parte del mesofilo esponjoso es también afectado (Figura 4). Internamente no se distingue micelio.

Conforme avanza la acción del hongo sobre la cutícula, ésta muestra indicios de disolución. También

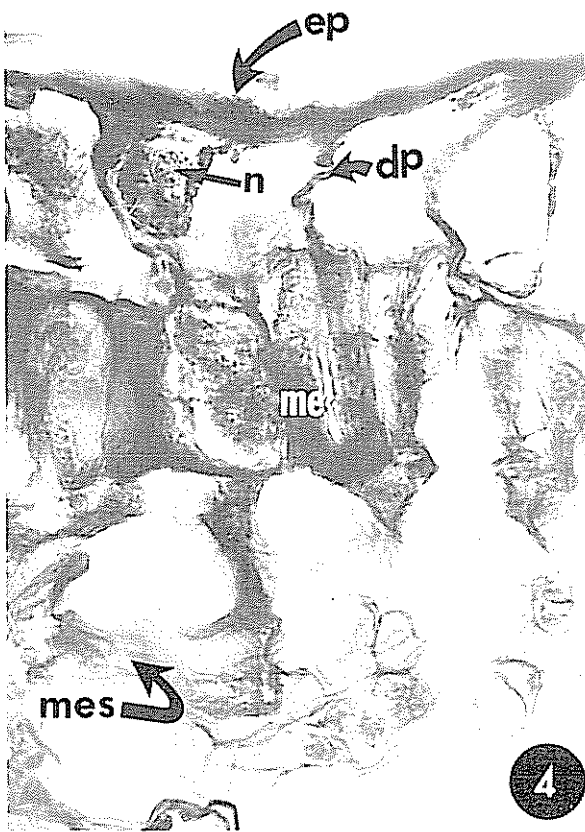


Fig 4 Corte transversal de la hoja. Obsérvese el daño causado por el hongo, 60 horas después de haber sido inoculadas (672X).
ep: epidermis, dp: doblamientos de pared, n: núcleo, me: mesofilo de empalizada, mes: mesofilo esponjoso.

se forman lesiones alargadas que llegan a alcanzar una longitud que oscila entre 0.8 y 1.5 mm y lesiones circulares de un diámetro de 0.35 mm que adquieren en el centro una coloración negruzca y un halo pardo rojizo.

Del tercero al noveno día, las lesiones adquieren un tamaño ligeramente mayor y se hacen más conspicuas. La epidermis se comprime mucho y la lámina foliar sufre una reducción en el grosor. Las células del mesofilo esponjoso y de empalizada se contraen bastante. Cuando el haz vascular coincide con el área de la lesión, se distorsiona y esclerotiza; el floema se oscurece y es frecuente la formación de tilides en el xilema. La actividad enzimática de los apresorios y del mismo micelio se hace muy notoria ya que provoca la ruptura de las paredes celulares epidérmicas en los puntos de contacto (Figuras 5, 6 y 7).

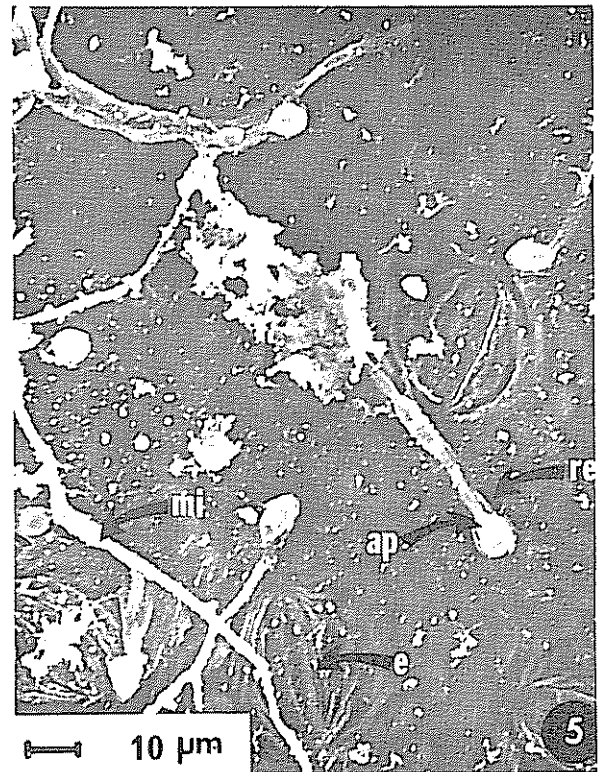


Fig 5 Apresorios en la cara abaxial, cuatro días después de realizada la inoculación. re: rompimientos de epidermis, e: estoma, mi: micelio, ap: apresorio

A los 50 días, las células epidérmicas sufren un colapso total y las paredes periclinales establecen contacto con las contiguas; algunas porciones se rompen. El mesofilo de empalizada también se necrosa y colapsa; en apariencia, los cloroplastos se desintegran. El mesofilo esponjoso casi desaparece (Figura 8). Los haces vasculares son muy afectados, el floema se oscurece y oblitera. Los elementos de los vasos, a menudo, se obstruyen por la formación de tilides. La presencia de micelio es común en el interior de la lámina. En la superficie externa se desarrollaron acérvulos adaxial y abaxialmente en forma esporádica. Estos poseen un estroma con conidióforos libres, no ramificados, que originan una gran cantidad de conidios.

Discusión

La superficie epidérmica irregular y la cutícula delgada de las hojas jóvenes podría tener algún efecto en la acumulación de conidios y agua en las depresiones y formarse un microclima especial. El tiempo que tardaron los conidios en germinar en las hojas de guanábana, coincide bastante con el observado en otros cultivos (9, 20, 26, 30). Después de la germinación, algu-

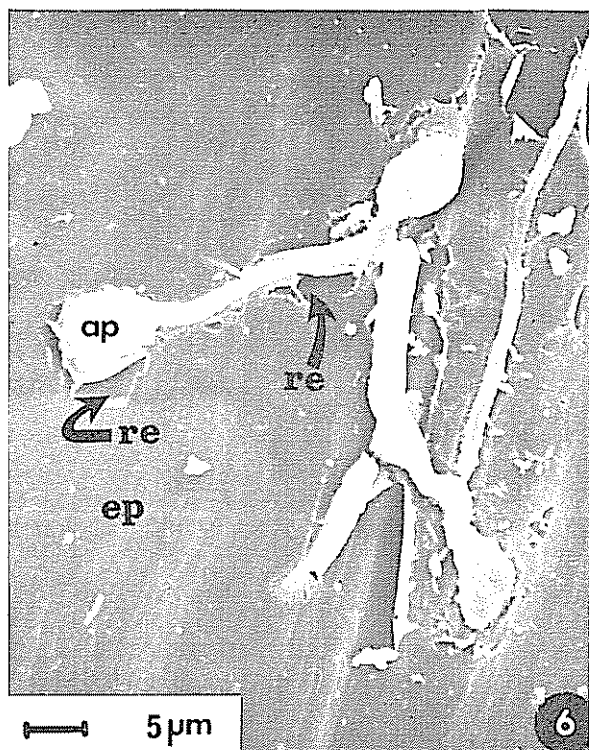


Fig. 6. Apresorio y micelio, ejerciendo una acción enzimática sobre la epidermis cinco días después de realizada la inoculación
ep: epidermis, ap: apresorio, re: rompimiento de epidermis.

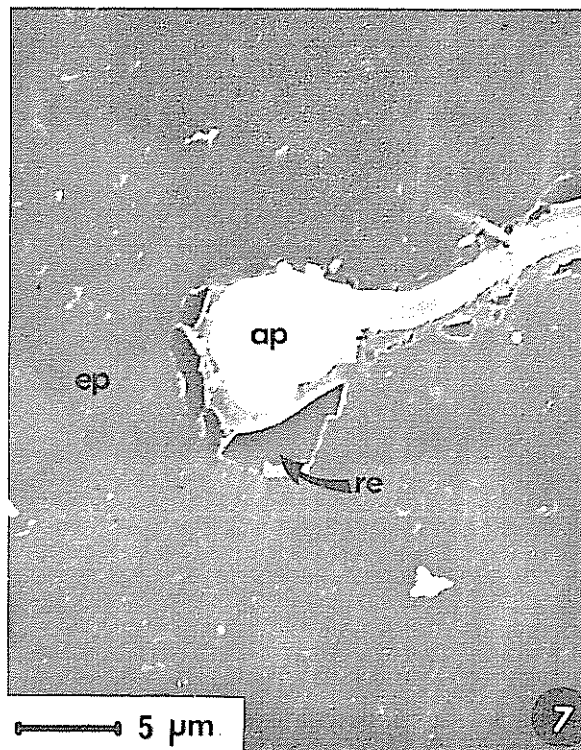


Fig. 7. Ampliación de una sección de la figura anterior.
ep: epidermis, re: rompimientos epidérmicos, ap: apresorio.

nos tubos germinativos desarrollaron inmediatamente el apresorio. Por el contrario, en otros, se extendió bastante lejos del punto de origen. Se supone que esto se debió a factores de competencia, ya que la inoculación se realizó con una alta concentración de esporas. También pudieron influir factores ambientales.

Durante los diferentes períodos de inoculación, no hubo evidencia de que las hifas infectivas de los apresorios penetraran al citoplasma. Esto sugiere que los apresorios son estructuras latentes del hongo y que solo bajo ciertas condiciones apropiadas podrían inducir la penetración de la hifa infectiva: por ejemplo, ciertas concentraciones de etileno (9, 12, 29, 34), determinado grado de humedad u otros factores. También indica este fenómeno, que el principal mecanismo de penetración no es por este medio, si no por otro, que será discutido más adelante.

El hongo inicia la actividad en la epidermis, y éste es el primer tejido afectado. Al cuarto día de inoculación, los resultados mostraron, que en apariencia, el hongo ejerce una acción enzimática sobre ese tejido:

esta acción va dirigida, en principio, hacia la disolución de cutícula. En los estados avanzados de inoculación, esta acción fue muy conspicua. El micelio y los mismos apresorios ejercen un efecto directo sobre la epidermis; provocan la disolución de la cutícula y la lisis de la pared como pudo observarse en las figuras respectivas. Esto hace pensar que el efecto principal de *C. gloeosporioides* es de carácter enzimático. Al respecto, existe una considerable evidencia de que las células del hospedante y/o la cutícula puede ser degradadas por enzimas durante el inicio de la penetración (7, 12, 22, 28, 31). Esta acción química provoca la desintegración de la pared y facilita el ingreso del micelio al interior del órgano.

En muchos casos, las células donde se localizan los apresorios, aumentan los agregados citoplasmáticos. Generalmente se considera este proceso como el reconocimiento mutuo inicial entre las células y el patógeno (5). Esto puede ser una respuesta de la célula a la penetración del hongo o secreción por parte del apresorio de algunas sustancias. En casos aislados, pareció que la plasmólisis de las células epidérmicas guardaba

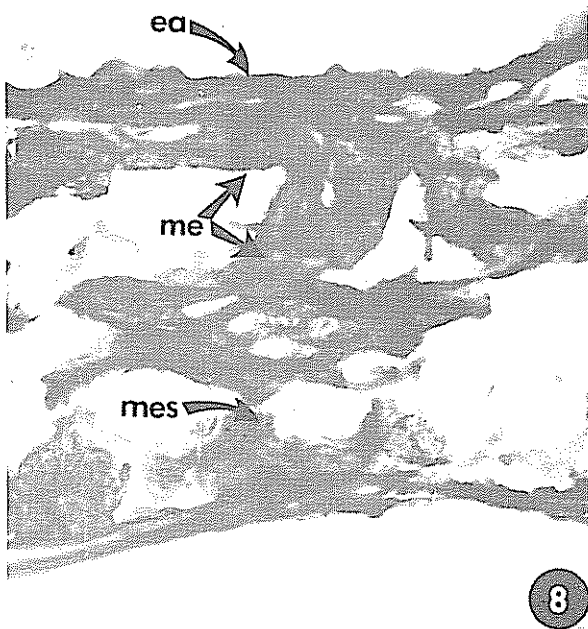


Fig. 8. Sección transversal de hoja completamente dañada, 50 días después de haber sido inoculada (672X)
ea: epidermis, adaxial, me: mesófilo de empalizada, mes: mesófilo esponjoso.

relación con la posible absorción de contenidos citoplasmáticos por parte de las hifas infectivas. Una vez realizada la lisis cuticular y la desintegración de la pared epidérmica, el micelio puede penetrar a los tejidos internos de la hoja, ya que muchos apresorios se forman en la pared entre las células contiguas o sobre ellas. La formación intercelular de esas estructuras sugiere una respuesta táctil del tubo germinativo, el cual, al hacer contacto con los bordes sinuosos de las células epidérmicas, induciría la diferenciación de los apresorios en esos puntos. Este proceso ha sido observado en otros hongos (35).

En las observaciones hechas, se pudo notar que la cantidad y velocidad de desarrollo de las lesiones, fue mayor en la cara adaxial. Este hongo muestra preferencia por el xilema y la penetración por superficie adaxial le permite alcanzar rápido este tejido. La superficie adaxial tiene una cutícula similar a la abaxial. Por lo tanto, en este caso concreto, el grosor cuticular no parece ser una barrera al ingreso del patógeno.

La cutícula de las plantas se considera la primera línea de defensa que se opone al ingreso de patógenos

y se asume que el grosor o composición química puede inhibir infecciones fúngicas mediante reducción en la germinación de esporas o penetración hifal (1). Martín y Juniper (21) establecen que los ácidos grasos no saturados que forman parte de las ceras cuticulares foliares constituyen la primera barrera estructural que dificulta el acceso del hongo a las células. Sin embargo, son cada día más los casos en los que no se observa relación entre el grosor o composición cuticular con el ingreso de hongos a los tejidos. Jarosz *et al* (13) puntualizan que el grosor de la cutícula puede variar bajo condiciones de menor intensidad de luz y temperatura o de mayor humedad.

El efecto más notorio es la afección del tejido vascular, en especial, del xilema; éste se necrosa y obstruye por la formación de tálides. El micelio puede desplazarse, sin dificultad por traza foliar y llegar hasta el cilindro central. También puede penetrar por las cicatrices foliares. La infección foliar también reduce la fotosíntesis ya que los mesófilos son bastante afectados. Esta reducción estaría relacionada con la magnitud de los daños producidos, ya que si éstos son grandes, hay caída de las hojas.

En pruebas preliminares al presente trabajo, se provocaron pequeñas lesiones sobre la superficie epidérmica de las hojas. Se comprobó que el hongo se desarrolla más fácil y rápido que en las pruebas de inoculación realizadas. Es importante entonces considerar que el patógeno además de penetrar en forma directa, puede hacerlo mediante heridas causadas por diferentes insectos tales como áfidos y membracidos (11, 33) y otros agentes como el viento y el roce mecánico de las hojas.

Resumen

Se inocularon hojas de *Annona muricata* L. (guanábana) con una suspensión de conidios de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. bajo condiciones de invernadero. Se colectaron muestras a diferentes intervalos de tiempo y se prepararon para ser observadas al microscopio de luz y microscopio electrónico de barrido.

La germinación de las esporas ocurrió en su mayoría entre las 24 y 36 horas posteriores a la inoculación. No se notó penetración por vía estomática. A las 24 horas, los apresorios comenzaron a desarrollar hifas infectivas sin que llegaran a penetrar al citoplasma. Transcurridas 60 horas el mesófilo de empalizada y el esponjoso sufren bastante daño. Entre el cuarto y quinto día se nota claramente un deterioro de la pared en los puntos de contacto entre la epidermis y los apresorios y el micelio. A los 50 días, la hoja queda dañada, por completo, en el punto de la lesión.

Se sugiere que el hongo degrada enzimáticamente la cutícula y luego la pared epidérmica

Literatura citada

1. AGRIOS, G. N. Plant pathology. Academic Press, New York. 1978. 629 p.
2. ALVAREZ, L. A. Anthracnose of the Annonaceae in Puerto Rico. Journal of the Agriculture of the University of Puerto Rico 33(1): 27-43. 1949.
3. ANONIMO. Primer curso internacional sobre fruticultura tropical. El cultivo de la guanábana. Maracay Venezuela 1978 pp 1-28
4. ARRUDA, S. C. Anthracnose e cancro das anoneas. O'Biologico 4(8):224-225. 1940.
5. ASADA, Y., BUSLMELL, W. R., OUCHI, S., y VANCE, C. P. eds. Plant infection: The physiological and biochemical basis. Japan Scientific Society Press. Tokio. 1982. 362 p.
6. AWAN, J. A., KAR, H., y UDOUDOH, P. J. Preliminary studies on the seeds of *Annona muricata* Linn. Qualitas Plantarum Plant Foods Human Nutrition 30(2):163-168. 1980
7. BAKER, J. Cutin degradation by plant pathogenic fungi. Phytopathology 68:1577-1584. 1978
8. BENERO, J. R., RODRIGUEZ, A. J., ROMAN DE SANDOVAL, A. A soursop pulp extractions procedure. Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico 55(4):518-519. 1971.
9. BINYAMINI, N. y SCHIFFMANN-NEDEL, M. Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. Phytopathology 62:592-594. 1972
10. CORDOBA, J. A. La chirimoya. Agricultura Tropical 17(11):647-664. 1961
11. DOMINGUEZ, D. E. Insectos perjudiciales del guanábano (*Annona muricata* L.) en el Estado de Zulia, Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía 4(3):149-163. 1978
12. HEITFUSS, R. y WILLIAMS, P. H. eds. Physiological plant pathology. Springer Verlag. Berlin 1976. 890 p.
13. JAROSZ, A. M., SHEETS, M. y LEVY, M. Cuticle thickness in *Phlox* and resistance to powdery mildew: an unreliable line of defense. American Journal of Botany 6(9): 824-828. 1982
14. JENSEN, A. W. Botanical histochemistry. W. H. Freeman & Co. Berkeley, California. 1962. 326 p.
15. JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. McGraw Hill Book Co. New York. 1940. 523 p.
16. KORNOUSKY, M. J. A formaldehyde gluteraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. Journal of Cell Biology 27:137-138. 1965.
17. LAKSHMINARAYANA, S., VELAZCO, J., SARMIENTO, L. y ANDRADE, R. Investigación preliminar sobre fisiología post-cosecha e industrialización de la guanábana (*Annona muricata* L.). Serie Investigaciones Fisiológicas 4. Comisión Nacional de Fruticultura Sag/México, 1974. pp. 5-12
18. LEAL, F. Notas sobre la guanábana (*Annona muricata*) en Venezuela. Proceedings of the tropical region. American Society for Horticultural Science 14:118-121. 1970.
19. LEON, J. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. San José. IICA. 1968. 487 p.
20. MARKS, G., BERBEE, J. G. y RIKER, A. J. Direct penetration of leaves of *Populus tremuloides* by *Colletotrichum gloeosporioides*. Phytopathology 55:408-412. 1965
21. MARTIN, J. T. y JUNIPER, B. E. The cuticles of plants. E. Arnold Press Ltd. 1970. 345 p.
22. McKEEN, W. E. y REIMER, S. R. Initial penetration process in powdery mildew infection of susceptible barley leaves. Phytopathology 63:1049-1055. 1973.
23. MORALES, F. Observaciones sobre la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) de la guanábana (*Annona muricata*) en Costa Rica. Primer congreso latinoamericano de fitopatología. Resúmenes. Maracaibo, Venezuela. 1979
24. MORALES, F. Ensayo sobre fungicidas para el combate de antracnosis en guanábana

- (*Annona muricata* L.). *Agronomia Costarricense* 5(1/2):75-80. 1981.
25. MORTON, J. F. The soursop guanabana (*Annona muricata* L.) Proceedings of the Florida State Horticultural Society 79:355-366. 1967.
26. NAIR, J. y CORBIN, J. B. Histopathology of *Pinus radiata* seedlings infected by *Colletotrichum acunatum*. *Phytopathology* 71:777-783. 1981.
27. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. Underexploited tropical plants with promising economic value. Washington. 1975. 188 p.
28. NICHOLSON, R. L., KUC, J. y WILLIAMS, E. B. Histochemical demonstration of transitory sterase activity in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 62:1242-1247. 1972.
29. PARBERY, D. G. y EMMET, R. W. Hypothesis regarding appresoria, spores, survival and phylogeny in parasitic fungi. *Review de Mycologie* 41:429-447. 1977.
30. QUIMIO, T. H. y QUIMIO, A. J. Pathogenicity of mango anthracnose organism. *Philippine Agriculturist* 58(7/8):322-329. 1975.
31. SCHMITTHERNER, A. F. Hydrolysis of pectin and cellulose by isolates of *Colletotrichum phomoides*, *C. lagenarium* and *Glomerella cingulata*. *Phytopathology* 42(9):474. 1952.
32. SHARMAN, B. C. Tanic acid and iron alum with safranin and orange G in studies of the shoot apex. *Stain Technology* 18:105-111. 1943.
33. STARY, P. Parasites and their role in limitation and control of aphidis attacking annonaceous trees in the West Indies /Hymenoptera: Aphidiidae; Homoptera: Aphidoidea). *Turrialba* 18(2):129-132. 1968.
34. WILLIAMS, P. H. How fungi induce disease. In *Plant Disease: An advance treatise*. J. G. Harsfal y E. B. Coraling eds. Vol. IV. Academic Press. London. 1978. pp. 163-179.
35. WYN, W. K. Appressorium formation over stomates by the bean rust fungus: Response to surface contact stimulus. *Phytopathology* 66(2):136-146. 1976.