

Caracterización de Microorganismos Fúngicos en Semillas de Arazá (*Eugenia stipitata*)

Characterising fungal microorganisms in Amazon peach seeds (*Eugenia stipitata*)

C. Torres¹, N. D. Correa², J.E. Díaz³

¹Ingeniero Agrónomo, Profesora Asociada, Universidad del Valle. cetorres@univalle.edu.com

²Biólogo, Universidad del Valle

³Ingeniero Agrícola. Profesor Titular, Universidad del Valle. jaidiaz@univalle.edu.com

Recibido: Febrero 13 de 2008. Aceptado: Marzo 13 de 2008

RESUMEN

Se caracterizaron microorganismos fúngicos, presentes en semillas de Arazá (*Eugenia stipitata*), provenientes de cultivos ubicados en el departamento del Caquetá. Se determinó el porcentaje de humedad y germinación de las semillas. Se estableció una relación de los agentes patógenos para las primeras etapas de crecimiento y desarrollo de la planta. Se identificaron dieciséis (16) géneros de hongos, de los cuales dos presentaron micelio estéril. Siete de los microorganismos fúngicos resultaron ser reconocidos patógenos de plantas, seis saprófitos facultativos (los cuales en condiciones de estrés pueden llegar a ser patógenos) y uno de carácter antagonista. Se obtuvo un porcentaje de humedad en las semillas del 12.6 % y la tasa de germinación para semillas sometidas a desinfección fue del 11%, corroborando reportes anteriores sobre su recalcitrancia.

PALABRAS CLAVES: patógenos, recalcitrancia, saprófitos, semillas.

SUMMARY

Fungal microorganisms present in Amazon peach (*Eugenia stipitata*) seeds from crops (locally known as araza) being grown in the Caquetá department were characterised. Humidity and seed germination percentages were determined. An account was made of pathogenous agents for the first stages of plant growth and development. Sixteen fungal genera were identified, two of them presenting sterile mycelia. Seven of the fungal microorganisms were recognised as being plant pathogens, six facultative saprophytes

(which could become pathogens in conditions of stress) and one of them an antagonist. 12.6% humidity was obtained in seeds and 11% germination rate in disinfected seeds, thereby corroborating previous reports about their recalcitrance.

Key words: pathogen, recalcitrance, *saprophyte*, *seed*.

INTRODUCCIÓN

El Arazá, (*Eugenia stipitata*) perteneciente a la familia Myrtaceae, es un arbusto arborescente originario probablemente de la Amazonía peruana (Mc. Vaugh, 1956). Se encuentra en estado silvestre y se presume que su domesticación comenzó en el occidente de la Amazonía (Filgueiras *et al.*, 2002). En Brasil y Perú los cultivos son extensos, pero sigue siendo parte de la agricultura tradicional de la región (Giacometti y Lleras, 1992). Su tecnificación es escasa, encontrando que Ecuador y Colombia, poseen cultivos de poca extensión. En Colombia, los cultivos se reducen a muy pocas regiones de los departamentos de Caquetá, Amazonas, Putumayo (Barrera *et al.*, 2001) y recientemente se está incorporando a regiones del Tolima y Valle del Cauca.

En estado silvestre presenta porte erecto alcanzando los 20 m de altura y al rededor de 6 m en plantaciones agrícolas (Falcao *et al.*, 1988). Se adapta a suelos pobres y ácidos, de clima tropical y subtropical (Giacometti y Lleras, 1999). Posee hojas elípticas opuestas con ápice acuminado y base obtusa a redondeada. Las flores son hermafroditas y se encuentran en inflorescencias

de hasta 5 flores por unidad. (Osorio *et al.*, 2001). El fruto es tipo baya, oblongo, de color verde opaco en sus primer estado y amarillento claro en su estado maduro. Su peso varía entre 150 y 800 g (Ferreira, 1992; Escobar y Zuluaga, 1996). Las semillas son de tipo reniforme y alcanzan tamaños entre (1.4 - 2.5) cm. de largo, y ancho entre (1 - 1.8) cm. El peso de las semillas fluctúa entre (1 - 4.3) g, aproximadamente (Osorio *et al.*, 2001). El fruto tiene un alto contenido de proteínas, lípidos, fibras, tiamina, riboflavina, vitamina C, calcio, potasio, magnesio, sodio, fósforo y hierro (Filgueiras *et al.*, 2002). Es apto para producir distintos productos como jugos, mermeladas (Calzada, 1985; Picón, 1989; Araujo y Ribeiro, 1996; Andrade *et al.*, 1997). También se obtiene pulpa congelada (Villachica *et al.*, 1996), fruta disecada (Flores, 1997) e incluso, sustancias para la elaboración de perfumes, debido a su particular aroma (Swift y Prentice, 1983; Clement, 1990; Villachica *et al.*, 1996). Sus posibilidades comerciales lo convierten en materia de interés y es conveniente identificar los posibles agentes patógenos que afecten la semilla para facilitar el desarrollo de paquetes tecnológicos que permitan mejorar las técnicas de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para las pruebas de germinación y cultivo de microorganismos se utilizaron semillas procedentes de la región amazónica colombiana, extraídas de frutos maduros y frescos de la subespecie *sororia*, suministradas por Corpoica Macagual, (latitud 1° 30' N, longitud 75° 44' O). Las semillas se seleccionaron de forma aleatoria para cada una de las pruebas y tratamientos, eliminando impurezas de manera manual y lavándolas con agua destilada. Los análisis se realizaron en el Laboratorio de

Fitopatología de la Universidad del Valle. Se emplearon cuatro gramos de semilla picada para la prueba de contenido de humedad.

Para la detección de microorganismos fúngicos se tomó un grupo de semillas que fue dividido en dos bloques de 90 semillas, colocando cada uno de ellos en alcohol al 70% durante 30 segundos. Adicionalmente un bloque se desinfectó con una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante un

minuto. Cada bloque de semillas fue sembrado en cajas de Petri, cinco por caja para un total de 18, empleando como medio de cultivo agar papa dextrosa (International Seed Testing Association, 1999). Para la siembra de muestras (Figura 1) se siguió la metodología de aislamiento de hongos fitopatógenos (Ávila, 2004; Torres, 2004). Se practicaron observaciones diariamente y se registró el crecimiento de las diferentes colonias morfológicamente diferenciadas. Figura 1.

Figura 1. Siembra de semillas en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA)



Para cada microorganismo aislado y de acuerdo a los diferentes morfotipos de hongos que se manifestaron en los medios de cultivo, se realizó un análisis cualitativo macroscópico de manera continua, considerando la textura, topografía de la colonia, color, crecimiento y formación de estructuras reproductivas en la superficie. Las descripciones de las colonias en cada aislamiento, fueron elaboradas de acuerdo a protocolos existentes.

Se realizó la identificación de los microorganismos utilizando tinción de muestras con lactofenol. Se observaron estructuras somáticas y reproductivas (conidias, conidióforos, tipos de hifas y coloraciones). Se realizaron placas con los microhongos usando dos técnicas: la primera, con

microcultivos aislados de las muestras fúngicas obtenidas a partir de las manifestadas inicialmente en presencia de las semillas; y la segunda, colocando colonias de hongos sobre portaobjetos con el uso de cinta adhesiva (Cuero, 1979). La caracterización e identificación de los hongos se realizó a través de claves morfológicas (Barnett y Hunter, 1972; Ellis, 1971; Sañudo *et al.*, 2001; Garcés *et al.*, 2003; Ávila, 2004).

La prueba de germinación de semillas se llevó a cabo en condiciones semi-controladas, bajo las siguientes características: Humedad relativa media de 71%, Temperaturas entre (22° - 34°) C. Se utilizaron 192 semillas, distribuidas en dos tratamientos; semillas desinfectadas y semillas sin desinfectar. (Tabla 1). Para cada uno de los grupos tratados previamente con agua destilada estéril se emplearon 96 semillas, que fueron sembradas a una profundidad de 1.5 cm., en arena previamente esterilizada, puesta en recipientes de aluminio agujerados en su base. Cada recipiente era humedecido diariamente con agua hervida. La prueba se llevó a cabo durante 140 días.(Figura 2). Tabla 1.

Figura 2. Montaje de semillas sembradas en arena estéril



Tabla 1. Características de la prueba de germinación de semillas

Tratamiento	No. de semillas	Procedimiento previo a la siembra	No de recipientes empleados	No de semillas por recipiente
Semillas desinfectadas	96	Desinfección con alcohol al 96%, por 30 s, solución de hipoclorito de sodio al 5%, por un minuto y lavado con agua destilada estéril	8	12
Semillas sin desinfectar	96	Remojo y posterior lavado con agua destilada estéril	8	12

Para la prueba de contenido de humedad se maceraron cuatro gramos de semilla sometiendo las muestras a temperatura constante de 103° C durante 17 horas.

Los datos se analizaron mediante tablas de distribución de frecuencias y diagramas porcentuales.

RESULTADOS

Manifestación y diagnóstico de microorganismos fúngicos

Los dos grupos de semillas mostraron crecimiento y desarrollo de hongos de diversas morfologías y géneros. El tratamiento de semillas sin desinfectar, presentó el 100% de crecimiento de al menos, una colonia de hongo. Para el tratamiento de semillas desinfectadas, se encontraron 66 colonias fúngica (73%), fenómeno que se presentó en la totalidad de las 18 cajas de Petri pertenecientes a este tratamiento. Se considera que el desarrollo fúngico en las semillas desinfectadas se debió a la existencia de esporas de hongos en el endospermo.

En ambos tratamientos, se identificaron 14 géneros diferentes y otros dos géneros adicionales presentaron el micelio estéril en todas las observaciones registradas, sin que fuera posible detectar estructuras reproductivas, impidiendo su identificación.

Varios de los géneros observados, presentaron manifestaciones diferentes y características macroscópicas diversas, probablemente debido a la

Se realizó un análisis estadístico, no paramétrico de tipo Chi-cuadrado, con un nivel de confianza del 95% para determinar la existencia de comportamientos aleatorios en la aparición de las colonias fúngicas para los diferentes tratamientos. Adicionalmente se elaboró un análisis adicional Chi-cuadrado en el caso particular de los cinco géneros de hongos presentes en los dos tratamientos.

posibilidad de que una misma especie, tome coloraciones o texturas diferentes en cultivos separados (Garcés *et al.*, 2003).

Análisis cualitativo de los microorganismos observados

De los cinco géneros registrados presentes en ambos tratamientos, tres son considerados de carácter fitopatógeno (*Colletotrichum* sp, *Fusarium* sp y *Curvularia* sp), y dos como saprofitos facultativos u oportunistas (*Aspergillus* sp, *Penicillium* sp). Para ambos tratamientos se presenta en la Tabla 3 la descripción cualitativa de los microorganismos fúngicos.

Respecto a los cuatro géneros identificados para el tratamiento de semillas no desinfectadas dos son reconocidos fitopatógenos (*Rhizoctonia* sp, *Geotrichum* sp), uno es un parásito ocasional (*Thielaviopsis* sp) y otro es antagonico neutralizador de otros hongos (*Trichoderma* sp). Adicionalmente se registraron otros dos microorganismos (H₁, H₂), los cuales, al presentar micelios estériles, no se lograron identificar.

Tabla 2. Presencia de hongos en cada uno de los grupos de semillas evaluados

Hongo	Semillas Desinfectadas	Semillas no desinfectadas
<i>Aspergillus</i> sp	X	X
<i>Colletotrichum</i> sp	X	X
<i>Fusarium</i> sp	X	X
<i>Penicillium</i> sp	X	X
<i>Curvularia</i> sp	X	X
<i>Rhizoctonia</i> sp		X
<i>Thielaviopsis</i> sp		X
<i>Trichoderma</i> sp		X
<i>Geotrichum</i> sp		X
<i>Rhizopus</i> sp	X	
<i>Pestalotia</i> sp	X	
<i>Cladosporium</i> sp	X	
<i>Helminthosporium</i> sp	X	
<i>Myrothecium</i> sp	X	
H ₁ (Micelio estéril)		X
H ₂ (Micelio estéril)		X

El análisis cualitativo de los microorganismos fúngicos presentes únicamente en el tratamiento de semillas no desinfectadas se presenta en la tabla 4.

Respecto a los cinco géneros fúngicos encontrados en las semillas sometidas a desinfección, dos son de reconocido carácter fitopatógeno (*Pestalotia* sp, *Cladosporium* sp, *Helminthosporium* sp), mientras que los otros tres son saprofitos facultativos u oportunistas (*Rhizopus* sp, *Myrothecium* sp).

La tabla 5 muestra el análisis cualitativo de los microorganismos fúngicos presentes únicamente en el tratamiento de semillas desinfectadas es el siguiente:

Frecuencias relativas de los microorganismos presentes en ambos tratamientos

Se encontraron cinco géneros presentes en los dos grupos de semillas. Once se detectaron únicamente en alguno de los dos tratamientos evaluados. En el

caso de los hongos presentes en ambos tratamientos, se registraron frecuencias de tamaño considerable (Figuras 3 y 4). *Aspergillus* sp fue el género con el mayor número de registros, para ambos tratamientos de semillas, alcanzando el 28% de presencia en semillas desinfectadas, mientras que en las no desinfectadas el porcentaje fue de 22%.

Germinación y contenido de humedad de las semillas

La germinación de las semillas registró pocos eventos exitosos. Del tratamiento de semillas desinfectadas germinó el 11,5%, de las 96 semillas. Para éste tratamiento la primera germinación se presentó el día 48. Posteriormente, durante los días 59, 60 y 61, se registró la germinación de otras cinco semillas, las cuales desarrollaron hipocótilos de 1.5 a 4.5 cm. Por último en los días 65 y 66, germinaron las últimas cinco semillas las cuales desarrollaron hipocótilos de 1.4 a 3.6 cm.

Tabla 3. Géneros registrados en ambos tratamientos

Hongos: Reino Fungi	Características macro y microscópicas
<p>Clase: Euzoomicetes Orden: Eurotiales Familia: Trichocomaceae Género: <i>Aspergillus</i> sp Parásito ocasional, inhibidor de la germinación (Kozakiewicz, 1989)</p>	<p>Textura: algodonosa con filamentos dispuestos paralelamente. La colonia presenta una coloración crema que al madurar adquiere una tonalidad brillante. Topografía: lisa y crema. Presenta hifas tabiculares y conidióforos, con cabeza localizada en el extremo de una hifa. Esta compuesta por una vesícula rodeada de fiálides, con forma de botella y dispuestas alrededor e insertadas directamente sobre la vesícula. De las fiálides se desprenden las esporas (conidias).</p>
<p>Clase: Anamorfos Orden: Melanconiales Familia: Melanconiaceae Género: <i>Colletotrichum</i> sp Parásito necrotrófico</p>	<p>Morfologías macroscópicas variables; la primera con textura granulosa, micelio café oscuro y matices blancos. La capa exterior amplia tiene micelio crema rodeado por un borde habano filamentoso. Topografía: lisa, crema con matices oscuros, en el centro varios puntos negros dispuestos de manera concéntrica. La segunda tiene textura gris claro con matices blancos, y una capa exterior amplia de micelio gris oscuro rodeado por un borde filamentoso de color crema. Topografía: lisa, crema con matices oscuros, con conidios hialinos, dispersos o agrupados, de forma cilíndrica y alargada con extremos redondeados. Apresorio de color café y de forma clavada e irregular (Barnett y Hunter, 1992).</p>
<p>Clase: Anamorfos Orden: Moniliales Familia: Tuberculariaceae Género: <i>Fusarium</i> sp. Parásito necrotrófico.</p>	<p>Morfologías variables con micelio extensivo, el primero de textura algodonosa, color claro con matices violáceos, presencia de finos radios proyectados desde el centro hacia afuera terminados en un borde delgado blanco. Al madurar, presenta una apariencia brillante con exudados en tonalidades amarillentas. Topografía: lisa, radiada, de color violeta oscuro. El segundo, con textura glabra, blanca y visos crema; desde el centro se despliegan finos filamentos. Topografía: lisa, radiada, crema. El tercero de micelio blanco, algodonoso no extensivo, con crecimiento moderado; se aprecian dos capas, la del centro con micelio más concentrado. Topografía: lisa, radiada de color crema. Los anteriores morfologías presentan hifas finas, septadas e hialinas. Forman conidióforos variables delgados, cortos e hialinos. Conidios acrógenos y de dos tipos: macroconidios de forma variable, fusiformes, falcados, comúnmente pedicelados o tabicados y microconidios pequeños, hialinos, de forma oval y elíptica. Los dos tipos de reproducción en un mismo esporodio (cuerpo fructífero). Clamidosporas, terminales e intercables (Barnett y Hunter, 1992)</p>
<p>Clase: Euzoomicetes Orden: Eurotiales Familia: Trichocomaceae Género: <i>Penicillium</i> sp Hongo oportunista (Lacey, 1989), diseminado por insectos y ácaros (Magan y Lacey, 1988)</p>	<p>Morfologías variables con micelio extensivo; la primera de ellas formando colonias circulares color crema, una segunda, con tonalidad blanquecina en la región distal de la colonia, rematada por un margen más claro de menos de 0.7 mm, en el centro la coloración de la colonia cambia de tonalidades rojizas a verdes. Se aisló una tercera, de textura verde, aterciopelada, con márgenes reducidos y blanquecinos menores a 1 mm, formando varias colonias circulares en una misma muestra. En todos los morfotipos, la superficie de la colonia madura es aterciopelada, ligeramente algodonosa. Las estructuras microscópicas se encuentran dispuestas formando conidios con una morfología ramificada semejante a un pincel, la cual terminaba en células fiálides.</p>
<p>Clase: Anamorfos Orden: Moniliales Familia: Dematiaceae Género: <i>Curvularia</i> sp. Parásito (Barnett y Hunter, 1992)</p>	<p>Textura: algodonosa, micelio extensivo, gris oscuro con matices gris claro. La topografía es lisa, oscura. Presenta hifas septadas, conidióforos rectos o flexibles, a veces nudosos de color café. Se observaron células conidiógenas de diferentes formas politétricas intercaladas e integradas. Conidia apical, oscura, solitaria, simple, frecuentemente curva, elipsoidal, ampliamente fusiforme o piriforme con tres o más septos transversales (Ellis, 1971).</p>

Tabla 4. Microorganismos fúngicos presentes en el tratamiento de semillas no desinfectadas

Hongos: Reino Fungi	Características macro y microscópicas
<p>Clase: Basidiomycetes Orden: Ceratobasidiales Familia: Ceratobasidiaceae. Género: <i>Rhizoctonia</i> sp Parásito (Barnett y Hunter, 1992).</p>	<p>Textura: harinosa algodonosa con micelio extensivo, blanco y proyecciones radiales definidas. Su topografía es lisa de color crema. Se observa presencia de hifas de micelio hialino y café, delgado, con grandes células multinucleadas y ramificaciones con septos desde la hifa principal (Garcés <i>et al.</i>, 2003).</p>
<p>Clase: Anamorfos Orden: Moniliales Familia: Dematiaceae Género: <i>Thielaviopsis</i> sp Parásito o saprofito (Barnett y Hunter, 1992).</p>	<p>Textura de apariencia efusa, afelpada, con micelio blanquecino, que en su desarrollo presenta matices de color café en tonalidades oscuras y claras, con algunas zonas rosadas y exudados en forma de gotas amarillas brillantes. La topografía es lisa, café oscuro. Presenta un conidióforo no ramificado o irregularmente ramificado, recto o flexible, hialino, liso, usualmente pigmentado y delgado; células conidiógenas terminales e intercalares; produce conidias esquizógenas, gruesas, hialinas a oscuras, cilíndricas, oblonga, frecuentemente en cadenas de 4 a más esporas (Ellis, 1971).</p>
<p>Clase: Anamorfos Orden: Moniliales Familia: Moniliaceae Género: <i>Trichoderma</i> sp Antagonista, saprofito del suelo y de la madera (Ahmad y Baker, 1987.)</p>	<p>La textura: es de color pardo claro y harinosas con zonas que alternan una banda delgada e incolora con otra ancha y de color verdoso. Las colonias forman núcleos de tamaño relativamente reducido, dispuestos en anillos concéntricos. Los cultivos observados tomaron un color verde brillante debido a conglomerados de conidios que se forman en las puntas de las hifas (Velásquez y Pineda, 1995a); sin embargo, se han señalado reportes indicando que también pueden ser de color blanco o amarillo (Velásquez y Pineda, 1995b). El género <i>Trichoderma</i> produce estructuras del tipo de conidias hialinas uniceluladas, de forma ovoide en conidióforo hialino largo no verticilado. Su estructura de esporulación consiste en conidios, y su estructura de resistencia similares a las de otros hongos formadores de clamidosporas (Cohen <i>et al.</i>, 1983); son intercalares o terminales, de forma cilíndricas a globosa (Windham y Baker, 1986).</p>
<p>Clase: Anamorfos Orden: Moniliales Familia: Moniliaceae Género: <i>Geotrichum</i> sp Agente causal de pudrición ácida en frutales (Pinedo, 2005)</p>	<p>Se observó presencia de escaso micelio aéreo, de apariencia afelpada y tonalidad blanca. La topografía es lisa, extendida y de crecimiento circular. A nivel microscópico, se observan hifas verdaderas que se ramifican dicotómicamente con artrosporas grandes en forma de barril producidos por fragmentación de las ramas laterales cortas que salen en ángulo recto de la hifa principal.</p>
<p>H₁ (Micelio estéril)</p>	<p>La textura es aterciopelada con micelios blancos y finos. Poseen bordes irregulares de crecimiento lento (tardan 3 días para se registrar evidencias de desarrollo de la muestra). Su topografía es lisa y blanca. Presenta ausencia de conidias con hifas septadas delgadas.</p>
<p>H₂ (Micelio estéril)</p>	<p>Su textura es algodonosa, con micelio blanquecino y ligeros tonos amarillentos. En los bordes, la colonia es un poco más concentrada, su crecimiento es moderado (aproximadamente 4</p>

Tabla 5. Microorganismos fúngicos presentes en el tratamiento de semillas desinfectadas

Hongos: Reino Fungi	Características macro y microscópicas
<p>Orden: Mucorales Familia: Mucoraceae Género: <i>Rhizopus</i> sp</p> <p>Hongo oportunista, ubicuo y cosmopolita (Pontón et al., 2002)</p>	<p>Textura algodonosa, de aspecto consistente, con denso micelio aéreo. Colonias de crecimiento rápido al principio de tonalidades blancas, después gris oscuras (con micelio crema a ligeramente marrón). Se reconoce fácilmente por sus esporangios hialinos o parduzcos, sus rizoides numerosos y pardos y sus esporangios son de color negro y lustroso.</p> <p>Es un hongo filamentoso que presenta esporangióforos sin ramificar, que nacen de un nudo de rizoides bien desarrollados. Los esporangios son esféricos oscuros (de hasta 275 µm de diámetro) con columela. Esporangiosporas negras. Abundantes rizoides y zigosporas esféricas de pared gruesa, desnuda (Pontón et al., 2002). Clamidosporas ausentes.</p>
<p>Clase: Anamorfos Orden: Melanconiales Familia: Melanconiaceae Género: <i>Pestalotia</i> sp</p> <p>Parásito (Barnett y Hunter, 1992).</p>	<p>Textura efusa, algodonosa, de color blanco con matices rosáceos. Al madurar el micelio oscurece un poco en el centro y en los bordes su color es amarillo, brotando allí exudados negros amarillos y brillantes. La topografía es lisa, de tonalidad amarillo claro con borde delgado blanco. En el centro aparecen varios puntos negros.</p> <p>Su estructura reproductiva es un acórvulo oscuro, de forma discoidal; conidióforos cortos y simples; conidia oscura, en forma masal o aislada con varias células, elongada o fusionada, con dos o más apéndices apicales hialinos. Hifas finas e hialinas (Barnett y Hunter, 1992).</p>
<p>Clase: Anamorfos Orden: Moniliales Género: <i>Cladosporium</i> sp</p> <p>Parásito (Barnett y Hunter, 1992).</p>	<p>Textura afelpada, con micelio matizado de colores grisáceos, rodeado por un borde irregular de tonalidad pardo claro. Su topografía es lisa y oscura. Presenta conidióforos oscuros, ramificados, en grupos o aislados cerca al ápice. Los conidios son blastosporas oscuras de 1 a 2 células variables en forma y tamaño de forma ovoide o irregular. (Barnett y Hunter, 1992).</p>
<p>Clase: Anamorfos Orden: Moniliales Familia: Dematiaceae Género: <i>Helminthosporium</i> sp</p> <p>Parásito o saprobio (Barnett y Hunter, 1992). Produce conidios en masas oscuras sobre las superficies vegetales</p>	<p>Textura aterciopelada, micelio con crecimiento moderado, de color gris claro con matices café y blancos; el borde es marcado, delgado, radiado de color crema. Topografía lisa, con tres capas circulares e irregulares, de tonalidades marrón con varios puntos negros dispersos.</p> <p>Presenta hifas septadas, conidióforos simples o ramificados, erectos o flexibles y cilíndricos; la parte media es café oscuro. Posee células conidiógenas politétricas, integradas, terminales e intercalares. Posee conidias (porosporas) solitarias, simples, usualmente subhialina. Tiene. Fragsporas pseudoseptadas frecuentemente con manchas café o negra en la base. Aparecen en masas o cadenas y en algunas especies desarrollan lateralmente y a veces en verticilos (Ellis, 1971).</p>
<p>Orden: Hypocreales Género: <i>Myrothecium</i> sp</p> <p>Patógeno oportunista común sobre diversas especies ornamentales, hortícolas y frutales, además de otros numerosos hospederos. (Bunster y Torres, 2003)</p>	<p>Textura efusa, algodonosa. Micelio desarrollado con tonalidades grises y cremosas. La topografía es lisa con matices oscuros. Los conidióforos son erectos, ramificados una o dos veces, y septados con cada rama terminando en filídes verticiliadas, clavadas, rectas y hialinas. Las conidias son cilíndricas, su coloración es inicialmente hialina y paulatinamente toma una tonalidad verde pálido. Posteriormente, la masa conidial pasa de ser verdosa, a oscurecerse, presentando también una apariencia más viscosa. Por último se seca y su coloración se torna negra (Ellis, 1971; Barron, 1968).</p>

Figura 3. Frecuencias relativas de manifestación de los microorganismos detectados en los tratamientos. (a) Semillas desinfectadas (b) semillas no desinfectadas.

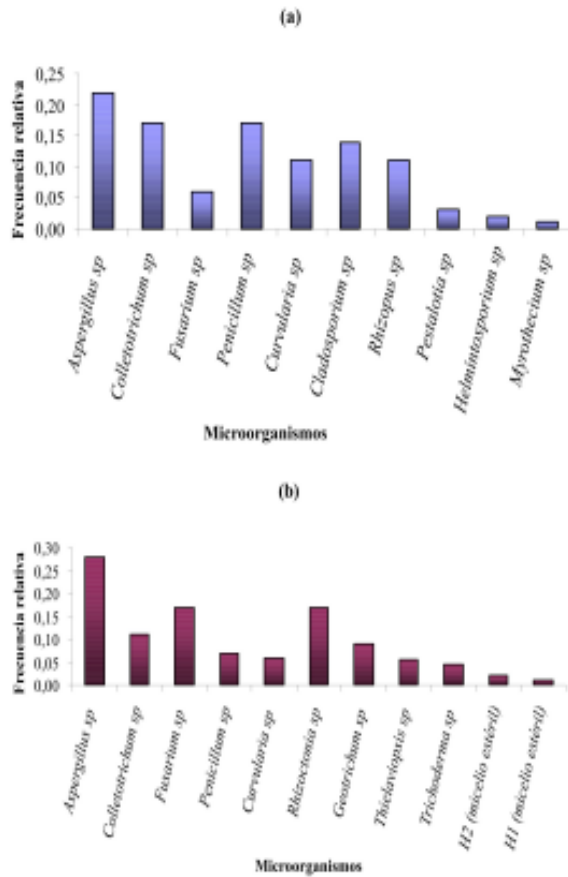
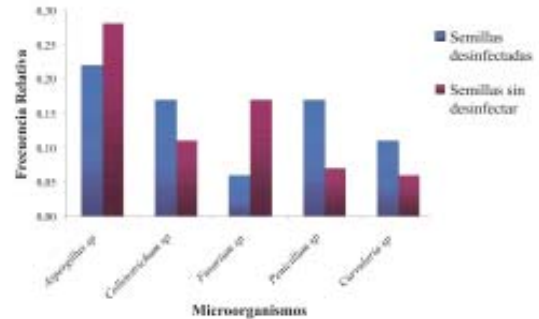


Figura 4. Comparación de las frecuencias relativas de los géneros observados en ambos tratamientos



El tratamiento de semillas no desinfectadas, solo registró germinación del 1%, del total de las 96 semillas, la cual se presentó en el día 70.

Tabla 6. Relación de los eventos germinativos exitosos y su día de ocurrencia (cada "X" representa una semilla germinada)

Número de día	48	59	60	61	65	66	70
Semillas desinfectadas	X	XX	XX	X	XXX	XX	
Semillas no desinfectadas							X

Resultado de la prueba de contenido de humedad de la semilla

El contenido de agua en la semilla fue del 12.6%, comparativamente alta con la registrada para otros integrantes de la familia Myrtaceae, como *Psidium guajaba* (5.5%) y *Eucalyptus globulus* (6%).

DISCUSIÓN

Los registros de *Aspergillus sp* fueron la mayoría de los 16 géneros hallados. Según Kozakiewicz (1989) se debe a la capacidad que posee *Aspergillus sp* para crecer a diferentes temperaturas y sobre sustratos con variados contenidos de humedad. Además, la mayoría de especies de este hongo puede desarrollarse sin problemas en semillas que contengan un porcentaje de humedad, entre el 10 y el 20% y la colonización de semillas por parte de este moho, se produce de forma explosiva cuando

la humedad relativa del ambiente intergranular es superior al 70%, sin desencadenar aún el fenómeno de germinación (Eguiazú 1984). Por lo tanto las semillas de *E. stipitata*, con registros de contenido de humedad promedio del 11.5%, constituyen hospederos adecuados para su desarrollo. especies vegetales (Swift, 1997). De acuerdo con Vera *et al.* (2002) el Arazá ha logrado aprovechar la presencia de estos dos hongos en su rizósfera para la obtención principalmente de fósforo.

Colletotrichum sp, registró mayor presencia en el tratamiento de semillas desinfectadas (17%), en comparación con las semillas no desinfectadas (11%), lo cual indica que es un hongo asociado al endospermo de la semilla. La mayor frecuencia obtenida para las semillas sometidas a desinfección, podría deberse a que en dicho tratamiento no hubo presencia de ningún hongo de carácter antagonista que logre neutralizar el desarrollo de cepas fitoparásitas, como es el caso de *Trichoderma* sp (Villegas y Castaño, 2000) fenómeno que sí se registró en semillas sin desinfección.

Con respecto a *Fusarium* sp, parásito necrótico de gran ubicuidad (Nicholson, 2001), y amplia tolerancia a los cambios de pH (Carrillo, 1990), su incidencia en las semillas es mayor en las no desinfectadas que en las sometidas a desinfección (17 y 6% respectivamente). Sin embargo, salvo *F. culmorum*, el cual crece en un rango de temperatura de 5-15° C (Backhouse, 2001), los fusarios no compiten bien con las especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (Lacey, 1989). En los dos tratamientos realizados, ninguna cepa de *Fusarium* se observó en semillas que mostraron crecimiento de *Aspergillus* sp, lo que corrobora su vulnerabilidad frente al antagonismo (Seifert, 2001).

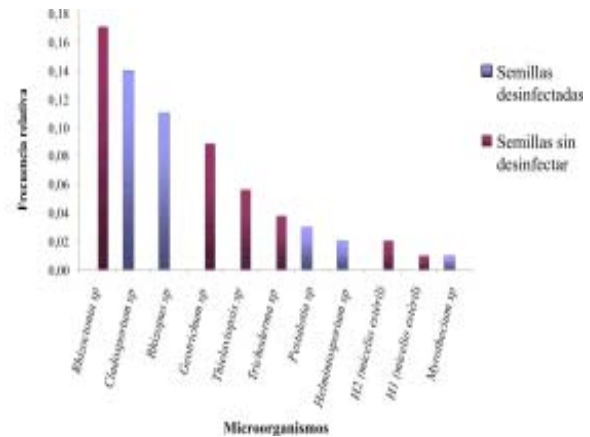
Penicillium sp mostró una frecuencia del 17% para las semillas desinfectadas y del 7% para el tratamiento complementario, al igual que *Aspergillus* sp, es un género que no se afecta por la incidencia de luz, esporulando fácilmente en oscuridad (Lacey, 1989). *Curvularia* sp, parásito facultativo de vegetales, se encuentra principalmente en el trópico y el subtropical (Anaissie et al., 1989) y registró una frecuencia mayor en las semillas desinfectadas (11%, contra el 6% del otro tratamiento).

Frecuencias relativas de los microorganismos presentes en un solo tratamiento

La frecuencia relativa de los 11 géneros de microhongos presentes en uno de los dos tratamientos de semillas (Figura 5), fue menor a las

exhibidas por los hongos presentes en ambos grupos de semillas. *Rhizoctonia* sp y *Cladosporium* sp, presentaron los mayores porcentajes con 17% y 14% respectivamente. En contraste, *Myrothecium* sp, causante de necrosis y clorosis (Bunster y Torres, 2003) y el hongo no identificado H₁ (micelio estéril), fueron observados con una frecuencia, del 1%.

Figura 5. Frecuencias relativas de los géneros observados en uno de los dos tratamientos



Por su parte *Rhizopus* sp, *Geotrichum* sp, *Thielaviopsis* sp y *Trichoderma* sp, presentaron frecuencias respectivas de 11%, 9%, 6% y 4%. De acuerdo con Garcés et al. (2003) *Rhizoctonia* sp es un microorganismo patógeno generalista el cual, en compañía con otros hongos de naturaleza semejante, parásita estructuras vegetales diversas, provoca necrosis y marchitamiento en plantas recién emergidas (Barnett y Hunter, 1992). *Geotrichum* sp, microorganismo propio de los suelos es un hongo patógeno facultativo, encontrado en pulpa de fruta y genera inconvenientes para la fermentación industrial de yogurt (Barnett y Hunter, 1992). *Trichoderma* sp, es un hongo Deuteromicete, caracterizado por presentar un estado sexual indeterminado (Rodríguez y Arcia, 1993). De este microorganismo existen más de 30 especies, todas con efectos benéficos para la agricultura, debido a la notable capacidad antagónica y degradante de agro tóxicos (Páez et al., 2006) y a su competencia para controlar satisfactoriamente numerosas especies de hongos fitopatógenos.

Prueba Chi-cuadrado entre tratamientos

En ambos tratamientos (semillas desinfectadas y semillas sin desinfectar) se determinó una distribución no aleatoria señalando diferencias significativas en la proporción de hongos encontrados en ambos tratamientos. Para el caso de los hongos latentes en el interior de las semillas, los tratamientos en semillas desinfectadas y sin desinfectar indicaron que su distribución no es aleatoria. Al comparar la distribución de los hongos hallados en ambos tratamientos, el estadístico de prueba ($EP = \chi^2_{(0.05, 2)} = 125.9 > 5.99$), indica que sus distribuciones no son explicables por la aleatoriedad.

Prueba Chi-cuadrado para los microorganismos hallados en ambos tratamientos

Al aplicar la prueba en cada uno de los cinco géneros hallados en los dos tratamientos (*Aspergillus* sp, *Colletotrichum* sp, *Fusarium* sp, *Penicillium* sp, *Curvularia* sp), se encontró que los patógenos no están presentes en las mismas proporciones en los dos grupos de semillas.

Con relación a la germinación la mayor cantidad de eventos se produjo entre los días 59 y 66, pero el proceso se detiene a partir del día 70. Para el grupo

CONCLUSIONES

Se encontraron 14 géneros de microorganismos fúngicos asociados a la semilla de Arazá, y dos más sin identificar, debido a sus micelios estériles. Los microorganismos se encontraron directamente en el endospermo de la semilla y fueron extraídos del tratamiento de semillas desinfectadas.

Cinco de los géneros reportados en las semillas desinfectadas son de carácter oportunista (*Colletotrichum* sp, *Fusarium* sp, *Curvularia* sp, *Pestalotia* sp y *Cladosporium* sp) y cinco son de carácter patógeno y de naturaleza oportunista (*Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Rhizopus* sp, *Myrothecium* sp y *Helminthosporium* sp).

de semillas desinfectado, el máximo de germinación se alcanza en el día 66 Según Pinedo (1984) el bajo porcentaje de germinación registrado, puede explicarse debido a rapidez con que la semilla pierde su viabilidad después de las primeras 24 horas de extraídas del fruto, reduciendo su poder germinativo hasta un 70% después de un período de cinco días. Ferreira y Gentil (1999), consideran que el rango óptimo de temperatura para emergencia de la raíz primaria varía entre 15° y 30°; y para emergencia del epicótilo entre 20°, 30° respectivamente. Temperaturas superiores a 35°C parecen ser letales para las semillas de Arazá (Anjos, 1998). En el caso del Araza la principal dificultad para la germinación de las semillas se debe a la resistencia mecánica del tegumento (Pinedo, 1984). Sin embargo, tal explicación parece no ser del todo satisfactoria frente a las dificultades germinativas experimentadas aún con la remoción del tegumento (Ferreira y Gentil, 1999).

En el caso del contenido de humedad de la semilla, aunque el porcentaje reportado fue bajo, según Bello (1989), las semillas de los frutos maduros de *E. stipitata*, aptas para germinación, presentan contenidos de humedad del 50%. Anjos (1998) y Ferreira y Gentil (1999), reportan humedades en semilla de Arazá que oscilan entre el 48.4% y 73.1%.

Se detectaron microorganismos fúngicos asociados a la testa de la semilla, los cuales fueron extraídos del tratamiento de semillas sin desinfectar.

De los 9 géneros identificados, hallados en el tratamiento de semillas sin desinfectar, *Colletotrichum* sp, *Fusarium* sp, *Curvularia* sp, *Thielaviopsis* sp, *Rhizoctonia* sp y *Geotrichum* sp son reconocidos fitopatógenos; *Aspergillus* sp y *Penicillium* sp son de carácter oportunista y *Trichoderma* sp es antagonista neutralizador de otros hongos. Se registraron también dos hongos más con el micelio estéril.

Se confirmó que la distribución de los microorganismos en los tratamientos no era aleatoria y por tanto, existen diferencias significativas entre los tratamientos y entre las frecuencias de aparición de los microhongos.

Se confirmó la sensibilidad de la semilla frente a variaciones de la humedad, encontrándose una correlación directamente proporcional con la tasa germinativa.

REFERENCIAS

- Ahmad JS, Baker R. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 1987; 77 (2): 182-189.
- Anaissie EJ, Bodey GP, Rinaldi MG. Emerging fungal pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1989; 8 (4): 323-330.
- Andrade JS, Ribeiro F. Adequação tecnológica de frutos da Amazônia: licor de araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh). *Acta Amazônica*, 1997; 27(4): 273-278.
- Anjos AMG. 1998. Morfologia e fisiologia da germinação de sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia* McVaugh - Myrtaceae), uma frutífera nativa da Amazônia Ocidental. Manaus, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade do Amazonas. 78p.
- Araujo EA, Ribeiro CC. 1996. Elaboração de iorgute batido com polpa de frutas amazônicas. Parte II: acerola (*Malpighia punicifolia*), bacuri (*Platonia insignis*).
- Araçá-boi (*Eugenia stipitata*). Congresso Brasileiro de Ciencia e Tecnologia de Alimentos. Resúmenes p14.
- Ávila C. 2004. Manual de laboratorio de fitopatología. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias. 134p.
- Backhouse D. 2001. Biogeography of *Fusarium*. *Fusarium*. Summerell B. A. (eds.) APS Press. St. Paul, Minnesota. 122-137p.
- Barnett HL, Hunter BB. 1992. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3a ed. United States, Burgess Publishing Company. 241p.
- Barrera JA, Hernández MS, Páez D. 2001. Tecnologías para el aprovechamiento integral de frutas nativas en la región amazónica colombiana. Programa Nacional de Transferencia de tecnología Agropecuaria, PRONATTA. Florencia (Caquetá). Instituto Amazónico de investigaciones científicas, SINCHI. Universidad de la Amazonía. 90p.
- Barron GL. 1968. The genera of hyphomycetes from soil. Baltimore: William and Wilkins.
- Bunster L, Torres M.. *Bol Micológico*. Universidad de Aconcagua, Facultad de Agronomía. Chile. 2003; 18: 39-45.
- Bello S. 1989. Informe de las expediciones de colección de germoplasma de arazá (*Eugenia stipitata*), guaraná (*Paullinia cupana*) e piña (*Ananas comosus*) en el ámbito de los Departamentos de Loreto y Ucayali durante 1989. Lima, INIA. Informe Técnico, n. 14. 22p
- Calzada B. Algunos frutales nativos de la selva amazónica de interés para la industria. Lima, IICA. Publicaciones Misceláneas 1985; 602:3.
- Carrillo L. Micotoxinas de *Fusarium* spp en frutos deteriorados de *Cucurbita ficifolia*. *Revista Argentina de Microbiología*. 1990; 22: 212-215.
- Clement CR. 1990. Araza en: Nagy, S.; Shaw, P. E.; Wardowski (Ed.). *Fruits of tropical and subtropical origin: composition, properties and uses*. Lake Alfred, Florida, FSS. 260-265.
- Cohen S, Lewis A, Papavizas G, Bean G. Cytological investigations of chlamydozozoa of *Trichoderma* spp. *Abstracts. Phytopathology* 1983; 73(6): 965.

- Cuero RG. 1979. Micología, guía de laboratorio y campo. Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. 140p.
- Eguiazú GM. Comportamiento de almacenaje del girasol III. Grasas y Aceites 1984; 35: 325-329.
- Ellis MB. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. England, Cambrian News, Aberystwyth, Dyfed. U. K. 608p.
- Escobar AC, Zuluaga PJ. 1996. El cultivo de arazá *Eugenia stipitata*. Primera edición. Corpoica - Fondo amazónico. Florencia (Caquetá). Cartilla divulgativa. 10 p.
- Falcão M, Flores W, Ferreira S. Phenological and ecological aspects of araza in central Amazonia. I. Juvenile plants. Acta Amazonica, Manaus. 1988; 18 (3): 27-38.
- Ferreira S. Biometría de frutos de arazá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh). Acta Amazonica 1992; 22(3): 295-302.
- Ferreira S, Gentil DF. Viabilidade e superação da dormência em sementes de arazá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia*). Acta Amazonica. 1999; 29(1): 21-32.
- Filgueiras HA, Alves RE, Moura CF. 2002. Quality of fruits native to Latin América for processing: Arazá *Eugenia stipitata* en: Simposio Internacional de Frutas Tropicales y Subtropicales,. International Society for Horticultural Science. Cairno, Australia, acta Hort. 2002; 575: 270-278.
- Flores PS. 1997. Cultivo de frutales nativos amazónicos: manual para el extensionista. Lima, Perú: TCA-SPT. 307p.
- Garcés E, Correa M. 2003. Morfología y clasificación de los hongos. 1ª ed. Bogotá Colombia, Universidad Nacional de Colombia, 104p.
- Giacometti D, Lleras E. 1992. Mirtáceas subtropicales. Cultivos marginados: otra perspectiva. FAO. Roma, Italia. 227-235
- Giacometti D, Lleras E. 1999. Aspectos generales en la fenología y germinación de Arazá. Documento divulgativo de la FAO. CENARGEN/EMBRAPA, Brasília, D.F., Brasil. 10p.
- Ista. 1999. International rules for seed testing. Sci & technonal. Supplement. ISTA. Zurich, Switzerland. 27: 199p.
- Kozakiewicz Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products. CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey.
- Lacey J. 1989. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. Journal of Applied Bacteriology, Symposium Supplement 11S-25S.
- Magan N, Lacey J. Ecological determinants of mould growth in stored grain. International Journal of Food Microbiology 1988; 7: 245-256.
- Mcvaugh R.. Tropical American Myrtaceae. Fieldiana Botany. 1956; 29(3): 145-228.
- Nicholson P. 2001. Molecular assays as aids in the detection, diagnosis and quantification of *Fusarium* species in plants. Fusarium. Summerell eds. APS Press. St. Paul, Minnesota. 176-192.
- Osorio V, Ariza A, Morales ME. 2001. Arazá, *Eugenia stipitata* Mc Vaught. Corpoica Macagual. Caquetá – Putumayo, Colombia. Págs. 43-51 en: CORPOICA & COLCIENCIAS –BID 2001. Especies promisorias de la amazonía. Caquetá – Putumayo 313 p.
- Páez O, Bernaza G, Acosta M. 2006. Uso agrícola del *Trichoderma*. Instituto de Sanidad vegetal. La Habana. Cuba. 10p.
- Picón BC. 1989. El cultivo de araza. Folleto ilustrativo. Iquitos, Perú. INIA. 8 p.

- Pinedo PM. 1984. Investigación en frutales nativos en la Estación Experimental San Roque. En: Taller de Trabajo sobre un Programa de Investigación en Frutales Nativos de la Selva Baja del Perú. Iquitos, Perú. Ed. Por A. Pinchinaty L. Salinas. Lima, Perú. 36-42 p.
- Pontón J, Moragues M, Gené J. 2002. Revista Iberoamericana de Micología. 1ª ed. Imprenta Berekintza. Bilbao, País Vasco, España.
- Rodríguez I, Arcia A. 1993. Caracterización fisiológica (temperatura, pH y luz) de 12 aislamientos de *Trichoderma* spp., In vitro. (Resumen). Fitopatología Venezolana. 6(2):53.
- Sañudo BS, Arteaga MO, Vallejo WC. 2001. Fundamentos de Micología Agrícola. San Juan de Pasto, Editorial Universitaria. Universidad de Nariño. 201p.
- Seifert K. 2001. *Fusarium* and anamorph generic concepts. *Fusarium*. Summerell, B. A. (eds.). APS Press. St. Paul, Minnesota. 15:28.
- Swift MJ. 1997. Biological management of soil fertility as a component of sustainable agriculture: Perspectives and prospects with particular reference to tropical regions. Brussaard, L. & Ferrera, R. (Eds.). Soil: Ecology in sustainable agricultural systems. Lewis Publishers, New York, USA. 169 p.
- Swift JF, Prentice WE. 1983. Native fruit species of the Ecuadorian Amazon: production, techniques and processing requirements en: Lamberts, M.; Schaffer, B.; Jackson, L. K.; Knight Jr., R. J. (ed.). New fruits with potential for the American tropics. Homestead, Florida, U. S. A., American Society for Horticultural Science Tropical Region, v. 27, part A. 95:100.
- Torres C. 2004. Manual de Laboratorio de Fitopatología. Cali-Colombia. Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. 14p.
- Velázquez J, Pineda J. Evaluación en campo de 5 aislamientos de *Trichoderma harzianum*, para el control de *Sclerotium rolfsii*. (Resumen). Revista Forestal Venezolana 1995a; 1(1):32.
- Velázquez J, Pineda J. Evaluación en campo de dosis y de dos métodos de aplicación de *Trichoderma harzianum*, para el control de *Sclerotium rolfsii*. (Resumen). Revista Forestal Venezolana 1995b; 1(1):60.
- Vera D, Pérez H, Valencia H. Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizósfera de arazá (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae). Bogotá, Colombia. Acta Biológica Colombiana, 2002; (7)1: 33.
- Villachica H, Carvalho J, Müller C. 1996. Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonía. Lima, Perú, Tratado de Cooperación Amazónica. Secretaria Pro-tempore. 367p.
- Villegas B, Castaño Z. 2000. Identificación de aislamientos promisorios de *Trichoderma* spp. Para el manejo de la pudrición de la corona y raíz del manzano (*Malus domestica* Borkh) en Caldas en: Fitotecnia. Manizales. Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Fitotecnia.
- Windham M, Baker RA. Mechanism for increased plant grow induced by *Trichoderma* spp. Phytopathology 1986; 76:518-521.