

DIFERENCIACIÓN MORFOLÓGICA, CULTURAL Y BIOLÓGICA DE *GUIGNARDIA CITRICARPA* Y *GUIGNARDIA MANGIFERAE* EN FRUTOS CÍTRICOS DE CUBA

Elsa I. Hidalgo Góngora y Luis Pérez Vicente

Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Vegetal. Ayuntamiento 231 e/ San Pedro y Lombillo, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, lperezvicente@live.com

RESUMEN

Se obtuvieron treinta y cinco aislamientos monospóricos de *Guignardia citricarpa* (Gc; *Phyllosticta citricarpa*) de síntomas de mancha negra (patogénicos) y cuatro de *G. mangiferae* (Gm; *Phyllosticta capitalensis*), asociados a puntos negros (no patogénicos) de la corteza de frutos cítricos. Se estudió el crecimiento y morfología de las colonias en PDA, agar avena (AA) y agar jugo V8 (V8), así como la formación, morfología y dimensiones de los teliomorfos y anamorfos de ambos hongos. Se realizó un análisis de componentes principales y de agrupamiento para determinar las características que más contribuyeron a la diferenciación de estas especies. Se concluyó que las dos especies concurren en frutos cítricos en Cuba y que las características que más aportan a su diferenciación fueron el crecimiento en PDA, la formación de peritecios en medio de cultivo, el tamaño mínimo del picnostroma y la formación de pigmento que se difunde al medio en V8 y AA. Gc es de crecimiento lento en PDA, forma picnidios abundantemente en el medio, el conidioma frecuentemente es menor de 145 µm, no forma peritecios en PDA (heterotálico) y produce un pigmento amarillo que se difunde al medio en agar V8. Gm es de crecimiento rápido en PDA, tiene un conidioma frecuentemente mayor de 145 µm, forma peritecios en cultivo monospórico (homotálico) y no difunde pigmento amarillo al medio V8. Estas características permiten la diferenciación de ambas especies.

Palabras claves: *Citrus* spp., *Guignardia*, *Phyllosticta*, morfología fúngica, diagnóstico

ABSTRACT

Thirty five single spore isolates of *Guignardia citricarpa* (Gm, *Phyllosticta citricarpa*) from black spot symptoms and four from *G. mangiferae* (Gm; *Phyllosticta capitalensis*) associated to black dots (non pathogenic) were obtained in the rind of citrus fruits. The growth and morphology of the colonies, teleomorph and anamorph structures morphology and dimensions in both fungi were studied in PDA, oatmeal agar (AA) and V8 juice agar (V8). A principal components and cluster statistical analysis were performed to determine the characteristics that contribute the most to species differentiation. It were concluded that both species are concurrent in citrus fruits in Cuba and that the most important characteristics to differentiate them were growth in PDA, the perithecia development in vitro, the minimal size of the conidiostrome and the production and release of a yellow pigment in V8: Gc is slow growing in PDA, develop picnidia abundantly in media, the conidiostrome is frequently smaller than 145 µm, do not develop perithecia in PDA (heterotallic) and release a yellow pigment in V8. Gm es fast growing in PDA, frequently has a conidiostrome higher than 145 µm, develops perithecia in single spore cultures (homotallic) and do not produce and release a yellow pigment in V8. Those characteristic allow the differentiation of both species in citrus plants.

Key words: *Citrus* spp., *Guignardia*, *Phyllosticta*, fungic morphology, diagnostic

INTRODUCCIÓN

La mancha negra de los cítricos (MNC), causada por *Guignardia citricarpa* Kiely (anamorfo *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Van der Aa), es una enfermedad del follaje y de los frutos de los géneros *Fourtunella* sp., *Poncirus* y sus híbridos, naranjas (*Citrus sinensis*), mandarinas (*C. reticulata*), limas (*C. aurantifolia*), limones (*C. limon*), toronjas (*C. paradisi*) y otras *Citrus* spp. [Snowdon, 1990; Kotzé, 2000; EPPO, 2003]. Dos tipos

de esporas pueden diseminar el hongo: las asexuales (conidios), que se desarrollan en los frutos y hojas en la planta, y las sexuales (ascosporas), que lo hacen en las hojas en descomposición.

La enfermedad constituye un problema para la producción en América del Sur, África, Australia y más recientemente en Cuba [Vázquez, 2007] y en Estados Unidos [NAPPO, 2010]. Los frutos afectados con MNC

tienen un mal aspecto y son inservibles para el mercado de frutos frescos. La enfermedad causa además la reducción del tamaño y su caída prematura.

Los síntomas de MNC son de apariencia variable. El síntoma típico es la llamada *mancha dura*, constituida por lesiones superficiales de color negro con un centro gris y un anillo pardo oscuro de 3-10 mm de diámetro, que aparecen cuando los frutos comienzan a tornarse amarillentos. Frecuentemente, pero no siempre, se desarrollan los picnidios en su centro (*Phyllosticta citricarpa*). Cuando los síntomas de mancha dura coalescen se forma la mancha virulenta que puede tener también picnidios en su interior. Este no es el caso cuando aparecen las lesiones llamadas *pecas* o *falsa melanosis*, que consisten en manchas pequeñas (1-3 mm de diámetro), ligeramente deprimidas que pueden ser pardo claras, grises, pardas o no coloreadas en absoluto, y generalmente carecen de la presencia de picnidios. Estas pueden ser confundidas con los causados por otros patógenos de los cítricos [Kotzé, 2000].

La especie *Guignardia mangiferae* A. J. Roy (anamorfo *Phyllosticta capitalensis* P. Hennings) es un endofítico asociado a pequeñas lesiones puntuales no fácilmente distinguibles en frutos cítricos, que frecuentemente se confunde con *G. citricarpa* debido a su apariencia similar en las primeras fases de su desarrollo [McOnie, 1964; Baayen *et al.*, 2002]. Esta especie está notificada como un organismo cosmopolita endofítico frecuentemente aislado de un amplio rango de plantas, incluidas *Citrus* sp., miembros de las familias Anacardiaceae, Theaceae [Baayen *et al.*, 2002] y Ericaceae [Okane *et al.*, 2001]. *G. mangiferae* es sinónimo de *G. psidii* de guayabas y de *G. endophyllicola*, así como *P. capitalensis* es sinónimo de *P. anacardiacearum* y de *P. theacearum* [Baayen *et al.*, 2002; EPPO, 2003].

El diagnóstico de diferentes especies de hongos puede llevarse a cabo mediante criterios morfológicos (morfolo-gía y tamaño de cuerpos fructíferos, esporas y crecimiento de las colonias en diferentes medios de cultivo), biológicos (homo o heterotalismo) y moleculares (secuencia de los espaciadores internos transcritos del ADN ribosomal (ITS)).

Los objetivos del presente estudio fueron caracterizar la variabilidad cultural, morfológica y fisiológica de los aislados de *Guignardia* spp. que concurren en frutos cítricos en Cuba, y establecer una metodología para el diagnóstico morfológico y biológico, y la diferenciación

de las especies de *Guignardia* presentes en los frutos cítricos en Cuba.

Los objetivos del presente estudio fueron caracterizar la variabilidad cultural, morfológica y fisiológica de los aislados de *Guignardia* spp. que concurren en frutos cítricos en Cuba con vistas a permitir su identificación en muestras de cítricos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron y conservaron en el Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal 39 aislamientos fúngicos, de los cuales 35 se aislaron de frutos de *Citrus sinensis* y *Citrus paradisi* de diferentes localidades de Cuba, a partir del síntoma típico conocido como *mancha negra* o *dura* (considerados patogénicos) (Fig. 1), y cuatro de frutos de *C. sinensis* con pequeñas lesiones como puntos negros brillantes visibles al microscopio estereoscópico considerados no patogénicos, porque no desarrollan ninguno de los síntomas de mancha negra de los cítricos o cualquier patología que conduzca al rechazo de frutos comercializables por manchas o pudriciones (Fig. 2). Las muestras con síntomas se lavaron con abundante agua y detergente, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 3 min, se lavaron sucesivamente tres veces con abundante agua estéril y finalmente se secaron con papel de filtro. Se tomaron asépticamente fragmentos de aproximadamente 1 mm que incluyeran la zona límite entre el tejido enfermo y el sano, y se sembraron en agar papa dextrosa (PDA) a razón de cuatro fragmentos por placas. Las placas se incubaron a 28°C en oscuridad continua.

A partir de los tres días se realizaron observaciones para detectar el desarrollo de colonias, que por su aspecto pudieran corresponderse con *Phyllosticta* sp. (Tabla 1). Después de los aislamientos puros se obtuvieron cultivos monoconidiales o monoascospóricos y se transfirieron a cuñas de PDA para realizar el resto de los experimentos.

Los 39 aislamientos obtenidos se sembraron en PDA y se incubaron a 28°C en oscuridad continua. Las colonias resultantes se observaron diariamente para detectar la formación y posterior maduración de los picnidios y peritecios. Se tomaron con agujas y midieron 50 cuerpos de cada aislado. Posteriormente se cortaron en secciones finas con una aguja y se tiñeron con azul de algodón. Estos cortes se montaron en portaobjetos con lactofenol y se describieron las características morfológicas observadas al microscopio óptico, según los

critérios taxonómicos descritos por Sutton (1980). Se midieron de cada aislamiento 100 conidióforos y conidios (largo por ancho) cuando se formaron conidiomas (picnidios) y 100 ascas, y ascosporas cuando las estruc-

turas formadas fueron peritecios. Los valores obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza y las medias comparadas mediante la dócima de Tukey con un nivel de significación del 5%.



Figura 1. Frutos con mancha negra. Síntoma conocido como *mancha dura*.



Figura 2. Frutos con puntos negros de donde se obtuvieron los aislamientos no patogénicos (20X).

Catorce aislados representativos de la totalidad de la colección se sembraron en PDA y se incubaron durante 10 días. De las colonias obtenidas se tomaron discos de

0,5 mm, los cuales se transfirieron a placas con PDA, agar avena (AA) y agar jugo V8 (V8), y se incubaron a 28°C a oscuridad continua (un disco por placa y cinco

placas por tratamiento). A los siete días se evaluaron las características culturales de las colonias en cada medio, que fueron color, forma de los bordes, el tipo de micelio, la producción de pigmentos y su aspecto general, según los criterios de Gams *et al.* (1988). Se determinó el diámetro de las colonias en los tres medios a los siete, catorce y veintiún días, y el crecimiento en PDA a los siete días para la totalidad de los aislados de la colección. Los valores obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza simple, y las medias comparadas mediante un test de significación de Tukey al 5% de probabilidad de error.

Se realizó un análisis de componentes principales para determinar las características que más aportaron a la variabilidad del conjunto de los aislamientos obtenidos, donde se incluyeron los parámetros color y bordes de las colonias, producción de pigmentos solubles, el crecimiento en PDA a los siete días y el tamaño de los conidiomas. Posteriormente se efectuó un análisis de agrupamiento para determinar la existencia de grupos y el grado de similitud entre las cepas. Con las variables tamaño del conidioma, crecimiento en PDA a los siete días, bordes y color de las colonias y liberación de pigmento, se realizó un análisis de componentes principales para determinar qué variable aportaba más a la variabilidad de los aislados. Se analizaron los parámetros color de las colonias (negro claro, 1; negro intenso, 2; verde olivo, 3); bordes de la colonia (regulares, 1; +/- regulares, 2; irregulares, 3); tamaño del conidioma; crecimiento en PDA a los siete días. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa MINITAB para Windows versión 4.2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los aislados produjeron conidiomas (picnidios). En los provenientes de síntomas típicos de MN comenzaron a madurar a partir de los siete a ocho días (*Fig. 3*). En las *Tablas 1 y 2* se muestran las dimensiones de los picnidios, los conidióforos y conidios. En solo uno de los aislados no patogénicos (MMCF1) fue posible observar la maduración de escasos picnidios. En los tres restantes se formaron tardíamente y nunca maduraron.

Las dimensiones de las estructuras de los aislados patogénicos y no patogénicos estuvieron comprendidas en el rango descrito para *G. citricarpa* (*P. citricarpa*) y *G. mangiferae* (*P. capitalense*), según Sutton y Watterston (1966) y Van der Aa (1973), respectivamente, y no se detectaron diferencias entre ellas para la

mayoría de las estructuras estudiadas, con excepción del tamaño de los conidiomas de los aislados no patogénicos, que fue siempre mayor de 145 μm , lo que constituye una diferencia morfológica entre ambos grupos de aislamientos.

Los conidióforos siempre fueron menores de 12 μm . Los conidióforos de la cepa EHA3 (5,88 μm) fueron significativamente menores que los del resto de los aislamientos. El ancho de los conidios fue menor en la mayoría de las cepas al descrito en la literatura para ambas especies, con excepción de las cepas EHB1, EHB7, PT y MMF1.

Las estructuras de reproducción asexual mostraron características morfológicas similares en los aislados patogénicos y no patogénicos, como picnidios globosos, inmersos, de color café oscuro a negro, paredes de hasta cuatro células de grosor, ostiolo más oscuro, levemente papilado y circular (*Figs. 3 y 4*); las *picnidiosporas* fueron de ovoides a piriformes, hialinas, aseptadas, multigutuladas, con ápice levemente plano y un apéndice incoloro, que termina en una punta aguda y fina, y base truncada; se formaron como blastosporas desde conidioforos hialinos, unicelulares y cilíndricos (*Fig. 5*).

Los aislamientos monospóricos no patogénicos siempre produjeron peritecios en medio de cultivo, los cuales maduraron con facilidad a partir de los 10 días, lo que nunca ocurrió en los aislados patogénicos. Los peritecios son de piriformes a globosos, de color café oscuro a negro, con ostiolo papilado y circular; ascas de cilíndricas a clavadas, con ocho esporas; las ascosporas son aseptadas, hialinas, multigutuladas, cilíndricas pero hinchadas en el centro, con extremos obtusos, cada uno con un ápice incoloro.

Las dimensiones de las estructuras sexuales de los cuatro aislamientos no patogénicos (*Tabla 3*) estuvieron en el rango de los valores descritos en la literatura para *G. citricarpa* y *G. mangiferae*, lo que no permite su diferenciación. Se detectaron diferencias significativas en las dimensiones de los peritecios de los aislamientos, lo que indica una gran variabilidad entre los aislamientos de esta especie en este sentido; sin embargo, no se detectaron diferencias significativas con relación al tamaño de las ascas y ascosporas de las cuatro cepas.

En la *Tabla 4* aparecen las dimensiones de las estructuras de reproducción sexual de los aislados no patogénicos obtenidas en PDA en comparación con las descritas para *G. citricarpa* y *G. mangiferae*.

Tabla 1. Tamaño de las fructificaciones asexuales de los diferentes aislamientos de *Guignardia* spp.

No.	Cultivo	Hospedante	Picnidios		Conidóforo		Conidio largo		Conidio ancho	
			Máx.-Mín. (μm)	DS (%)	Máx.-Mín. (μm)	DS (%)	Máx.-Mín. (μm)	DS (%)	Máx.-Mín. (μm)	DS (%)
1	EHA1	<i>C. sinensis</i>	120-187	16,28	4,0-10	1,57	8,1-11,1	0,91	4,0-6,1	0,87
2	EHA3	<i>C. sinensis</i>	90-190	20,79	4,0-9,0	1,47	7,5-12,21	0,84	4,0-7,2	0,92
3	EHA4	<i>C. sinensis</i>	112-193	20,77	4,0-10,0	1,39	7,0-11,0	0,89	4,1-6,1	0,78
4	EHB1	<i>C. sinensis</i>	100-190	23,44	3,0-9,0	1,73	7,0-11,8	0,92	4,1-6,1	0,88
5	EHB2	<i>C. sinensis</i>	100-190	22,67	4,0-9,0	1,48	8,0-11,8	0,84	4,1-6,1	0,85
6	EHB3	<i>C. sinensis</i>	105-195	19,59	3,5-9,0	1,49	7,1-11,5	0,82	4,1-6,1	0,84
7	EHB5	<i>C. sinensis</i>	100-195	23,21	4,0-9,0	1,54	6,5-11,5	0,92	4,1-7,1	0,84
8	EHB7	<i>C. sinensis</i>	105-190	17,78	4,0-10,0	1,71	7,0-12,0	0,85	4,1-6,1	0,90
9	EHB9	<i>C. sinensis</i>	100-185	19,99	4,0-11,0	1,62	8,0-10,1	0,76	4,0-6,6	0,81
10	EHC1	<i>C. sinensis</i>	105-195	23,38	4,0-9,0	1,42	8,0-12,0	0,96	4,1-6,6	0,86
11	EHC2	<i>C. sinensis</i>	100-172	19,06	4,0-9,5	1,42	8,0-10,5	0,64	4,1-6,1	0,82
12	EHC3	<i>C. sinensis</i>	100-195	24,6	4,0-10,0	1,31	8,0-11,2	0,72	4,1-6,1	0,82
13	EHC4	<i>C. sinensis</i>	111-195	17,68	5,0-10,0	1,01	8,0-12,3	1,09	4,1-6,5	0,84
14	EHC6	<i>C. sinensis</i>	111-195	17,35	4,0-9,0	1,67	8,0-12,5	1,22	4,1-8,5	0,96
15	EHC8	<i>C. sinensis</i>	106-175	16,09	4,0-10,0	1,58	8,14-11,15	0,82	4,0-6,5	0,84
16	EHC9	<i>C. sinensis</i>	100-195	20,03	4,0-9,5	1,39	6,5-12,0	1,87	4,1-6,6	0,83
17	EHTCM	<i>C. paradisi</i>	100-195	19,02	4,0-10,0	1,53	8,0-12,5	0,86	4,0-8,5	0,87
18	EHNLP	<i>C. sinensis</i>	100-195	19,94	4,0-9,1	1,02	8,0-12,5	1,00	4,1-6,1	0,8
19	EHLM	<i>C. sinensis</i>	106-181	18,81	4,0-9,5	1,45	7,5-12,5	0,99	4,0-6,1	0,85
20	EHP1	<i>C. sinensis</i>	100-195	20,75	4,0-9,5	1,44	6,5-12,21	1,38	4,1-6,11	0,82
21	EHP2	<i>C. sinensis</i>	100-195	19,63	4,0-12,0	1,17	8,14-12,3	0,83	4,1-6,1	0,87
22	EHP3	<i>C. sinensis</i>	106-181	16,74	4,0-9,5	1,34	6,2-12,3	0,95	4,1-6,6	0,81
23	EHP4	<i>C. sinensis</i>	90-195	20,76	4,0-9,0	1,09	8,0-12,0	0,83	4,1-6,1	0,84
24	EHP5	<i>C. sinensis</i>	116-195	16,05	4,0-10,0	1,49	6,2-12,3	1,06	4,1-7,1	0,86
25	EHP6	<i>C. sinensis</i>	107-186	14,89	4,0-9,5	1,34	6,2-12,3	0,99	4,1-7,0	0,83
26	EHP7	<i>C. sinensis</i>	100-187	18,5	4,0-9,0	1,47	7,5-12,5	1	4,1-7,0	0,88
27	EHP8	<i>C. sinensis</i>	85-193	21,19	4,0-11,0	1,68	8,0-12,3	1,06	4,1-7,0	0,88
28	EHP11H	<i>C. sinensis</i>	89-185	18,40	4,0-11,0	1,45	6,2-11,5	0,95	4,1-7,3	0,86
29	EHP11F	<i>C. sinensis</i>	116-185	16,03	4,0-11,0	1,57	8,0-12,3	0,79	3,9-7,0	0,89
30	EHCOST	<i>C. sinensis</i>	100-185	21,32	4,0-11,0	1,63	6,2-13	1,06	4,0-7,0	0,86
31	EHJ2	<i>C. sinensis</i>	111-195	15,92	4,0-11,0	1,51	6,6-12,3	1,08	4,0-7,3	0,87
32	EHJ3	<i>C. sinensis</i>	100-195	17,91	3,5-9,5	1,58	8,01-12,5	0,97	4,0-6,6	0,81
33	EHJ4	<i>C. sinensis</i>	100-195	20,15	4,0-9,5	1,63	6,9-12,3	0,91	4,0-7,3	0,77
34	EHJ6	<i>C. sinensis</i>	106-181	17,07	4,0-10,0	1,64	6,4-13	1,02	4,0-6,6	0,84
35	PT	<i>C. sinensis</i>	110-195	17,33	4,0-12,0	1,50	8,0-12,3	0,91	4,1-6,1	1,74
36	MMCF1	<i>C. sinensis</i>	145-185	19,81	4,0-10,0	1,40	7,0-12,3	0,88	4,0-7,0	0,87
37	MMCF2	<i>C. sinensis</i>	145-195	20,72						
38	MMCF3	<i>C. sinensis</i>	145-195	18,99						
39	MMCF4	<i>C. sinensis</i>	145-185	22,66						

Tabla 2. Comparación de las dimensiones de las estructuras de reproducción asexual de los aislados patogénicos y no patogénicos con las de *P. citricarpa* y *P. capitalensis*

Estructuras	Aislados patogénicos	Aislados no patogénicos	<i>P. citricarpa</i> [Sutton & Waterson, 1966]	<i>P. capitalensis</i> [Van der Aa, 1973]
Conidioma (μm)	112,5-189,9	145,0-189,0	115-190	150,0-200,0
Conidio largo (μm)	7,3-11,95	7,0-12,3	8,0-10,5	8,0-12,0
Conidio ancho (μm)	4,04-6,06	4,0-7,0	5,5-7,0	5,7-7,0

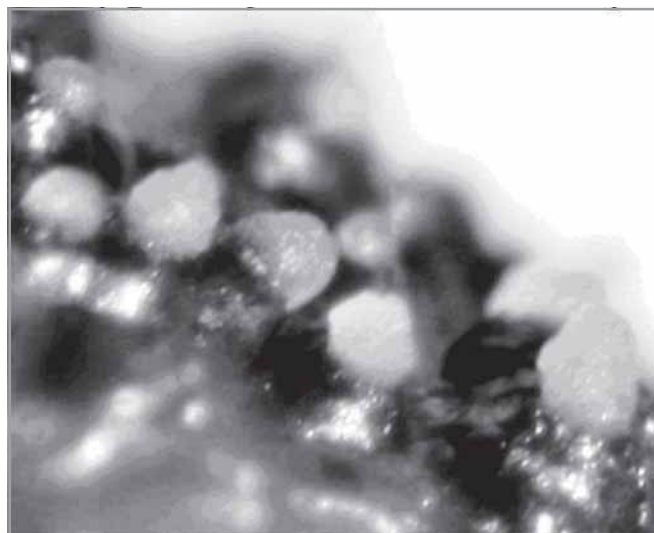


Figura 3. Picnidios con sirros de picnidiosporas de *G. citricarpa* en frutos de naranja.

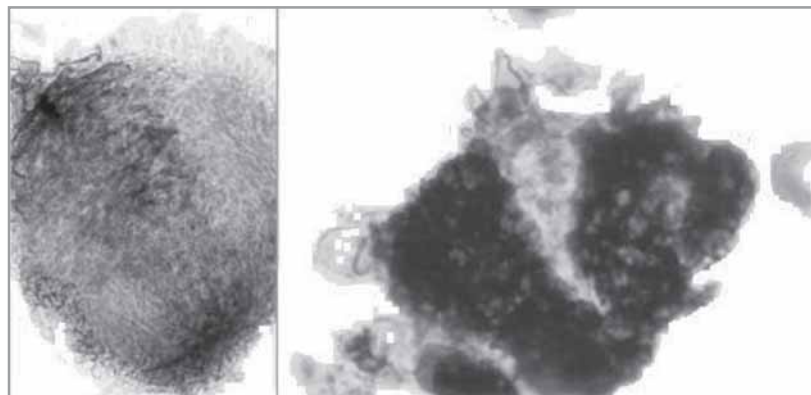


Figura 4. Células conidiógenas de *G. citricarpa*.

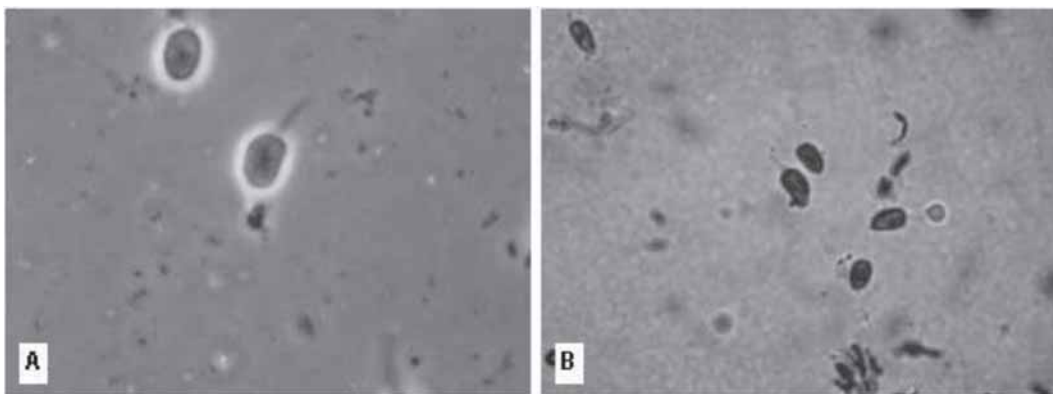


Figura 5. Picnidiosporas de *P. citricarpa*. (A, contraste de fase 1000X; B, teñidas con lactofenol más azul algodón 400X).

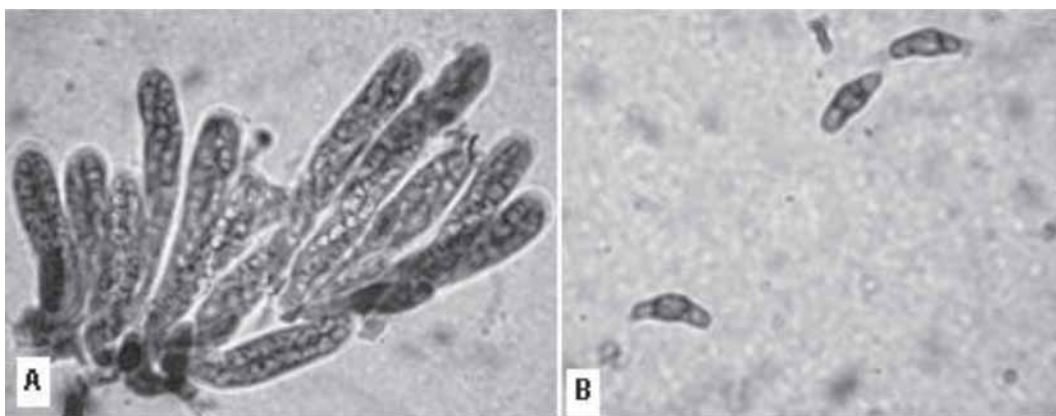


Figura 6. Ascis y ascosporas de *G. mangiferae*. (A, ascas 400X; B, ascosporas 1000X).

Tabla 3. Tamaño de las fructificaciones sexuales de los aislamientos no patogénicos de *Guignardia* sp.

Cepas	Peritecios (μm)	Ascas		Ascosporas	
		Largo (μm)	Ancho (μm)	Largo (μm)	Ancho (μm)
MMCF1	84-125 bc	44,77-69,54 a	10,14-15,28 a	12,21-15,68 a	4,07-6,10 a
MMCF2	84-132 ab	48,5-65,21a	10,14-16,68 a	12,21-15,68 a	4,07-6,10 a
MMCF3	184-125 c	48,5-65,54 a	10,14-16,68 a	12,21-15,68 a	4,07-6,10 a
MMCF4	90-132 a	45,5-65,2 a	10,14-16,14 a	12,21-15,68 a	4,07-6,10 a

Letras diferentes indican diferencias significativas según la dócima de Tukey al 5%.

Tabla 4. Comparación de las dimensiones de las estructuras de reproducción sexual de los aislados no patogénicos obtenidas en PDA con las descritas para *G. citricarpa* y *G. mangiferae*

Estructuras	Aislados no patogénicos	<i>G. citricarpa</i> [Sutton & Waterson, 1966]	<i>G. mangiferae</i> [Roy, 1967]
Peritecios (μm)	105-113	95,0-125,0	86,0-146,0
Ascas (largo) (μm)	59,20-61,25	40,0-65,0	50,0-65,0
Ascas (ancho) (μm)	12,47-12,94	12,0-15,0	12,0-13,0
Ascosporas (largo) (μm)	14,15-14,36	12,5-16,0	10,0-15,0
Ascosporas (ancho) (μm)	5,39-5,51	4,4-6,5	5,0-7,0

Las dimensiones y morfología de los estados teleomórficos y anamórficos de las cepas no patogénicas, así como sus hábitos de crecimiento en los diferentes medios de cultivo, concuerdan con lo informado por Roy (1967) y Baayen *et al.* (2002) para *G. mangiferae* A. J. Roy (anamorfo *P. capitalensis* Henn.) (Tabla 4). Esta constituye la primera evidencia de la presencia en Cuba de *G. mangiferae* en frutos cítricos. Las características culturales de los aislados en diferentes medios de cultivo fueron:

En PDA, a los siete días, el diámetro de las colonias de los aislados de *G. citricarpa* estuvieron entre 24,9 y 13,72 mm, significativamente inferior al de las cepas de *G. mangiferae*, que osciló entre 40,35 y 47,56 mm (Fig. 7). Las colonias de los aislados de *G. citricarpa* fueron de color gris durante los estados tempranos del crecimiento micelial, y se tornaron rápidamente negras debido a la abundante formación de picnidios que comenzaron a madurar a los siete u ocho días. Se observó un amplio halo traslúcido de micelio inmerso incoloro, que se

correspondió con la zona joven de la colonia. Los bordes fueron más o menos regulares. Las cepas P5, EHP8, EHC4 y EHB7 mostraron bordes algo lobulados. El carácter *borde de las colonias* no constituye un criterio confiable para diferenciar ambos grupos. Aunque en la

mayoría de las cepas los bordes son enteros, puede haber variaciones como de hecho se detectó. Raramente se formaron peritecios que siempre permanecieron estériles. En todos los casos se observó la abundante formación de la fase espermacial *Leptodothiorella* (Fig. 8).

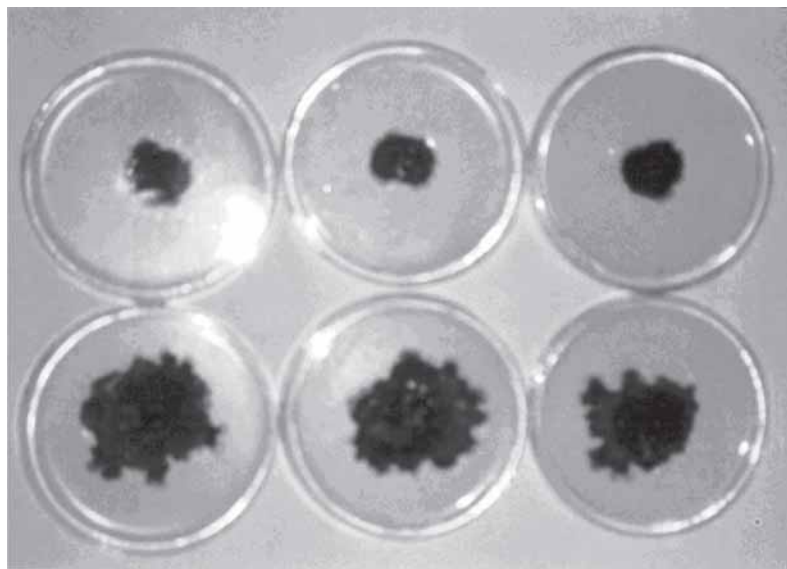


Figura 7. Colonias de *G. citricarpa* (hilera superior) y *G. mangiferae* (hilera inferior) en medio PDA a los siete días.

En PDA los aislados de *G. mangiferae* formaron colonias de color gris a gris verdoso en los primeros días; pero rápidamente evolucionaron hacia un negro intenso con un pequeño halo traslúcido y bordes muy irregulares. Produjeron abundantemente peritecios que maduraron a partir de los 10 días, y muy raramente picnidios que solo en una ocasión maduraron (aislamiento HECF1). La fase espermacial *Leptodothiorella* se observó en aisladas ocasiones.

En medio AA las colonias de los aislados de *G. citricarpa* eran inicialmente de color amarillo mostaza, y luego se

tornaron verde olivo oscuro, con bordes muy irregulares, micelio aéreo escaso restringido al centro de la colonia, con el resto del micelio inmerso y poco desarrollo de conidiomas que no maduraron hasta los 21 días. Las colonias de los aislados no patogénicos eran de color verde olivo oscuro y aclararon hacia los bordes en forma de círculos concéntricos hasta llegar a un verde grisáceo, lo que corresponde a la zona joven de la colonia. Los bordes eran lobulados con un diseño muy característico (zonado) y con halo amarillo.

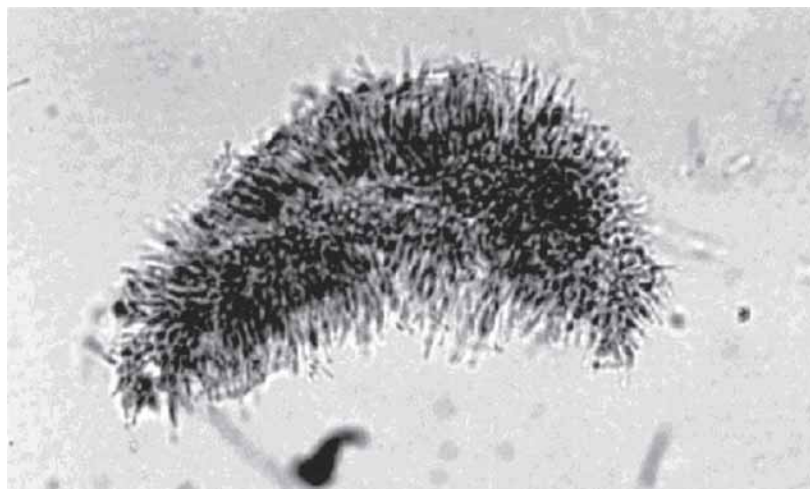


Figura 8. Fase *Leptodothiorella* desarrollada en cultivos.

En medio V8 las colonias de los aislamientos de *G. citricarpa* fueron de color más claro hacia el exterior, con formación abundante de picnidios, los bordes regulares y definidos y el micelio raso. A partir de los bordes se pudo observar la liberación de un pigmento amarillo difusible que se evidencia por la formación de

un halo de este color alrededor de la colonia, el cual fue uniformemente presente en estos aislamientos (Fig. 9). Los aislados no patogénicos en este medio formaron colonias pequeñas con abundante micelio aéreo algodonoso de color gris pajizo, con bordes irregulares y poco definidos. No se observó formación de pigmentos.

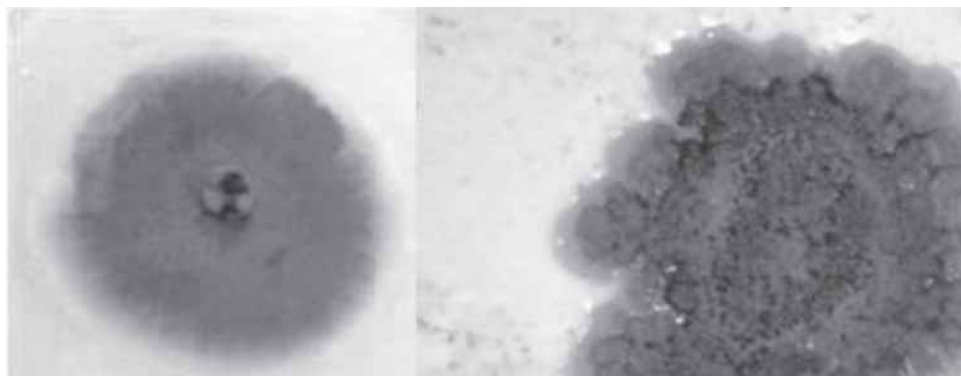


Figura 9. Colonia de *G. citricarpa* en medio V8. Notar pigmento alrededor de la colonia que se produce en medio V8 y agar avena.

En la Fig. 10 se muestra el crecimiento a los siete días de incubación en PDA de todos los aislamientos de la colección. Los aislamientos no patogénicos son de crecimiento rápido, y las colonias alcanzan a los siete días

un diámetro superior a los 40 mm, mientras que los aislamientos patogénicos no alcanzan los 30. Este comportamiento se aprecia en los tres medios de cultivo estudiados, pero es más evidente en PDA y AA.

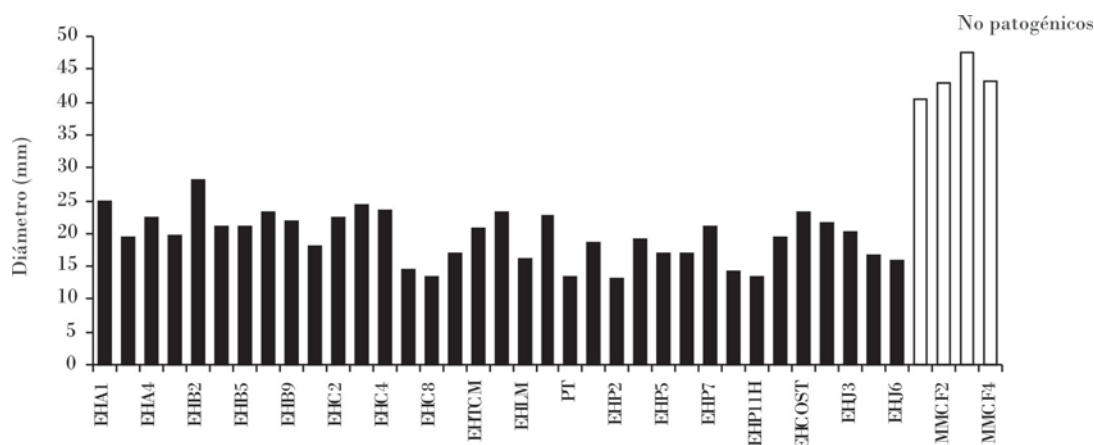


Figura 10. Diámetro alcanzado por todos los aislados obtenidos de MN y no patogénicos en PDA a los siete días.

En la Fig. 11 se muestra el crecimiento en PDA, AA y V8 a los siete días de incubación de una selección de 10 aislamientos de *G. citricarpa*, y los cuatro no patogénicos de *G. mangiferae*. En AA se observa un comportamiento del crecimiento similar

al obtenido en PDA. En V8, sin embargo, no existen diferencias apreciables de velocidad de crecimiento entre los aislamientos patogénicos y no patogénicos que permita una diferenciación segura de ambos hongos.

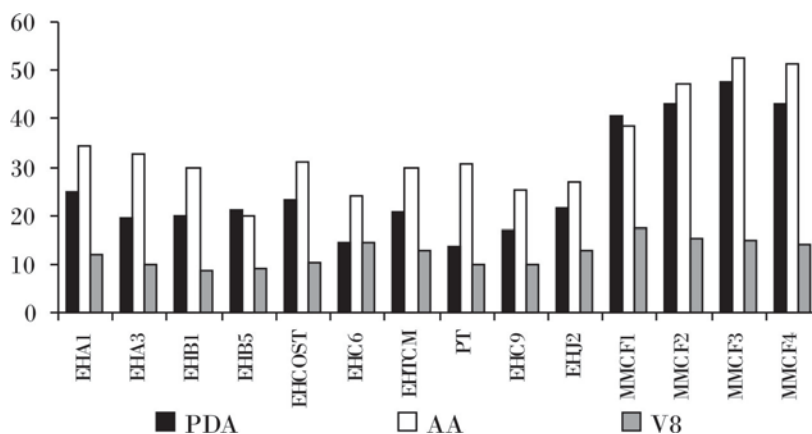


Figura 11. Crecimiento de las colonias en PDA, AA y V8 de 10 aislamientos de *G. citricarpa* y cuatro aislamientos de *G. mangiferae* a los siete días de incubación.

En la *Tabla 5* aparece el resultado del análisis de componentes principales basado en el tamaño de los conidiomas, el crecimiento en PDA a los siete días y el color de las colonias.

Tabla 5. Resultados del análisis de componentes principales

Variables	CP1	CP2
Tamaño del conidioma	-0,045	0,999
Crecimiento en PDA a los siete días	-0,996	-0,046
Bordes de las colonias	-0,064	0,010
Color de las colonias	-0,031	0,004

CP: Componente principal.

Las variables quedaron divididas en dos componentes principales que explican el 74,2 y el 25,4% de la variabilidad total, respectivamente, y juntas el 99,6%. Dentro de la primera componente principal, el crecimiento en PDA es la variable más importante, y en la segunda el tamaño del conidioma; por tanto, estas son las características que más aportan a la variabilidad de los aislados.

Se realizó un análisis de agrupamiento para determinar la existencia o no de estos grupos, y en caso positivo determinar el grado de similitud entre ambos. Fueron utilizadas las variables tamaño del conidioma y crecimiento en PDA a los siete días, porque fueron las variables que más aportaron a la variabilidad total.

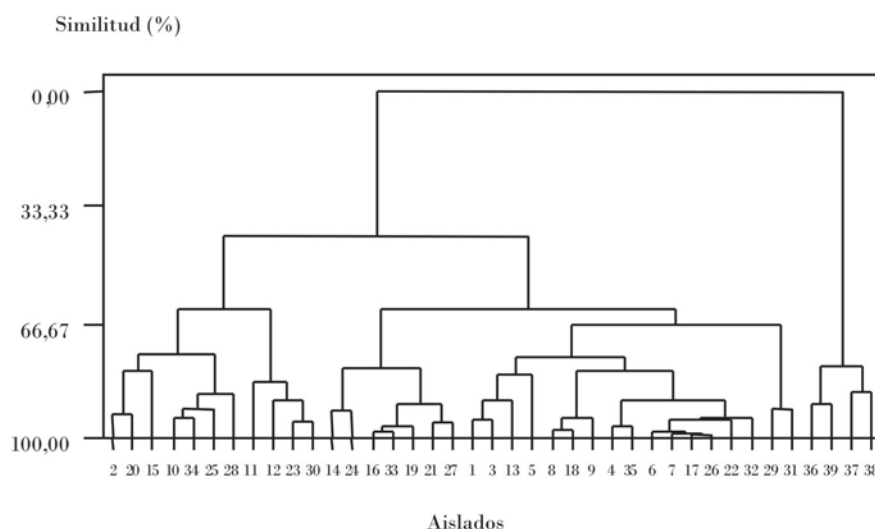


Figura 12. Análisis de agrupamiento de todos los aislamientos basado en los parámetros crecimiento de las colonias en PDA a los siete días, y tamaño del conidioma.

Los aislamientos se dividieron en dos grupos. Uno primero (I) formado por 34 cepas de *G. citricarpa* aisladas a partir de los diferentes síntomas de la mancha negra de los cítricos, y un segundo grupo (II) por las cuatro cepas de *G. mangiferae* (aislamientos 36, 37, 38, 39) aisladas a partir de las manchas puntuales. Entre ambos grupos existe el 70% de disimilitud. Los aislamientos del grupo I (*G. citricarpa*) se caracterizan por tener crecimiento lento en PDA y forman abundantes conidios maduros más pequeños que los del grupo II (*G. mangiferae*). Los aislamientos del grupo II (*G. mangiferae*) tienen crecimiento rápido en PDA, forman peritecios maduros abundantes y escasos picnidios de un tamaño mínimo superior a los formados por *G. citricarpa*, y no liberan el pigmento amarillo en agar V8.

El tamaño del conidioma y el crecimiento del PDA a los siete días, junto a la producción de pigmento amarillo en medio V8 presente en *G. citricarpa* y ausente en *G. mangiferae*, así como la producción de pseudotecios en cultivos monospóricos de *G. mangiferae*, ausentes en *G. citricarpa*, permiten una clara diferenciación de ambas especies a partir de criterios morfológicos y biológicos.

La diferenciación en Cuba de dos grupos de aislamientos concuerda con los informes de McOnie (1964), el cual fue el primero en dividir los aislados de *Guignardia* sp. en dos grupos, uno de crecimiento lento o patogénico y otro de crecimiento rápido o no patogénico. Aunque detectó la formación de escasos ascocarpos en medio de cultivo en los aislados patogénicos, nunca logró su maduración a pesar de utilizar medios de cultivo suplementado con vitaminas y extracto de hojas. Baayen *et al.* (2002) nunca observaron la formación de peritecios en medio de cultivo en aislamientos de *G. citricarpa*, y concluyeron que el hongo es heterotálico, lo que concuerda con las presentes observaciones, aspecto que debe ser verificado en el futuro a través de estudios de apareamiento con aislamientos monoascospóricos y con el empleo de marcadores moleculares. La producción de peritecios observada en los aislamientos monospóricos de *G. mangiferae* indica que esta especie es homotálica, lo que constituye otro carácter que diferencia a ambas especies.

CONCLUSIONES

- Existen dos especies de *Guignardia* en frutos cítricos en Cuba: *Guignardia citricarpa* Kiely y *Guignardia mangiferae* A. J. Roy.
- *G. citricarpa* se caracteriza por tener crecimiento lento en PDA, producir picnidios maduros en medio de cultivo cuyas dimensiones son frecuentemente menores de 145 µm, liberar un pigmento amarillo en agar V8 y AA, y no producir peritecios a partir de aislamientos monospóricos.
- Por primera vez se documenta la presencia en Cuba de *Guignardia mangiferae*, la cual no está asociada a manchas de importancia económica en frutos cítricos. Se caracteriza por tener crecimiento rápido en PDA, formar abundantes peritecios fértiles en medio de cultivo, escasos picnidios, cuyas dimensiones son frecuentemente mayores de 145 µm y no libera pigmento amarillo en agar V8.
- Ambas especies de *Guignardia* en cítricos pueden ser diagnosticadas mediante los criterios morfológicos y biológicos anteriormente descritos.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los colegas ingeniero Leandro Herrera y a la máster María Pueyo por la contribución con aislamientos de *G. citricarpa* obtenidos en el LCCV; a la licenciada Ángela Porras por su apoyo y consulta en el procesamiento estadístico de los datos; al licenciado Einar Martínez por su contribución en la obtención de las fotos al microscopio y en la revisión del texto.

REFERENCIAS

- Baayen, R. P.; P. J. M. Bonants; G. Verkley; G. C. Carroll; H. A. Van der Aa; I. R. Brouwershaven; G. C. Schutte; W. Maccheroni; C. Glienke de Blanco; J. L. Azevedo: «Nonpathogenic Isolates of the Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa*, Identificate as a Cosmopolitan Endophyte of Woody Plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*)», *Phytopathology* 92:464-477, EE. UU., 2002.
- EPPO: «*Guignardia citricarpa*. Diagnostic Protocols for Regulated Pests. PM 7/17(1)», *EPPO Bulletin* 33:245-247, Inglaterra, 2003.
- Gams, W.; E. S. Hoekstra; A. Aptroot: *Course of Mycology. Centraalbureau Voort Schimmelcultures*, 4th ed., Baarn/Delf, Holanda, 1988.
- Kotzé, J. M.: *Black Spot. Compendium of Citrus Diseases*, 2nd. ed., APS Press, St. Paul, Minnesota, EE. UU., 2000, pp. 23-25.
- McOnie, K. C.: «The Latent Occurrence in Citrus and Other Hosts of a *Guignardia* Easily Confused with *G. citricarpa*, the Black Spot Pathogen», *Phytopathology* 54:40-43, EE. UU., 1964.
- NAPPO: «Black Spot, *Citrus*», Florida, EE. UU., First report», <http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=421> (consultado en el 2010).
- Okane, I.; A. Nakagiri; I. Tad: «Identity of *Guignardia* sp. Inhabiting Ericaceous Plants», *Can. J. Bot.* 79:101-109, Canadá, 2001.
- Roy, A. J.: «Some Fungi from Almora», *Indian Phytopathology* 20:340-341, EE. UU., 1967.

Snowdon, A. L.: «A Color Atlas of Postharvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. General Introduction and Fruits», vol. 1, *Wolfe Scientific*, Reino Unido, 1990.

Sutton, B. C.: *The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata*, CMI, Kew, Surrey, Inglaterra, 1980, pp. 403-405.

Sutton, B. C.; J. M. Waterston: «*Guignardia citricarpa*. CMI Descriptions of Plant Pathogenic Fungi and Bacteria», no. 85, CAB International, Wallington, Inglaterra, 1966.

Vázquez, H.: «Notificación de plaga: Mancha negra de los cítricos causada por el hongo *Guignardia citricarpa* Kiely (*Phoma citricarpa* Mc Alpine)», Centro Nacional de Sanidad Vegetal. Ministerio de la Agricultura, La Habana, 2007.