

# Identificación del hongo agente causal de la necrosis foliar en chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.) a través de técnicas moleculares

Vidal Martínez, Nayelli Ayatzol<sup>1</sup>, Noa Carrazana, Juan Carlos<sup>2</sup>  
Chiquito Contreras, Roberto G.<sup>1</sup>, Castillo Rocha, Doris G.<sup>1</sup>  
Ruiz Bello, Romeo<sup>1</sup>, Vidal Hernández, Librado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus Xalapa, Universidad Veracruzana.

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada. UV. Email: angelitonv@gmail.com

## Resumen

En los últimos años el cultivo del chirimoyo en México ha adquirido importancia en los estados de centro del país. En México existen pocos estudios de diagnósticos fitosanitarios en el chirimoyo, siendo las plagas y enfermedades las principales barreras para la obtención de fruta de buena calidad. El objetivo principal fue identificar el agente causal que afecta a este frutal, así como describir las características moleculares del hongo. Las muestras fueron sembradas en placas de medio PDA. Los micelios crecidos fueron purificados en 3 cepas H1, H2 y H3, posteriormente se evaluó en diferentes medios: PDA, V8, Agar maíz (A-M) y Agar bacteriológico. La prueba de patogenicidad

dad fue a través de cámaras húmedas y en un medio PDA. La extracción de ADN se realizó mediante la técnica de Diez *et al.* (1999 modificado). Las muestras purificadas de PCR fueron secuenciadas en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. El mejor crecimiento de micelio se logró en los medios PDA, A-M y V8, a partir del tercer, cuarto y quinto día de incubación, observándose un micelio más desarrollado en medio PDA. Se logró amplificar la región ITS, el producto amplificado fue de  $\approx 600$  pb, ésta arrojó un porcentaje de identidad para la muestra H2 de un 98% - 97% , el hongo reportado como *Phomosis* sp y para la muestra H3 un porcentaje de identidad de un 98% - 97% el hongo reportado como *Sordaria* sp.

Palabras claves: *antracnosis, técnicas moleculares, cepa*

## Introducción

La familia de las Annonaceae está representada por cerca de 75 géneros y más de 600 especies. El género *Annona*, con aproximadamente 120 especies, es el más cultivado. La especie de *Annona cherimola* Mill., es actualmente la más importante comercialmente en el mundo, seguida del guanábano (*Annona muricata* L.); (*Annona squamosa* L.) y el híbrido de *A. cherimola* x *A. squamosa* (Kavati, 1992; Paiva y Fioravanco, 1994 y Junqueira *et al.*, 1996). De acuerdo con Rebollar (1995) y Rebollar *et al.* (1997), el cultivo de estas especies de anonáceas tiene grandes perspectivas en México y pueden emplearse como cultivos alternativos en algunos estados, ya que poseen un excelente sabor al paladar, además de que han tenido gran aceptación y demanda en algunos mercados internacionales como Japón y Estados Unidos. Sin embargo, la importancia económica de las especies de la familia Annonaceae es diversa y no se restringe a las especies comestibles, pues además incluye especies con propiedades medicinales, propiedades tóxicas a peces y propiedades insecticidas (Much, 1988 citado por Rodríguez y Nieto, 1997). A pesar de las importantes características antes mencionadas, en general el cultivo de las anonáceas no se ha formalizado agronómica y económicamente en México, quizá debido en parte, a lo percedero de sus frutos

(consistencia suave, textura fina) y por lo mismo a las dificultades para su transporte y mantenimiento en los mercados (Rodríguez, 1999). Por otro lado, también existe una falta de información en cuanto a estudios poblacionales y de comunidad que permitan establecer algunas características como son la fenología, la variabilidad genética, susceptibilidad y/o resistencia a diversos factores ambientales, incluyendo el efecto ocasionado por diversas plagas y enfermedades, los cuales ayudarían a definir y caracterizar poblaciones y especies en los diversos estados de la República Mexicana en donde se cultivan o crecen las especies de anonáceas.

La alta diversidad en el grupo de las especies del género del *Colletotrichum* ha sido muy problemática ya que el diagnóstico fitopatológico requiere identificar con precisión patógenos específicos para el control de enfermedades. Esta confusión taxonómica ha provocado el aumento en el uso de herramientas moleculares para la identificación de diversidad interespecífica e intraespecífica dentro de un grupo complejo de especies (Gubert *et al.*, 2003). A pesar de la importancia que tiene este frutal, en México se tienen pocos estudios de diagnóstico fitosanitario en el chirimoyo, siendo las plagas y las enfermedades las principales barreras para la obtención de fruta de buena calidad, por ello, la importancia de esta investigación es identificar el hongo que provoca la necrosis foliar en este frutal.

## Objetivo general

Determinar las especies de los agentes causales de la antracnosis foliar y su incidencia de enfermedad en árboles de *Annona cherimola* Mill.

## Hipótesis

Dadas las características de las lesiones en las hojas es posible que se trate del hongo del género *Colletotrichum* spp.

## Método

### *Ubicación de zona de muestreo*

El muestreo de las hojas enfermas se llevó a cabo en la localidad de El Fresno, municipio de Tlacolulan, Veracruz. Esta localidad se encuentra ubicada en la zona centro del estado de Veracruz, en las coordenadas geográficas 19° 37' 47.6" de Latitud Norte y 96° 58' 48.5 " Longitud Oeste, con una altitud 1740 m, temperatura media anual de 19.6°C y una precipitación pluvial media anual de 1,346.9 mm, el clima es templado, húmedo, extenso (Enciclopedia de los Municipios de México, 2005).<sup>1</sup>

### *Recolecta de muestras e Incidencia de enfermedad.*

Se realizaron muestreos de árboles de chirimoyo en los meses de noviembre y diciembre de 2008 en la zona de muestreo. Se seleccionaron 5 árboles, de éstos se recolectaron 6 hojas por árbol que presentaran incidencia de antracnosis (manchas irregulares de color café a café oscuro en el borde, base, nervaduras principales, secundarias y ápice de la hoja). Éstas se trasladaron en bolsas de plástico, al Laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias Agrícolas Campus Xalapa. Las hojas se procesaron durante las 24 h siguientes a la colecta. De cada árbol seleccionado, se evaluó la incidencia de enfermedad, tomando como base dos puntos cardinales del árbol, Este y Oeste. Se contabilizó y se promedió la incidencia de la enfermedad de un total de 100 hojas de cada lado del árbol y con el apoyo de una escala donde A= 0%, B= 1 – 10%, C= 11 – 25%, D= 26 – 50%, E= > 51%.

---

<sup>1</sup>Tomado de la red mundial: <http://www.inafed.gob.mx/work/templates/enciclo/veracruz/municipios/30177a.htm>. Página consultada 30 de enero de 2010.

## *Caracterización e identificación de la enfermedad*

### *Aislamiento en medios de cultivo*

De las hojas recolectadas se seleccionaron 10 hojas, las más representativas, se lavaron con alcohol al 10% durante 2 minutos, posteriormente se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% durante 3 minutos, consecutivamente se enjugaron 3 veces con agua destilada estéril, se cortaron cuadrados de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de cada hoja en la parte del área dañada, y se sembraron en placas de papa dextrosa agar (PDA). Las cajas se incubaron durante 73 horas a 25 ± 2°C. Posteriormente se seleccionaron las tres colonias más representativas para posteriormente ser purificadas en placas de PDA para posteriormente ser utilizados para nuevos estudios.

### *Caracterización en medios de cultivos, patogénica y molecular*

#### *Medios de cultivo*

El crecimiento radial de cada una de las cepas H1, H3 y H3 se evaluó en cuatro diferentes medios: PDA, V8, Agar maíz y Agar bacteriológico. Del cultivo PDA original, se extrajeron trozos de aproximadamente 0.5 cm<sup>2</sup> los cuales contenían el hongo problema ya purificado, estos fueron sembrados en los medios anteriormente mencionados. Posteriormente fueron incubados a temperatura de 27°C. El crecimiento se determinó midiendo el radio de desarrollo de cada cepa a intervalos de 24 horas durante 7 días y realizando 4 repeticiones por cada cepa.

Para determinar las tasas de crecimiento los datos obtenidos se registraron en una hoja de cálculo. El análisis estadístico aplicado a este trabajo fue entorno a las siguientes variables: día, tipo cepa, medio de cultivo; todos bajo un diseño experimental completamente al azar 4x4. Para conocer las diferencias estadísticas significativas se procedió a la realización de pruebas de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Se utilizó el paquete estadístico Statistical Analytical System (SAS).

### ***Pruebas de Patogenicidad***

Esta prueba se realizó con el fin de observar la capacidad patogénica que tienen los aislamientos de la hoja del chirimoyo en generar síntomas de antracnosis sobre hojas sanas. Se evaluaron las 3 cepas problema, H1- H2- H3, inoculando 27 hojas sanas de chirimoyo, 9 para cada cepa. Las hojas fueron previamente lavadas y desinfectadas con alcohol al 10% durante 3 minutos y 5 minutos con hipoclorito de sodio al 5% finalizando con 3 enjuagues con agua destilada estéril. Después de su lavado, se les provocó una herida física, se aplicó un corte de aproximadamente 0.5 cm de medio PDA con micelio del hongo con un crecimiento de 7 días. A cada caja petri se le agregó 25 mL de agua destilada estéril, humedeciendo perfectamente el algodón y el papel filtro. Se realizaron 3 repeticiones por cada cepa, las cámaras húmedas fueron selladas con klean pack e incubadas a una temperatura de 25°C y diariamente durante 7 días se revisaron para observar el desarrollo de la enfermedad.

### ***Análisis moleculares (PCR -ITS)***

La extracción de ADN (ácido desoxiribonucleico) del micelio de las 3 cepas obtenidas H1 - H2 - H3, se realizó con la metodología de Diez *et al.* (1999 modificado). Su calidad se evaluó por electroforesis en gel de agarosa (1%) y se cuantificó en un espectrofotómetro a 260 OD (Genesys 10 uv). La amplificación de las región ITS de los genes ribosomales (rARN) 18S - 5.8S y 5.8S - 28S fueron con los iniciadores universales ITS1F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) (Bruns *et al.*, 2004) e ITS4/R (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990) para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Cada reacción tuvo por volumen final 25 µL con la siguiente formulación: agua ultrapura estéril, 16 µL; solución amortiguadora 1x 2.5 µL; MgCl<sub>2</sub> a 1.5 mM, 1.5 µL; iniciadores ITS1 e ITS4 a 0.5 pM cada uno 1.25 µL por iniciador; muestra problema de ADN a 100 ng, 1 µL; dNTPs Mix a 0.2 mM (Promega), 0.5 µL; *Taq*-ADN Polimerasa (Fermentas Life Sciences) a 1 u; 1 µL. se utilizó un termociclador (Lavet) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min; 30 ciclos de

desnaturalización a 94°C por 30 s; 30 ciclos de alineamiento a 55°C por 30 s; y extensión 72°C por 1 min; y una extensión final de final a 72°C durante 7 min. El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa (1.5%), se tiñó en una solución de bromuro de etidio y la banda se visualizó en un trasiluminador. La purificación se realizó con el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) según el protocolo de la Compañía.

### ***Variables de estudio***

Para este trabajo se evaluaron las siguientes variables:

En campo: incidencia de porcentaje de enfermedad en hojas de chimoya.

En Laboratorio: crecimiento radial de las cepas H1, H2 y H3 en cuatro diferentes medios (PDA, A-B, A-M y V8) y 7 días de incubación.

## **Resultados y discusión**

### ***Recolecta e Incidencia de la enfermedad***

Se recolectaron hojas con síntomas característicos de antracnosis (figura 1). Para determinar la incidencia el muestreo se realizó con base a dos puntos cardinales, esto por la influencia que la luz solar puede ejercer en el desarrollo del hongo.



Figura 1. Hoja de chirimoyo con lesiones de la enfermedad

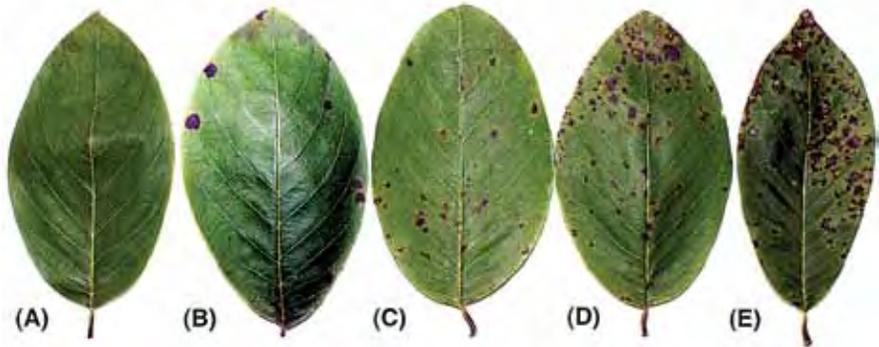


Figura 2. Incidencia de porcentaje de infección

Los resultados obtenidos se basaron en una escala que va de 0% a más de 50% (figura 2) de incidencia del hongo en la hoja donde A= 0%, B= 1 – 10%, C= 11 – 25%, D= 26 – 50%, E= > 51% (Noa, 2009, comunicación personal)<sup>2</sup>. Sin embargo Tovar *et al.* (2002) en un estudio sobre inciden-

<sup>2</sup> Noa, J.C. 2009. Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada. Universidad Veracruzana.

cia de enfermedad en hojas de chirimoyo emplearon la Escala Logarítmica Diagramática de Severidad para su estudio.

Se observó en la figura 3 que del lado Oeste existe una mayor incidencia de enfermedad en las hojas de chirimoyo que oscila entre el 10 y 24% (Grado B), teniendo en segundo lugar un avance de enfermedad de entre el 40 y 50% (Grado E) en un 25% del índice total. Teniendo en un porcentaje menor una incidencia de entre 11 y 25% (Grado C).

En la figura 4 se puede observar una alta presencia de hojas enfermas con una incidencia que oscila entre 10 y 24% (Grado B) seguida de un avance de más de >50% (Grado E), lo que nos da como resultado un porcentaje de aproximadamente menos de 15% de hojas sanas para este cuadrante.

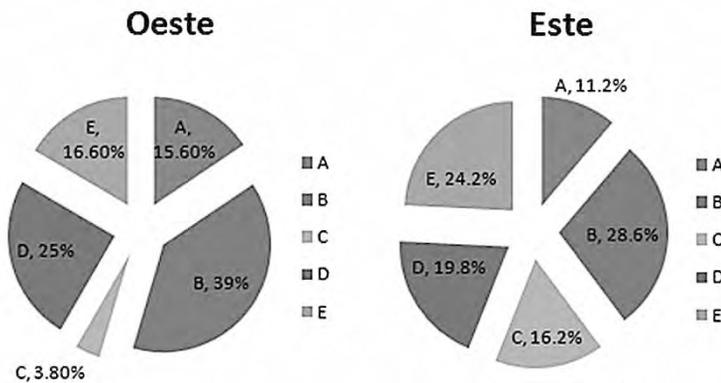


Figura 3. Porcentajes de incidencia de enfermedad en árboles de chirimoyo lado Oeste

Figura 4. Porcentajes de incidencia de enfermedad en árboles de chirimoyo lado Este

Al comparar los resultados de las medias de cada punto cardinal (figura 5) se puede observar un mayor número de hojas infectadas con clasificación con la grado B en ambos hemisferios, presentándose en mayor porcentaje el hemisferio Oeste con un aproximado de 40%. Seguido de la incidencia con la clasificación con los grados E y D. Siendo más baja la incidencia de enfermedad de la clasificación con el grado E, presentando un porcentaje más bajo en el hemisferio Oeste de menos del 10% y con un porcentaje de aproximadamente 15% para el

hemisferio Este. Sin embargo Arroyo *et al.* (2004) en un estudio sobre incidencia de enfermedades del Pejibaye (*Bactris gasipaes*) reporta como una de las enfermedades de esta especie la Mancha negra de las hojas cuyo agente causal se identificó como *Colletotrichum* sp., señalan que esta enfermedad no presenta relación clara con las variables en la precipitación, temperatura o la evaporación. Ellos reportan que los niveles máximos observados en estas variables se presentaron en el mes de octubre.

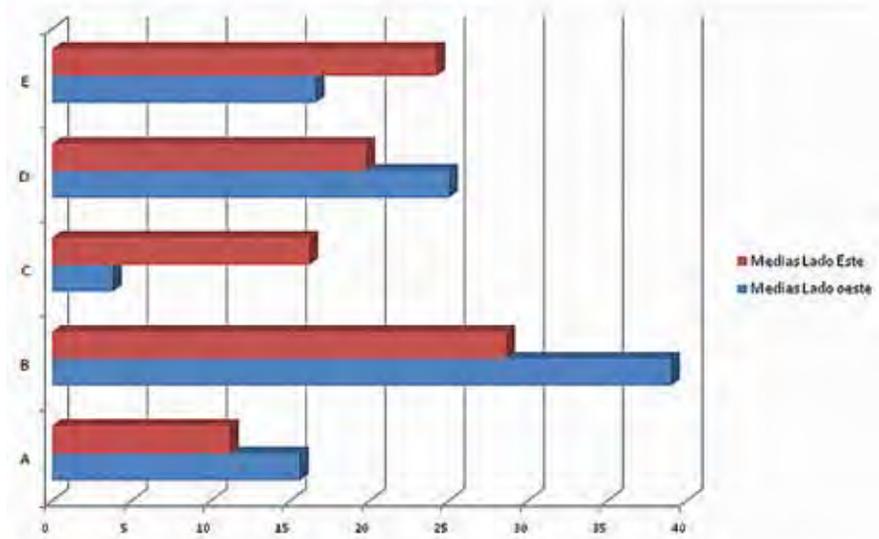


Figura 5. Comparación de medias de porcentaje infección entre lado Este y Oeste

### *Medios de cultivos*

Consecuencia de cuatro medios de cultivos en el crecimiento de micelio de las muestras H1, H2 y H3 a los 7 días de incubación (figura 9). Se observó que el crecimiento inicial del micelio estuvo influenciado por el tipo de medio utilizado. Los mejores crecimientos de micelio se logró en los medios PDA, A-M y V8, a partir del tercer, cuarto y quinto día de incubación, se observó un micelio más desarrollado en medio PDA, estos resultados concuerdan con Orozco *et al.*, 2004 quienes reportan

un crecimiento de micelio a los 3, 7 y 10 días de incubación obteniendo un micelio mejor desarrollado en medio PDA que en medio de jugo V8.

Crecimiento radial de la cepa H1 (figura 6) donde se pudo observar que en el día uno no hubo diferencias significativas en el análisis de la variable crecimiento del micelio. En el segundo y tercer día se observó que el crecimiento del micelio en el medio A-M hubo diferencia significativa en relación a los demás medios. En el cuarto día se observó una diferencia significativa para los medios A-M y V8 en comparación con el crecimiento del micelio en los medios PDA y A-B. Al analizar el crecimiento del micelio en el quinto día se observó una diferencia significativa en el medio V8 en relación a los otros medios. Para el sexto y séptimo día se observó una diferencia altamente significativa para los medios PDA, A-M y V8 en comparación con el medio A-B.

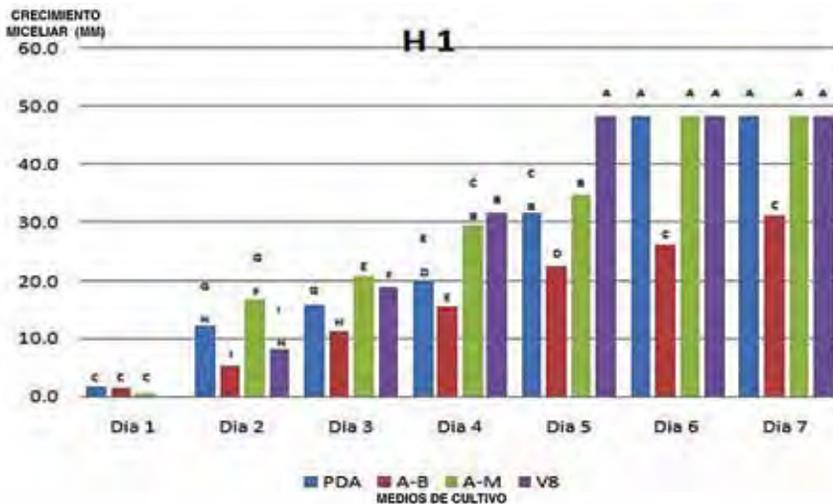


Figura 6. Comparación entre medias de crecimiento de micelio de la cepa H1 en los 4 diferentes medio de cultivo durante 7 días de incubación. Separación de medias según la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) (N=14)

Crecimiento radial de la cepa H2 (figura 7) se pudo observar que el primer y segundo día hay una diferencia significativa en el crecimiento de micelio en el medio V8. Para el tercer día se pudo notar una diferen-

cia altamente significativa para el crecimiento de micelio en los medios de cultivo A-M y V8. En los días cuarto, quinto y sexto, se pudo observar una diferencia altamente significativa para los medios PDA, A-M y V8 en relación con el crecimiento de micelio en el medio A-B donde se visualizó que el medio no pudo completar su crecimiento total en los siete días de incubación.

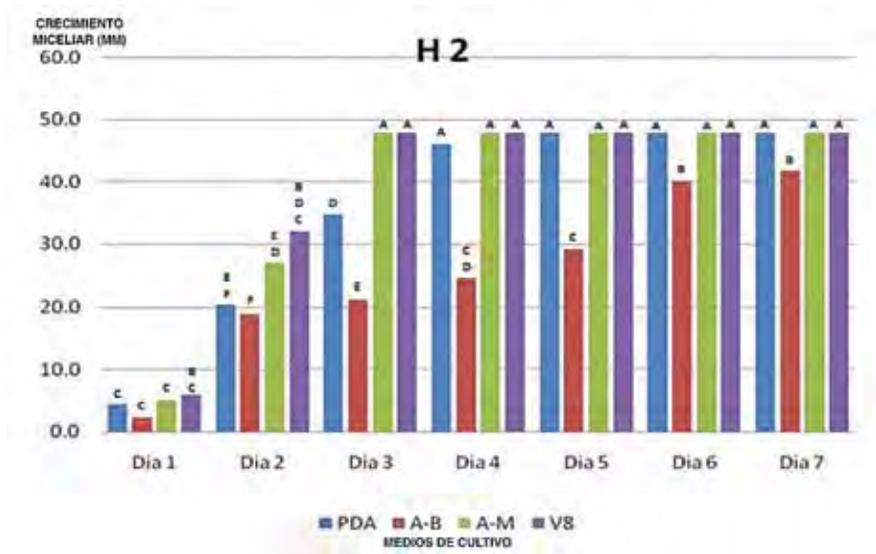


Figura 7. Comparación entre medias de crecimiento de micelio de la cepa H2 en los 4 diferentes medio de cultivo durante 7 días de incubación. Separación de medias según la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) (N=14)

El crecimiento radial de la cepa H3 (figura 8) donde se observó una diferencia altamente significativa en el crecimiento de la cepa en el medio A-M y V8. Para el segundo día se observó una diferencia significativa en el crecimiento de este micelio en el medio V8 con respecto a los demás medios. En el tercer día se observó una diferencia altamente significativa entre los medios A-M y V8 en relación con los otros dos medios. Para el cuarto, quinto, sexto y séptimo día se observó el crecimiento total de la cepa H3.

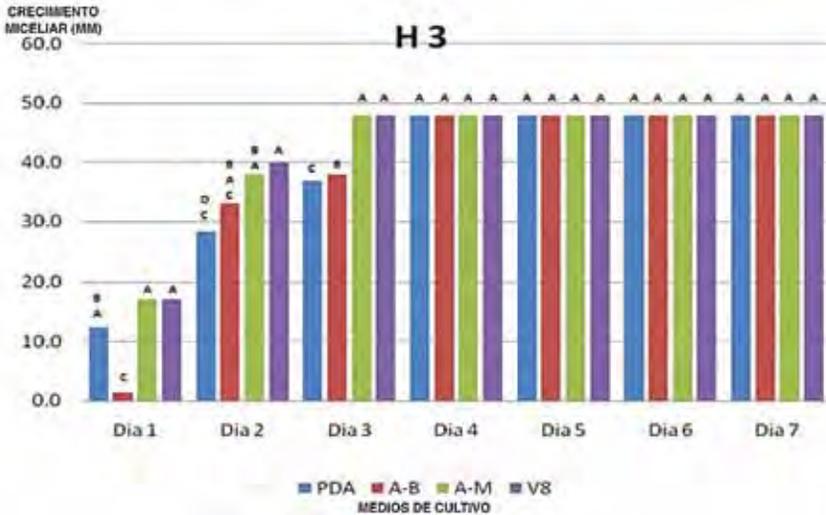


Figura 8. Comparación entre medias de crecimiento de micelio de la cepa H3 en los 4 diferentes medio de cultivo a los 7 días de incubación. Separación de medias según la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) (N=14)

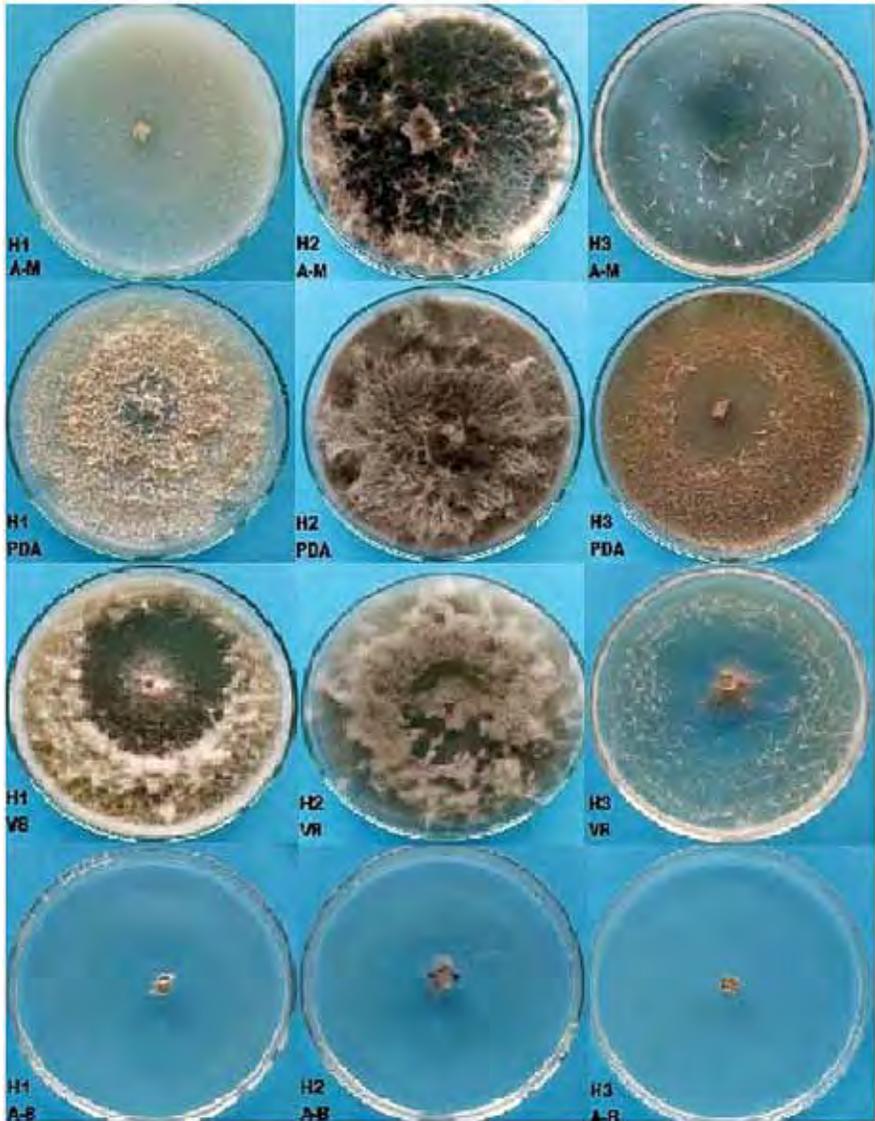


Figura 9. Crecimiento que micelio de *Colletotrichum sp* en cuatro medios de cultivo sólidos: Agar Maíz (A-M), PDA (Papa-Dextrosa-Agar), Jugo de verduras V8 (V8), Agar Bacteriológico (A-B) a los 7 días de incubación. Primera fila cepas H1, H2 y H3 en medio A-M, segunda fila cepas en medio PDA, tercera fila cepas en medio V8 y cuarta fila cepas en medio A-B

### *Patogenicidad*

Los síntomas desarrollados que se observaron en los aislamientos patogénicos sobre hojas de chirimoyo inoculadas con micelio desarrollado en medio PDA con un crecimiento de 7 días, fueron lesiones necróticas. Después de 72 horas de inoculadas las hojas, se observaron los primeros síntomas a manera de lesiones sin forma definida ubicadas principalmente en el ápice y en el borde de la hoja (figura 10), los tonos de las lesiones fueron de color café a café oscuro, con bordes delimitados que abarcaron un 30% de la hoja, estos datos concuerdan con los reportados con Villanueva-Arce *et al.*(2006) quienes realizaron esta prueba de patogenicidad en frutos de chirimoyo donde se observaron los mismos síntomas a las 72 horas, sin embargo, Contreras (2006) reporta los mismos síntomas en frutos de lulo (*Solanum quitoense*) hasta 7 días después de la inoculación. En esta prueba se observó la invasión del micelio en las hojas de chirimoyo al cabo de 7 días de inoculadas en un 80 a 100% del total de la hoja provocando la muerte del tejido foliar (figura 10).



Figura 10. Síntomas de antracnosis en hojas a los 7 de incubación

## Análisis Molecular

### Extracción de ADN

Usando el protocolo de Diez *et al.* (1999) modificado (Noa, 2009, comunicación personal) se logró extraer ADN genómico de las muestras H2 y H3 (figura 11) obteniendo:

Muestra	Peso de micelio	Resultado de lectura en el espectrofotómetro dilución 5:1000
H2 ( 270709)	0.2047g	210 ng/ $\mu$ L
H3(120110)	0.2907g	1090 ng/ $\mu$ L

Comparando los resultados obtenidos con lo reportado por Rodríguez (2007) y utilizando el protocolo de Goodwin que señala haber obtenido de ADN entre 30 y 200 ng/ $\mu$ L, y reporta que este resultado es una cantidad suficiente para la realización de la PCR, se puede observar una cantidad mayor de ADN al utilizar el protocolo de extracción modificado de Diez *et al.* (1999).

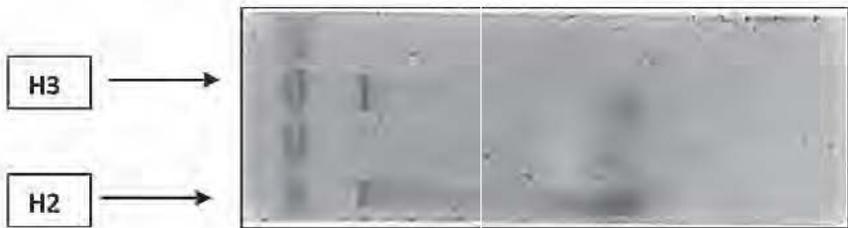


Figura 11. Electroforesis de ADN genómico en gel de agarosa al 0.8%

### Amplificación de la región ITS

La amplificación de ADN con los cebadores universales ITS1F e ITS4/R, se realizó utilizando una concentración de 100 ng/mL para cada una de las muestras donde se obtuvo un peso aproximado de 600 pares de

bases (pb) para cada muestra (figura 12), estos resultados concuerdan con Rodríguez (2007) quien reporta haber obtenido el mismo tamaño molecular utilizando los cebadores ITS2 e ITS2 y utilizando solo 30 ng de ADN. Sin embargo, Álvarez *et al.* (s/f) reporta haber obtenido fragmentos de 580 pb utilizando los cebadores ITS1 e ITS4, mientras que con los cebadores ITS1 e ITS2 obtuvo un fragmento con una cantidad de 240 pb indicando ausencia de polimorfismo entre sus aislamientos de *Colletotrichum* sp. La purificación de las muestras H2 y H3 se realizó de acuerdo al Protocolo del Kit (Promega PCR Clean- up System).



Figura 12. Electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa al 1.5 % gel de la región ITS de las cepas en estudio (H2 y H3)

Los productos de PCR purificados fueron enviadas al Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México (UNAM) para su secuenciación, obteniendo:

Cepa H2 de 59l pb

AGGTGCAAGTCCTCCGGTTGTGTTGGCCAGCGGAGGGT-  
CATTGCTGGAACGCGCCTCGGCGCACCCAGAAACCCTTTG-  
TGAACCTTATACCTACTGTTGCCTCGGCGCAGGCCGGCTTCT-  
GTCACAAGAAGCCCCCTGGAGACAGGGAGCAGCCCGC-  
CGGCGGCCAACCAAACCTCTTGTTTCTATAGTGAATCTCT-  
GAGTAAAAACATAAATGAATCAAACTTTCAACAACG-  
GATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT-  
GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA-  
ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGG-  
CATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCTGGCTT-  
GGTGATGGGGCACTGCCTGTAAAAAGGCAGGCCCTGA-  
AATCTAGTGGCGAGCTCGCCAGGACCCCGAGCGTAGTAG-  
TTATATCTCGCTCTGGAAGGCCCTGGCGGTGCCCTGCCG-  
TTAAACCCCAACTTCTGAAAATTTGACCTCGGATCAGGTA-  
GGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

Cepa H3 de 666 pb

AACTGTCTCCGTTGGTGACAGCGGAGGGTCATTACAGAGTT-  
GCAAACTCCCACAAACCATCGCGAATCTTACCCGTACGG-  
TTGCCTCGGCGCTGGCGGTCCGGAAGGCCCTCGGGCCCC-  
CGGACCCTCGGGCCTCCCGCGAGCGGGAGGCTGCCCGC-  
CGGAGTGCCGAAACCAAACCTTTGATATTTTATGTCTCTCT-  
GAGTAAACTTTTAAATAAGTCAAACTTTCAACAACG-  
GATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT-  
GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC-  
GAATCTTTGAACGCACATTGCGCTCGCCAGTATTCTGGC-  
GAGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCATCAAGCTCT-  
GCTTGCGTTGGGGATCCGCGGCTGCCCGCGGTCCCTCA-  
AAAACAGTGCGGGGCTCGCTAGTCACACCGAGCGTAG-  
TAATTCTACATCGCTATGGTCGTGCGGCGGGTTCTTGC-  
CGTAAAACCCCAATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGG-  
TAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGGCGGA

GGAACTCATACGCAGGAAAGAATTTTTTTTTCTCTTCCCT-  
 CACTTACTGCATAAAAAAAAAACTAAAACAAAAAATGCACA-  
 AAAATCAAAAATGACCATTATTACAACTAAAAAAAAAAAA-  
 CAAAAAAAAGAGAGAGAAAAATTAACGAGAATCA-  
 TACCTTAAATCAAGTAACGAATGACTCCGCGACATAAT-  
 CATTATCACAACCCAGGGGATATCTAAGAAAAACAAATC-  
 GACCGAAAACGCAAACCACCACGCGTAGTGGTCAAAGCA-  
 AAAAAAAAAAAAAATAACACATACATAACCAATCATATGAGC-  
 TAATAGTCTACAATAGAGATAGTATAGTCATAAGACAAAATC-  
 TACACAGAGCAGT

También se realizó la comparación de las dos muestras mediante el programa BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) del National Center for Biotechnology Information (NCBI), ésta arrojó un porcentaje de identidad para la muestra H2 de un 98%-97% con el hongo reportado como *Phomosis* spp, Gardiazabal y Rosenberg (1993) lo reportan como agente causal de enfermedad en postcosecha en el cultivo del chirimoyo. Pinto (2005) reporta a este hongo con el nombre común de cancro negro (*Phomopsis* spp) y podredumbre diplodia (*Phomosis anonacearum*) ambas enfermedades fúngicas afectan a las hojas, ramas y frutos de especies de *Annona*, estas ocurren principalmente en huertos abandonados y muestran síntomas de manchas en la superficie de la fruta. Para la muestra H3 el BLAST arrojó un porcentaje de identidad de un 98%-97% con el hongo reportado como *Sordaria* sp, mismo que a la fecha no ha sido reportado como agente causal del chirimoyo

Es necesario realizar una caracterización morfológica para un mejor resultado y así obtener una caracterización más específica de estos hongos, ya que los resultados de este programa, muestran porcentajes de identidad muy cercana hacia otros hongos reportados.



## Referencias

- Álvarez, E., Ospina, C.A., Mejía, J.F., y Llano, G.A. (s/f). Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporoides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle de Cauca. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 10 pp.
- Arroyo, C., Arauz, L.F. y Mora, J. 2004. Incidencia de enfermedades en Pejibaye (*Bactris gasipaes kunth*) para palmito. *Agronomía Mesoamericana*. 15: 61-68.
- Bruns, T.D., and Shefferson R.P. 2004. Evolutionary studies of ectomycorrhizal fungi: recent advances and future directions. *Canadian Journal of Botany*. 82: 1122-1132.
- Contreras, H.C. 2006. Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum* sp. obtenidos de frutos de Lulo con síntomas de antracnosis. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 115 pp.
- Diez, S., García, E.A., Pino, P.A., Botero, S., Corredor, G.G., Peralta, L.A., Castaño, J.H., Restrepo, A. and, McEwen J.G. 1999. PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* [online]. 41 (6): 351-358.

- Gardiazabal, I.F., y Rosenberg, M.G. 1993. El cultivo del chirimoyo. Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso. Chile. 118 pp.
- Gurbert, J.C., Liu, B., and Correll, J.C. 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intro RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia*. pp. 872- 895.
- Junqueira, N.T.V., Cunha, M.M. da; Oliveira, M.A.S., Pinto, A.C.Q. 1996. Graviola para exportação: aspectos fitossanitários. Brasília: MA-SDR- FRUPEX/ EMBRAPA- SPI. Brasil. 67 pp.
- Kavati, R.O. 1992. Cultivo de atemóia. In: Donadio, L. C., Martins, A.B.G., Valente, J.P. (Ed.) Fruticultura Triopical. FUNEP Jaboticabal, Brasil. pp. 39 -70.
- Orozco, M.S., Manzo, S.G., Guzmán, G.S., Farías, L.J. y Timmer L.W. 2004. Crecimiento y cambios morfológicos de *Colletotrichum acutatum* agente causal de la antracnosis en el limón mexicano incubado en diferentes medios de cultivo sólidos y líquidos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22 (33): 7.
- Paiva, M.C. y Fioravanco, J.C. 1994. Cultivares e melhoramento. In: Manica, I. Fruticultura: Cultivo de anonáceas: ata, cherimólia e graviola. Porto Alegre Evangraff. Brasil. pp. 18-29.
- Pinto, A.C. de Q. 2005. Agronomy. In: *Annona* species. International Centre for Underutilised Crops. University of Southampton. Southampton. Uk. pp. 71- 126.
- Rebollar, A.A. 1995. Observaciones preliminares de plagas y enfermedades de seis frutales nativos potenciabes para el estado de Michoacán. En: Primera Reunion Regional sobre Cultivos alternati-

vos, tecnología y mercados para la agricultura de la región Centro Occidente de México. México.

Rebollar, A.A., Domínguez, J.L., Nieto-Ángel, P., Nava-Díaz, C., y Delgado Sánchez, F. 1997. Principales plagas y enfermedad de las anonáceas en México. In: Sao Jose, A.R., Sousa I., V.B, Morais, O. M., e Reboucias, T.N.H. (Eds.) Anonaceas Produção e mercado (Pinha, Graviola, Atemoia e Cherimólia). Unoversidade Estadual do Sudoeste de Bahia. Brasil. pp. 222-239.

Rodríguez, G.M.P. 1999. Aplicación de algunos enfoques epidemiológicos en el estudio y manejo de las plagas y las enfermedades de las anonáceas. En: Memoria II Congreso Internacional de Anonáceas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. pp. 23.

Rodríguez, J. y Nieto, D. 1997. El cultivo de la chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) en México. In: Sao Jose, A.R., Sousa I., V.B, Morais, O. M., e Reboucias, T.N.H. (Eds.) Anonaceas, Produção e Mercado (Pinha, Graviola, Atemoia e Cherimólia). Unoversidade Estadual do Sudoeste de Bahia. Brasil. pp. 7-19.

Rodríguez, G.A. 2007. Caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum* sp. asociadas a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD. Facultad de Ciencias. Pontifica Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 126 pp.

Tovar, S.A., Hernández, M.M., Cristobal, A.J., Romero, H.R. y Mora-Aguilera, G. 2002. Escala logarítmica diagráfica de severidad de la mancha negra (*Colletotrichum gloeosporoides* Penz.) en chirimoyo (*Annona cherimola* Mil.). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 103- 109.

Villanueva- Arce, R., Cárdenas, S.E., Hernández, A.A., Mora, A.A. y Te-líz, O.D. 2006. Patogénesis de la antracnosis (*Colletotrichum fraga-*

*riae*) en frutos de chirimoya. Instituto Politécnico Nacional y Colegio de Postgraduados. México. 10 pp.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.J., White, T.J. (Eds.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press. New York, USA. pp. 315- 322.

### III. *Annona cherimola* x *Annona squamosa*



Fotos: Costa y Ferreira

