



Causal agents of rot in Soursop fruit (*Annona muricata* L.) in Nayarit, Mexico.

Agentes causales de la pudrición de fruto de Guanábana (*Annona muricata* L.) en Nayarit, México.

Camero-Ayón, C. B.², Luna-Esquivel, G.^{1,2}, Ríos-Velasco, C.⁴, Díaz-Heredia, M.¹,
Rodríguez-Palomera, M.³, Betancourt-Aranguré, A.² and Camero-Campos, O. J.^{1,2*}

Universidad Autónoma de Nayarit, ¹Unidad Académica de Agricultura,

²Programa de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias;

³Programa de Doctorado en Ciencias Biológico Agropecuarias. Carretera
Tepic-Compostela Km. 9. C.P. 63155. Xalisco, Nayarit, México.

⁴Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Campus Cuauhtémoc, Chihuahua.
Av. Río Conchos S/N, Parque Industrial. C.P. 31570, Cuauhtémoc, Chihuahua, México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Camero-Ayón, C. B., Luna-Esquivel, G., Ríos-Velasco, C., Díaz-Heredia, M., Rodríguez-Palomera, M., Betancourt-Aranguré, A. and Camero-Campos, O. J. (2019). Causal agents of rot in Soursop fruit (*Annona muricata* L.) in Nayarit, Mexico.

Revista Bio Ciencias 6, e538. doi: <http://dx.doi.org/10.15741/revbio.06.01.01>



ABSTRACT

The state of Nayarit is the main producer of *Annona muricata* in Mexico, however, the state production is affected by fruit rots and the causal agent has not been determined until now. The objective of the current work was to identify the causal agent(s) of soursop fruit rots in the state of Nayarit, for which samplings were carried out during the year 2017 in the municipalities of San Blas and Compostela. Five fungal genus associated to dry rot and five fungal genus to soft rot fungi were isolated and identified by pathogenicity tests on healthy soursop fruits and then with molecular identification. *Colletotrichum gloeosporioides* (access code KX960784.1) and *Pestalotiopsis* sp. (access code KX960814.1) were identified to be the cause of dry rots, while the fungus *Lasiodiplodia pseudotheobromae*

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: June 27th 2018.

Accepted/Aceptado: August 24th 2018.

Available on line/Publicado: January 23rd 2019.

RESUMEN

El estado de Nayarit es el principal productor de *Annona muricata* en México, sin embargo, la producción estatal se ve afectada por pudriciones de fruto y hasta el momento no se ha determinado el agente causal. El objetivo del presente trabajo fue identificar a él o los agentes causales de las pudriciones de fruto de guanábana en el estado, para lo cual se realizaron muestreos durante el año 2017 en los municipios de San Blas y Compostela. Se aislaron e identificaron a cinco género de hongos asociados a las pudriciones secas y cinco géneros de hongos a las pudriciones blandas, de los cuales se determinó mediante pruebas de patogenicidad en frutos sanos de guanábana y posteriormente con identificación molecular, que *Colletotrichum gloeosporioides* (clave de acceso KX960784.1) y *Pestalotiopsis* sp. (clave de acceso KX960814.1) son los causantes de las pudriciones secas, mientras que el hongo *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (clave de acceso MH062942.1) es responsable de las pudriciones blandas de fruto de guanábana en Nayarit, México.

*Corresponding Author:

Octavio Jhonathan Camero-Campos. Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad Académica de Agricultura, Carretera Tepic-Compostela Km. 9, Xalisco, Nayarit, México. Phone: +52(311) 211 1163. E-mail: jhony695@gmail.com

(access code MH062942.1) were identified to be responsible for soft rots in soursop fruit in Nayarit, Mexico.

KEY WORDS

Isolated, phytopathogenic fungi, pathogenicity tests.

Introduction

Soursop fruit (*Annona muricata* L.) (Magnoliales) is one of the most important species of the *Annona* genus (Jiménez *et al.*, 2016). In Mexico, the annual production of soursop fruits is 28,853 tons grown on a surface of 3,527 ha, where the state of Nayarit is the main producer, concentrating 71.7 % of the national production on 2,529 ha (SIAP, 2017). However, the production of soursop fruit is affected by insect pest such as hibiscus mealybug (*Maconellicoccus hirsutus* Green) (Hemiptera: Pseudococcidae), Annonaceae weevil (*Optatus palmaris* Pascoe) (Coleoptera: Curculionidae) the seed borer wasp (*Bephratelloides maculicollis* Cameron and *B. cubensis* Ashmead) (Hymenoptera: Eurytomidae) and *Euphoria leucographa* (Gory & Percheron) (Coleoptera: Melolonthidae) (Coto & Saunders, 2001; Hernández *et al.*, 2013; Cambero *et al.*, 2017). On the other hand, plant diseases are one of the most important issue in agriculture, since it may generate losses of up to 100 % of the production (Agrios, 1998). Soursop fruit can be affected by radicular rot (*Rosellinia* sp. and *Phytophthora* sp.) and stains on fruits by *Phytophthora* sp. (Baraona & Sancho, 1992), as well as fruits putrefaction by *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., *Aspergillus niger* P.E.L. van Tieghem, *Penicillium* sp. (Okigbo & Obire, 2009), *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. and Sacc., *C. acutatum* and *Fusarium chlamydosporum* Wollenweber and Reinking (Alberto & Otones, 2016). Only few studies have been performed in Mexico for the diagnostic of diseases in this fruit. Nevertheless the association of fungi *C. gloeosporioides* and *Lasiodiplodia theobromae* (Patouillard) Griffon and Maublanc has been reported in Nayarit with dry and soft rots, respectively (Hernández *et al.*, 2013) without any identification until now of the causal agent of each type of rot. The study of the diagnosis of causal agents involved in soursop fruit rot turns out to be of great economic impact due to

PALABRAS CLAVE

Aislado, hongos fitopatógenos, pruebas de patogenicidad.

Introducción

La guanábana (*Annona muricata* L.) (Magnoliales) es una de las especies más importantes del género *Annona* (Jiménez *et al.*, 2016). En México, se cuenta con una producción anual de 28,853 t distribuidas en una superficie de 3,527 ha, donde el estado de Nayarit es el principal productor al concentrar el 71.7 % de la producción nacional con 2,529 ha (SIAP, 2017). Sin embargo, la producción de guanábana es afectada por insectos plaga como la cochinilla rosada del hibisco (*Maconellicoccus hirsutus* Green) (Hemiptera: Pseudococcidae), el picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris* Pascoe) (Coleoptera: Curculionidae) barrenadores de la semilla (*Bephratelloides maculicollis* Cameron y *B. cubensis* Ashmead) (Hymenoptera: Eurytomidae) y *Euphoria leucographa* (Gory & Percheron) (Coleoptera: Melolonthidae) (Coto & Saunders, 2001; Hernández *et al.*, 2013; Cambero *et al.*, 2017). Por otra parte, las enfermedades de las plantas son una de las más importantes debido a que pueden generar pérdidas de hasta el 100 % (Agrios, 1998). La guanábana, se puede afectar por podredumbre radicular (*Rosellinia* sp. y *Phytophthora* sp.) y manchas en fruto por *Phytophthora* sp. (Baraona & Sancho, 1992), así como pudrición de frutos por *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., *Aspergillus niger* P.E.L. van Tieghem, *Penicillium* sp. (Okigbo & Obire, 2009), *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. y Sacc., *C. acutatum* y *Fusarium chlamydosporum* Wollenweber y Reinking (Alberto & Otones, 2016). En México, son pocos los estudios realizados para el diagnóstico de enfermedades en este frutal. Sin embargo, en Nayarit se ha reportado la asociación de los hongos *C. gloeosporioides* y *Lasiodiplodia theobromae* (Patouillard) Griffon y Maublanc con pudriciones secas y blandas respectivamente (Hernández *et al.*, 2013) sin que hasta el momento se haya determinado el agente causal de cada pudrición. El estudio de la diagnosis de los agentes causales de las pudriciones de fruto de guanábana resulta de gran impacto económico debido a las pérdidas que estos ocasionan en volumen y calidad de producción, ya que se generan conocimientos sobre los patógenos causantes de enfermedades en fruto y es la primera condición requerida para que se puedan establecer estrategias de control en investigaciones

losses incurred by fruit production, in terms of volume and quality, since generating knowledge on diseases causing pathogens in fruits is the first condition required to be able to establish strategies for controlling rot in further research. In this sense, the aim of the current study was to identify rot causing pathogens using molecular approaches in soursop fruit in San Blas and Compostela municipalities, Nayarit, Mexico.

Materials and Methods

Area of study and biological material sampling

Sampling was performed in a total of 10 commercial orchards located in Compostela and San Blas municipalities, Nayarit (Table 1), from which different orchards were visited twice monthly from January to November 2017, where soursop fruits were sampled with different physiological maturation levels presenting symptoms of dry rot (96 fruits) and soft rot (23 fruits). Rotten fruits were placed individually in paper bags and were transferred at room temperature to the Plant Parasitology Laboratory of the Multidisciplinary Center of Scientific Research (CEMIC 03) of the Autonomous

posteriores. Por lo que, el objetivo del presente trabajo fue identificar molecularmente a los patógenos causantes de las pudriciones de fruto de guanábana en los municipios de San Blas y Compostela, Nayarit, México.

Material y Método

Área de estudio y recolecta de material biológico

Se realizaron muestreos en un total de 10 huertos comerciales ubicados en los municipios de Compostela y San Blas, Nayarit (Tabla 1), de los cuales, se visitaron dos veces a huertos diferentes mensualmente durante el periodo de enero a noviembre de 2017, donde se recolectaron frutos de guanábana con diferente grado de madurez fisiológica que presentaban síntomas de pudrición seca (96 frutos) y pudrición blanda de fruto (23 frutos). Los frutos enfermos se colocaron de manera individual en bolsas de papel y se trasladaron a temperatura ambiente al Laboratorio de Parasitología Agrícola del Centro Multidisciplinario de Investigación Científica (CEMIC 03) de la Universidad Autónoma de Nayarit (UAN) en donde se almacenaron a 0 °C hasta su procesamiento.

Table 1.
Soursop orchards sampled in Nayarit, Mexico, 2017.

Tabla 1.
Huertos de guanábana muestreados en Nayarit, México, 2017.

Municipality	Orchard	Coordinates	Altitude
Compostela	Chacala I	N 21°09'23" W 105°13'22"	90
	Chacala II	N 21°10'26" W 105°10'59"	39
	Chacala III	N 21°09'52" W 105°12'07"	96
	Tonino I	N 21°04'05" W 105°12'51"	335
	Tonino II	N 21°02'45" W 105°11'08"	217
	Tonino III	N 21°03'29" W 105°11'08"	80
San Blas	Tecuitata I	N 21°26'50" W 105°09'56"	381
	Tecuitata II	N 21°27'38" W 105°09'19"	382
	Palmas I	N 21°31'50" W 105°10'08"	183
	Palmas II	N 21°32'04" W 105°10'33"	242

University of Nayarit (UAN), where they were stored at 0°C until analysis.

Isolating and purifying microorganisms associated to fruit rots

Fruits presenting symptoms of dry and soft rots were previously washed with tap water, then pieces of 5 to 10 mm² were cut in the transition zone (margin of the lesion of the disease progress) and were disinfected with a 2 % NaClO solution for 3 minutes. In a laminar flow hood (TELSTAR AH-100) previously cut pieces were washed with sterile distilled water (ADE) three times, then dried at room temperature on absorbing paper. Each four pieces were sown in a Petri dish (90 x 15 mm) with Potatoes Dextrose Agar (PDA) medium at equidistant points and then incubated in a NOVATECH Ei45 temperature chamber at 28 °C to obtain phytopathogens fungus (Villanueva *et al.*, 2008).

Fungi that grew after seven days in the culture medium were transferred in a new Petri dish with PDA in order to purify isolates and then were incubated at 22 ± 4 °C, until sporulation, when monosporic cultures were obtained (Guigón & González, 2004).

Morphological identification of microorganisms

For morphological identification, 7 days mycelium samples were extracted by means of sterile dissection needles, were mounted on slides with lactophenol and covered with cover slips for their morphological identification at the level of genus, by means of a compound microscope Leica® (DME 13595XXX model) and with taxonomic and dichotomous keys of Barnett & Hunter (1998) and Watanabe (2002).

Pathogenicity tests and virulence degrees

A conidia suspension was obtained from each isolated fungus genus, placed into a Petri plate with 10 mL of ADE and 5 µL of Tween 80 and mycelium was scraped with a sterile handle, the suspension was then filtered through a sterile gauze pad. Conidia counting was performed by means of a Neubauer-improved counting-chamber (MARIENFELD®) and a compound microscope (Ruiz *et al.*, 2011). Later, apparently healthy soursop fruits were inoculated with each isolated fungus genus in order to reproduce the symptoms from which they were isolated and to discover the causal agent of rot. Apparently healthy

Aislamiento y purificación de microorganismos asociados a las pudriciones en frutos

Los frutos con síntomas de pudrición seca y pudrición blanda de fruto, se lavaron previamente con agua corriente; posteriormente se cortaron trozos de 5 a 10 mm² de la zona de transición (margen de la lesión de avance de la enfermedad) y se desinfectaron con una solución de NaClO al 2 % por tres minutos; en una campana de flujo laminar (TELSTAR AH-100), los trozos obtenidos fueron lavados tres veces con agua destilada estéril (ADE) y se secaron a temperatura ambiente sobre papel absorbente, y se sembraron cuatro en cada caja de Petri (90 x 15 mm) con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) de forma equidistante, mismas que se mantuvieron en incubación en una cámara NOVATECH Ei45 a 28 °C para la obtención de los hongos fitopatógenos (Villanueva *et al.*, 2008).

Los hongos que crecieron a los siete días en el medio de cultivo, fueron transferidos a una caja nueva de Petri con PDA con el fin de purificar los aislamientos y se incubaron a 22 ± 4 °C, hasta su esporulación y se obtuvieron los cultivos monospóricos (Guigón & González, 2004).

Identificación morfológica de microorganismos

Para la identificación morfológica, se tomó una muestra de micelio de 7 días de edad con ayuda de agujas de disección estériles y se realizaron montajes en portaobjetos con lactofenol claro y se cubrieron con cubreobjetos para su identificación morfológica a nivel de género con ayuda de un microscopio compuesto Leica® (modelo DME 13595XXX) y con las claves taxonómicas-dicotómicas de Barnett & Hunter (1998) y Watanabe (2002).

Pruebas de patogenicidad y grados de virulencia

De cada género de hongo aislado se obtuvo una suspensión de conidios, a los cuales, se les agregó a la caja de Petri 10 ml de ADE y 5 µl de Tween 80, se procedió a raspar el micelio con ayuda de un asa estéril y la suspensión obtenida se filtró con ayuda de una gasa estéril. El conteo de conidios se realizó con ayuda de una cámara de recuento Neubauer-improved (MARIENFELD®) y un microscopio compuesto (Ruiz *et al.*, 2011). Posteriormente se inocularon frutos de guanábana aparentemente sanos con el fin de reproducir el síntoma del que fue aislado y descubrir el agente causal de la pudrición. Para ello, se recolectaron frutos con apariencia sana de guanábana de tamaño de 6.21 cm de diámetro por 8.25 cm de longitud hasta un tamaño alrededor de 20 cm de longitud y 15 cm de diámetro para las pudriciones secas, en el caso de las

soursop fruits were sampled with 6.21 cm in diameter and 8.25 cm in length up to around 20 cm in length and 15 cm in diameter for dry rot testing and healthy soursop fruits of 6.5 cm in diameter and 10 cm in length were sampled for soft rot testing. Biological material was placed in a cooler wrapped with a protective plastic and then transferred to the Plant Parasitology Laboratory. Fruits were washed with running water in the cooler and then disinfected by immersion in a 2 % NaClO solution for 2 minutes (Gutiérrez *et al.*, 2002), moisture on fruits was absorbed with sterile gauze pads.

In the laminar flow hood, soursop fruits were inoculated without damage (six replicas and six controls) and with a superficial damage (six replicas and six controls) in epidermis of about 15 mm in length and 5 mm in depth, which was realized by means of a sterile bistoury. Ten μL of conidia suspension, obtained from the sporulation of each isolated fungus genus, were added to each soursop fruit group, by means of a Finnpiette® micropipette. Concentrations of each isolated fungus genus ranged between 11,200 conidia/mL and 1,000,000 conidia/mL. In the case of soft rot isolated fungus genera, inoculation was performed with a 0.5 cc suspension with 11,200 conidia/mL by means of a hypodermic syringe infiltrated in the floral receptacle at a distance of 1 cm away from the peduncle (seven replicas and seven controls). Controls were firstly inoculated with sterile distilled water and fungi isolated from each symptom were later inoculated to avoid crossed contamination. Inoculated soursop fruits were incubated in a bioclimatic chamber (Thermo Scientific) at 28°C and with a 12:12 light/dark photoperiod and were systematically checked every 24h for 10 days to monitor symptomatology and to measure the degree of rot advance (virulence), by means of a digital Vernier (Truper Herramientas S.A de C.V). As a verification, a second isolation of inoculated fungus was performed on inoculated fungus to confirm the identity of the inoculated microorganisms (Dinh *et al.*, 2003; Fraire *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2003; Than *et al.*, 2008).

Molecular identification of rot causing fungi of in soursop fruit

Genomic DNA (gADN) was extracted for molecular identification of fungi that tested positive for pathogenicity. For that, an explant of each purified fungus was placed in a Petri plate with PDA medium and was incubated at 28 °C for 7 days. By means of

puddriciones blandas se recolectaron frutos sanos de 6.5 cm de diámetro y 10 cm de longitud. El material biológico se colocó en una hielera envuelto con plástico protector y se trasladó al Laboratorio de Parasitología Agrícola. Los frutos se lavaron con agua corriente dentro de una hielera, posteriormente se desinfectaron por inmersión en una solución de NaClO al 2 % durante dos minutos (Gutiérrez *et al.*, 2002), la humedad sobre los frutos fue absorbida con sanitas estériles.

En la campana de flujo laminar los frutos de guanábana fueron inoculados sin herida (seis repeticiones y seis testigos) y con una herida superficial (seis repeticiones y seis testigos) en la epidermis de aproximadamente 15 mm de longitud y 5 mm de profundidad, la cual se realizó con ayuda de un bisturí estéril, y con la ayuda de una micropipeta Finnpiette® se les agregó 10 μl de la suspensión de conidios de acuerdo con la esporulación de cada aislado, se usaron concentraciones de cada uno de los géneros en un rango de los 11,200 conidios/mL a 1,000,000 conidios/mL. En el caso de los hongos aislados de pudrición blanda, la inoculación se realizó con una suspensión de 0.5 cc con 11,200 conidios/mL con ayuda de una jeringa hipodérmica que se infiltró en el receptáculo floral a una distancia de 1 cm del pedúnculo (siete repeticiones y 7 testigos). Primero se inocularon los testigos con agua destilada estéril y posteriormente se inocularon los hongos aislados de cada síntoma para evitar contaminación cruzada. Los frutos inoculados se incubaron en una cámara bioclimática (Thermo Scientific) a 28 °C y un fotoperiodo 12:12 luz/oscuridad, se revisaron sistemáticamente cada 24 h por 10 d para registrar la sintomatología y medir el grado de avance de la pudrición (virulencia) con ayuda de un vernier digital (Truper Herramientas S.A de C.V). Para confirmar la identidad del microorganismo inoculado, se realizó un re-aislamiento y se verificó que coincidiera con el que se inoculó (Dinh *et al.*, 2003; Fraire *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2003; Than *et al.*, 2008).

Identificación molecular de hongos causantes de las pudriciones de fruto de guanábana

Para la identificación molecular de los hongos positivos a las pruebas de patogenicidad, se extrajo el DNA genómico (gADN), para lo anterior, se colocó un explante del hongo purificado en cajas de Petri con medio PDA y se incubó a 28 °C por 7 d. Con la ayuda de una espátula estéril se recolectó el micelio, el cual se colocó en un mortero de porcelana estéril con un amortiguador [200 nM Tris-HCl (pH=8), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS] a 70 °C (Ruiz *et al.*, 2017), se maceró y la extracción se realizó de acuerdo con Raeder & Broda (1985). El gADN

a sterile spatula, mycelium was collected and placed in a sterile porcelain mortar with a buffer solution [200 nM Tris-HCl (pH=8), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS] at 70 °C (Ruiz *et al.*, 2017), then soften and the extraction was realized according to Raeder & Broda (1985). gDNA was visualized by electrophoresis in a 1 % agarose gel which was used to amplify rDNA internal transcribed spacers (ITS4 and ITS5), with ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primers (White *et al.*, 1990; Ruiz *et al.*, 2017). Amplification was performed according to the following conditions: an initial step of denaturalization at 94 °C for 5 minutes, 30 cycles of denaturalization at 94 °C for 30 s, alignment at 60 °C for 30 s, extension at 72 °C for 10 minutes (Ruiz *et al.*, 2017). Amplification was visualized by electrophoresis in a 1 % agarose gel (Ochoa *et al.*, 2012). PCR products were later sequenced by MacroGen Company (Rockville, Maryland, EUA). Resulting sequences were compared with those reported in NCBI GenBank database (National Center for Biotechnology Information, 2018) by means of BLAST software (Altschu *et al.*, 1990) to check the identity percentage corresponding to the identified species.

Results and Discussion

Description of rot symptoms in soursop fruits in orchards

Symptoms of dry and soft rots were found to present irregularly, independent or associated distributions in orchards. However, soursop fruits with soft rot can be found at different size (from 6 cm in diameter and 8 cm in length), rots appear at any place of fruits epidermis, with slightly sunken stains of 2 to 3 cm in diameter, which can develop independently or join together to make up rots up to 10 cm with colors ranging from brown to black (Figure 1a). Symptom can include up to 10 mm, but when associated to *B. cubensis*, depth varies according to the position of the seed from where the adult pest emerged (Figure 1b), in some occasions acervuli were observed on the necrotic area. Fruits were able to reach maturity in an irregular way despite the rot. In the case of soft rot of soursop fruits, symptoms appear initially in the floral receptacle, and later moves to the pulp and skin of the fruit. In an advanced state of rot, the skin turns into a brown color and the floral receptacle begin to show an in intense black color (Figure 1c), the fruits are

fue visualizado por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % y se utilizó para amplificar el espaciador transcrito interno (ITS4 e ITS5) del rDNA los cebadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990; Ruiz *et al.*, 2017). Para la amplificación, se emplearon las siguientes condiciones, una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 60 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 10 min (Ruiz *et al.*, 2017). La amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1 % mediante electroforesis (Ochoa *et al.*, 2012). Posteriormente, los productos de PCR fueron secuenciados por la empresa MacroGen (Rockville, Maryland, EUA). Las secuencias resultantes, se compararon con las reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2018) mediante el programa BLAST (Altschu *et al.*, 1990) para verificar el porcentaje de identidad correspondiente a las especies identificadas.

Resultados y Discusión

Descripción de síntomas de pudriciones de fruto en campo

Los síntomas de pudriciones secas y blandas se encuentran en las huertas distribuidas de manera irregular, independientes o asociadas. Sin embargo, los frutos con pudriciones secas se pueden encontrar en diferente tamaño (a partir de 6 cm de diámetro y 8 cm de longitud), las pudriciones aparecen en cualquier parte de la epidermis de los frutos, como manchas ligeramente hundidas de 2 a 3 mm de diámetro que pueden desarrollarse de manera independiente o unirse para formar pudriciones de hasta 10 cm de un color marrón a negro (Figura 1a). El síntoma puede abarcar hasta 10 mm, pero cuando se asocia a *B. cubensis* la profundidad varía en función a la posición de la semilla de donde emerge el adulto de la plaga (Figura 1b), en algunas ocasiones se pueden observar acérvulos sobre el necrosamiento. Los frutos logran madurar de manera irregular a pesar de la pudrición. En el caso de las pudriciones blandas de fruto, los síntomas aparecen inicialmente en el receptáculo floral, posteriormente la pudrición avanza a la pulpa y a la cáscara del fruto, en un estado avanzado de pudrición, la cáscara se torna de color café y la pulpa y receptáculo floral se comienzan a teñir de un color negro intenso (Figura 1c), los frutos se momifican y no logran llegar a su madurez fisiológica y se quedan adheridos al árbol, lo que se confunde en la mayoría de los casos con un aborto de fruto. Muchos de los frutos momificados presentan acérvulo por parte de *Colletotrichum* sp.

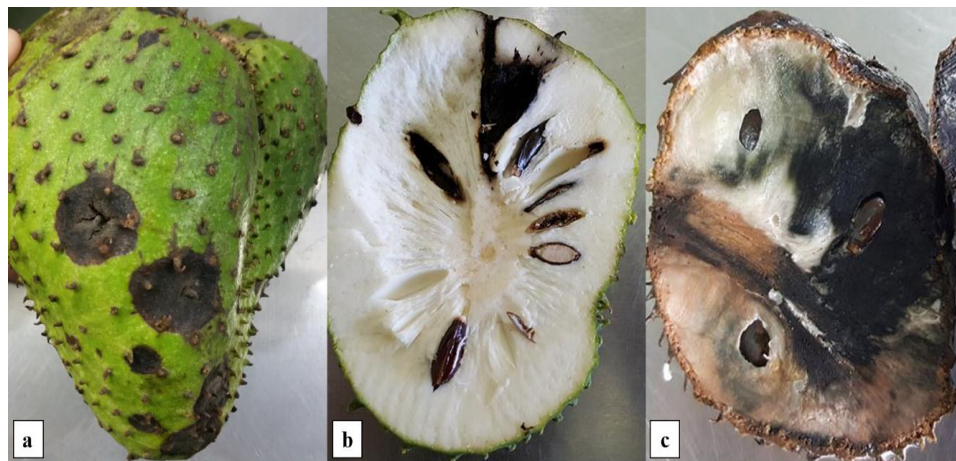


Figure 1. Soursop fruits collected in the field with symptoms of rot: a) Dry rot, b) Rot associated with *Bephratelloides cubensis*, c) Soft rot of fruit.

Figura 1. Frutas de guanábana recolectados en campo con síntomas de pudrición: a) Pudrición seca, b) Pudrición asociada con *Bephratelloides cubensis*, c) Pudrición blanda de fruto.

mummified and fail to reach physiological maturity and remain attached to the tree which is confused in most cases with fruit abortion. Many mummified fruits present acervuli for *Colletotrichum* sp.

Isolation and morphological identification of fungi associated to soursop fruit rot

Of the soursop fruits with dry rot symptoms, fungi of the *Lasiodiplodia* sp. genus were isolated and morphologically identified with 25.53 % of incidence (4 isolates), *Colletotrichum* sp. with 41.18 % (7 isolates), *Pestalotiopsis* sp. with 1.76 % (2 isolates), *Fusarium* sp. with 5.88 % (1 isolate) and *Cladosporium* sp. with 17.65 % (3 isolates), while in soursop fruits with soft rot symptoms, fungi of the *Rhizopus* sp. genus were isolated with 16.67 % of incidence (3 isolated), *Penicillium* sp. with 11.11 % (2 isolates), *Aspergillus* sp. with 33.33 % (6 isolates), *Fusarium* sp. with 5.56 % (1 isolate) and *Lasiodiplodia* sp. with 33.33 % (6 isolates).

Pathogenicity tests

Of the 5 fungi genera isolated from dry rot symptoms, only *Pestalotiopsis* sp. y *Colletotrichum* sp. resulted positive in pathogenicity tests. *Pestalotiopsis* sp. was 100 % pathogenic with damage and 0 % without damage, the virulence reached in 7 days after inoculation (DAI) was of 3.91 mm, indicating that this fungus only

Aislamiento e identificación morfológica de hongos asociados a pudriciones de frutos de guanábana

De los frutos de guanábana con sintomatología de pudrición seca, se aislaron e identificaron morfológicamente a los hongos del género *Lasiodiplodia* sp. con 23.53 % de aparición (4 aislados), *Colletotrichum* sp. 41.18 % (7 aislados), *Pestalotiopsis* sp. 11.76 % (2 aislados), *Fusarium* sp. 5.88 % (1 aislado) y *Cladosporium* sp. 17.65 % (3 aislados). Mientras que, en frutos con pudrición blanda se aisló a los hongos *Rhizopus* sp. con 16.67 % de aparición (3 aislados), *Penicillium* sp. 11.11 % (2 aislados), *Aspergillus* sp. 33.33 % (6 aislados), *Fusarium* sp. 5.56 (1 aislado) y *Lasiodiplodia* sp. 33.33 % (6 aislados).

Pruebas de patogenicidad

De los cinco géneros de hongos aislados de los síntomas de pudrición seca, sólo *Pestalotiopsis* sp. y *Colletotrichum* sp. resultaron positivos a las pruebas de patogenicidad. El hongo *Pestalotiopsis* sp. fue 100 % patogénico con herida y 0 % sin herida, la virulencia que alcanzó en 7 días después de la inoculación (DAI) fue de 3.91 mm, lo que indicó que el hongo sólo causa la enfermedad con daño mecánico y aunque no resultó tan agresivo, la enfermedad puede ser causa de pérdida postcosecha de frutos. En el caso de *Colletotrichum* sp., fue 100 % patogénico con herida y 83 % sin herida, la virulencia que alcanzó en el décimo DAI fue de 7.36 mm y 3.69 mm respectivamente. Por otra parte, de los cinco géneros aislados de los síntomas de pudrición blanda,

causes a rot with mechanical damage and although it did not result so aggressive, the rot could be the cause of fruit post-harvesting losses. In the case of *Colletotrichum* sp. it was 100 % pathogenic with damage and 83 % without damage, the virulence reached on the tenth DAI was of 7.36 mm and 3.69 mm, respectively. On the other hand, of the five isolated genera of soft rot symptoms, only *Lasiodiplodia* sp. fungus genus causes rot in 100 % of the inoculated fruits. Virulence reached in 6 DAI was of 9.6 cm, indicating a very aggressive rot.

Symptoms generated by *Pestalotiopsis* sp. appeared at the second DAI, the lesion was only superficial and

sólo el hongo *Lasiodiplodia* sp. causó pudrición en 100 % de los frutos inoculados. La virulencia que alcanzó en 6 DAI fue de 9.6 cm, lo que indicó que es demasiado agresivo.

Los síntomas generados por *Pestalotiopsis* sp. aparecieron al segundo DAI, la lesión únicamente fue superficial y presentó coloraciones negruzcas, con tonos café rojizos, una consistencia dura y ausencia de micelio, correspondiente a síntomas por pudrición seca (Figura 2).

Los síntomas generados por el hongo *Colletotrichum* sp. en las repeticiones sin herida aparecieron al cuarto DAI, la lesión sólo fue superficial con una consistencia seca; para las repeticiones con herida, los síntomas se mostraron al segundo DAI, donde el avance de la

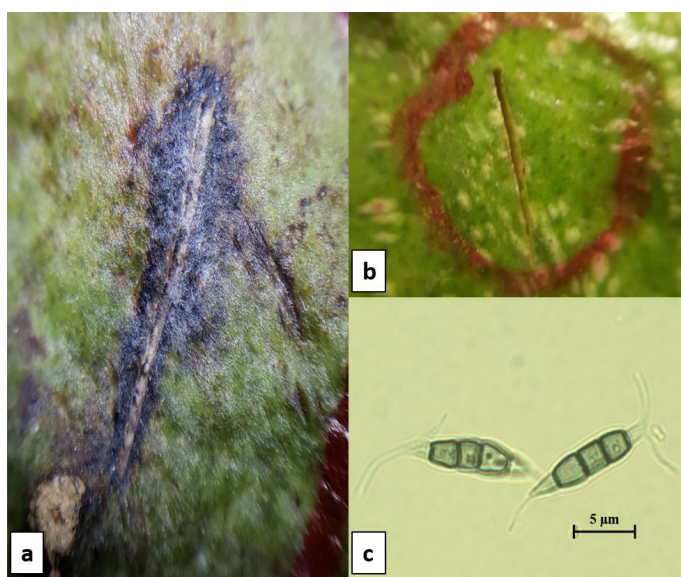


Figure 2. a) Symptoms of dry rot by *Pestalotiopsis* sp., b) Control soursop fruit, c) Conidia of *Pestalotiopsis* sp.

Figura 2. a) Síntomas de pudrición seca por *Pestalotiopsis* sp., b) Fruto de guanábana testigo, c) Conidios de *Pestalotiopsis* sp.

presented blackish colorations, with brown-reddish tones, a hard consistency and absence of mycelium, corresponding to dry rot symptoms (Figure 2).

Symptoms generated by *Colletotrichum* sp. fungus in the replicas without damage appeared at the fourth DAI, the lesion was only superficial with a dry consistency; for replicas with damage, symptoms appeared at the second

pudrición también fue en la pulpa, las lesiones se tomaron de un color café intenso, con una consistencia dura y seca, con una apariencia necrótica y no hubo presencia de micelio por parte del patógeno (Figura 3).

Los síntomas generados por *Lasiodiplodia* sp., aparecieron al tercer DAI, desde la base del receptáculo floral se notó un reblandecimiento en la zona, y para el día seis, el fruto se

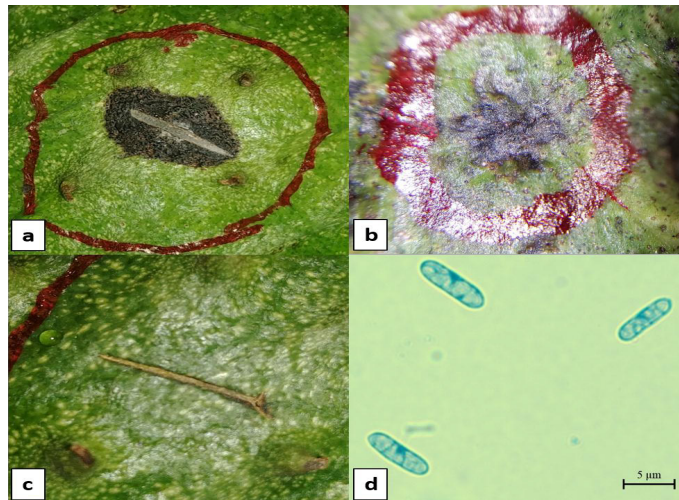


Figure 3. a) Symptom of dry damaged by *Colletotrichum* sp., b) Symptom of dry rot without damage, c) Control soursop fruit, d) Conidia corresponding to *Colletotrichum* sp.

Figura 3. a) Síntoma de podredumbre seca con herida por *Colletotrichum* sp. b) Síntoma de podredumbre seca sin herida, c) Fruto de guanábana testigo. d) Conidios correspondiente a *Colletotrichum* sp.

DAI, where the advance of the rot was also observed in the pulp, lesions became of intense brown color, with a hard and dry consistency and a necrotic appearance and there were no presence of mycelium of the pathogen (Figure 3).

Symptoms generated by *Lasiodiplodia* sp., appeared at the third DAI, a softening was observed in the area at the base

puso blando totalmente y aparecieron manchas café claro por todo el pericarpio, en el día nueve la cascara se momificó totalmente y tomó un color café intenso, para el día 10, la pulpa del fruto era blanda y comenzó a tomar un color negro (Figura 4).

Con base a este resultado se confirma por primera vez en México a *C. gloeosporioides* como el agente responsable

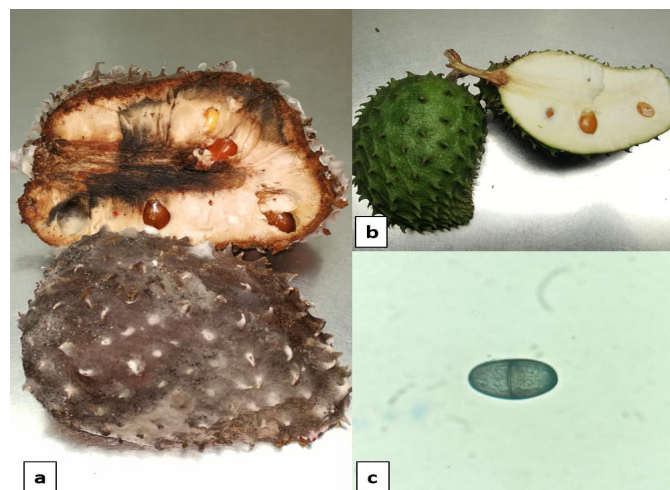


Figure 4. a) Symptoms of soft rot by *Lasiodiplodia* sp., b) Control soursop fruit, c) Conidium of *Lasiodiplodia* sp.

Figura 4. a) Síntomas de pudrición blanda por *Lasiodiplodia* sp., b) Fruto de guanábana testigo, c) Conidio de *Lasiodiplodia* sp.

of the floral receptacle. On day 6, fruit was totally soft and light brown stains appeared on all the pericarp. On day 9, skin was totally mummified and darkened into an intense brown color. On day 10, the pulp of the fruit softened and started to darken (Figure 4).

According to these results, *C. gloeosporioides* was confirmed for the first time in México to be the agent responsible for dry rot in soursop fruit in Nayarit. This coincides with results reported by Alberto & Otones (2016), who mentioned that *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* and *F. clamydosporum* are pathogenic in mature soursop fruits in Philippines. On the other hand, Andrades *et al.* (2009) associated *Colletotrichum* spp. With anthracnosis in soursop fruits in Venezuela, while Hernández *et al.* (2013) associated to *C. gloeosporioides* in *A. muricata* fruits in the state of Nayarit, Mexico. This fungus is also considered as the anthracnosis causing pathogen in avocado fruit (*Persea americana* Mill.) in the state of Michoacan, Mexico (Morales *et al.*, 2009). Regarding *Pestalotiopsis* sp. fungus, it was not highly virulent; however, it was pathogenic by causing a light dry rot and it is the first time this microorganism is reported as responsible for damages in soursop fruits in Nayarit, Mexico. Montiel (1997) registered *Pestalotiopsis* sp. as the causal agent of necrosis in guava fruits (*Psidium guajava* L.) in Venezuela.

In Nayarit, Hernández *et al.* (2013) *L. theobromae* was identified as the responsible for soft rot in soursop fruits, however, in this research *L. pseudotheobromae* was found to be the causal agent of soft rot in soursop fruits and that represents the first record for Nayarit, Mexico. Nweke & Ibiam (2012) indicate this rot in soursop fruit is due to *C. gloeosporioides* and *R. stolonifer* in Nigeria; while Sandoval *et al.* (2013) reported *L. pseudotheobromae* as the responsible for the death of descendant branches and was associated to rot in mango peduncle (*Mangifera indica* L.), raised in Pacific coast of Mexico. Moreover, Awan & Akgül (2016) determined that *L. pseudotheobromae* is a highly virulent post-harvesting pathogen in lemon (*Citrus limon* L. Burm. f.) by damaging around 40 to 50 % of the area of the fruit, at 5 dai in Turkey.

According to these pathogenicity results, fungi from *Lasiodiplodia* sp., *Fusarium* sp. and *Cladosporium* sp. genera were determined to be associated with dry rot in soursop fruit, while *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp. *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp. are associated to soft rot in soursop fruit.

de la pudrición seca de fruto de guanábana en Nayarit. Esto coincide con lo reportado por Alberto & Otones (2016), quienes mencionaron que *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *F. clamydosporum* son patógenos a frutos maduros de guanábana en Filipinas. Por otra parte, Andrades *et al.*, (2009) asociaron a *Colletotrichum* spp. con la antracnosis en frutos de guanábana en Venezuela, mientras que Hernández *et al.* (2013) asociaron a *C. gloeosporioides* en frutos de *A. muricata* en el estado de Nayarit, México. Este hongo, también es considerado como patógeno causante de antracnosis de fruto de aguacate (*Persea americana* Mill.) en el estado de Michoacán, México (Morales *et al.*, 2009). En lo que respecta al hongo *Pestalotiopsis* sp., no fue altamente virulento, sin embargo, fue patógeno al causar una ligera pudrición seca, y es la primera vez que se reporta a este microorganismo como responsable de daños en frutos de guanábana en Nayarit, México. Montiel (1997) registró a *Pestalotiopsis* sp. como agente causal de la necrosis de fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.) en Venezuela.

En Nayarit, Hernández *et al.*, (2013) asociaron a *L. theobromae* como responsable de la pudrición blanda de fruto de guanábana, sin embargo, en esta investigación se encontró a *L. pseudotheobromae* como el agente causal de la pudrición blanda de fruto, y es el primer registro para Nayarit, México. Nweke & Ibiam (2012) indicaron que esta pudrición en guanábana es causada por *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer* en Nigeria; mientras que Sandoval *et al.* (2013) mencionaron que *L. pseudotheobromae* es el responsable de la muerte descendente de ramas y se asocia a la pudrición de pedúnculo de mango (*Mangifera indica* L.) cultivados en la Costa del Pacífico en México. Por otra parte, Awan & Akgül (2016) determinaron que *L. pseudotheobromae* es un patógeno postcosecha altamente virulento en limón (*Citrus limon* L. Burm. f.) al dañar aproximadamente del 40 al 50 % del área de la fruta después de 5 días de inoculación en Turquía.

Con base a los resultados de patogenicidad se determina que los hongos de los géneros *Lasiodiplodia* sp., *Fusarium* sp. y *Cladosporium* sp. sólo están asociados con la pudrición seca de fruto, mientras que *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp. *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. están asociados a la pudrición blanda de fruto de guanábana.

Identificación molecular de los agentes causales de la pudrición de fruto de guanábana

Con base a los caracteres moleculares de los hongos causantes de las pudriciones de frutos de guanábana, se identificaron a *Pestalotiopsis* sp. con un

Molecular identification of causal agents of rot in soursop fruit

Regarding molecular traits of rot causing fungi in soursop fruits, *Pestalotiopsis* sp. was identified with 99 % of identity with Cef-S6 strain (Accession Number KX960814.1), *Colletotrichum gloeosporioides* with 99 % of identity with Bpf-2 strain (Accession Number KX960784.1) and *Lasiodiplodia pseudotheobromae* with 99 % of identity with CEF-9 strain (Accession Number MH062942.1) (NCBI, 2018).

Conclusion

Pestalotiopsis sp. and *Colletotrichum gloeosporioides* fungi are causal agents of dry rot in soursop fruits, while *Lasiodiplodia pseudotheobromae* is the causal agent of soft rot in soursop fruit and is moreover associated to dry rot. Besides, *L. pseudotheobromae*, *Fusarium* sp. and *Cladosporium* sp. were determined to be secondary dry rot-associated pathogens, while *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp. were identified as saprophytic fungi in soft rot in soursop fruits. In the current work, *Pestalotiopsis* sp. and *Colletotrichum gloeosporioides* were recorded for the first time as causal agents of dry rot and *L. pseudotheobromae* as causal agent of soft rot in soursop fruits of *A. muricata* in Mexico.

Acknowledgements

To the National Council of Science and Technology (CONACyT) and to the project number 266891 funded by the "Sectoral Fund of Research in Agriculture, Livestock Activity, Aquaculture, Agrotechnology and Phylogenetic Resources".

References

- Agrios, G. (1998). *Fitopatología, Tercera edición México*. Editorial Limusa.
- Alberto, R. T. & Otanes A. T. (2016). Morphological and molecular identification and fungicide sensitivity assay of pathogens attacking guayabano (*Annona muricata*) in Philippines. *Plant Pathology & Quarantine*, 6(1): 60-79. <https://doi.org/10.5943/ppq/6/1/9>
- Altschul, S. F., Gish, W. W., Miller, E., Myers, W. and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3): 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Andrades, I., Yender, F., Labarca, J., Ulacio, D., Paredes, C. and Marín, Y. (2009). Evaluación de la antracnosis (*Colletotrichum* sp.) en guanábana (*Annona muricata* L.) tipo Gigante en el sector Moralito del estado de Zulia, Venezuela. *Revista UDO Agrícola*, 9(1): 148-157. <http://www.bioline.org.br/pdf/cg09021>
- Awan, Q. N. & Akgül, D. S. (2016). First Report of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* Causing Postharvest Fruit Rot of Lemon

99 % de identidad con la cepa Cef-S6 (clave de acceso KX960814.1), *Colletotrichum gloeosporioides* con 99 % de identidad con la cepa Bpf-2 (clave de acceso KX960784.1) y *Lasiodiplodia pseudotheobromae* con 99 % de identidad con la cepa CEF-9 (clave de acceso MH062942.1) (NCBI, 2018).

Conclusión

Los hongos *Pestalotiopsis* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides* son los agentes causales de la pudrición seca en frutos de guanábana, mientras que, *Lasiodiplodia pseudotheobromae* es el agente causal de la pudrición blanda de fruto y se le asocia además a la pudrición seca. Por otro lado, se determinó que los hongos *L. pseudotheobromae*, *Fusarium* sp. y *Cladosporium* sp. son patógenos secundarios asociados con la pudrición seca de frutos, mientras que *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. son hongos saprófitos en la pudrición blanda de fruto de guanábana. En este trabajo, se registra por primera vez a *Pestalotiopsis* sp. y a *Colletotrichum gloeosporioides* como agentes causales de la pudrición seca y a *L. pseudotheobromae* como el agente causal de la pudrición blanda de fruto de *A. muricata* en México.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Proyecto apoyado por el "Fondo Sectorial de Investigación en Materia Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agrobiotecnología y Recursos Filogenéticos". Núm. 266891.

- in Turkey. *Plant Disease* 100(11): 2327. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0512-PDN>
- Baraona, C. M. & Sancho, B. E. (1992). *Guanábana y macadamia (Fruticultura especial, 5)*. Costa Rica. Editorial Universidad Estatal a Distancia. https://books.google.com.mx/books?id=w4OPT7mFaA0C&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Barnett, H. L. & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. St. Paul, Minnesota, USA. The American Phytopathological Society.
- Camero, A. C., Rodríguez, P. M., Camero, C. J., Alhagie, K. C. and Camero, N. K. (2017). *Euphoria leucographa* (Gory & Percheron, 1833) (Coleoptera: Melolonthidae) en frutos de guanábana (*Annona muricata* L.) en Nayarit, México. *Revista gaditana de Entomología*, 8(1): 223-227. <https://www.biotaxa.org/RGDE/article/view/33921/30032>
- Coto, D. & Saunders, J. L. (2001). Insectos plaga de la guanábana (*Annona muricata*) en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 61: 60-68. <http://www.sidalc.net/repdoc/A2131e/A2131e.pdf>
- Dinh, Q., Chongwungse, J., Pongam, P. and Sangchote, S. (2003). Fruit infection by *Colletotrichum gloeosporioides* and anthracnose resistance of some mango cultivars in Thailand. *Australasian Plant Pathology*, 32: 533-538. <https://doi.org/10.1071/ap03053>
- Fraire, C. M., Yáñez, M. M. and Nieto, Á. D. (2003). Hongos patógenos en fruto de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3): 288-291. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221307>
- Guigón, L. C. & González, G. P. A. (2004). Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagonica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(1): 117-124. <http://www.redalyc.org/pdf/612/61222115.pdf>
- Gutiérrez, A. O., Nieto, Á. D. and Gutiérrez, A. J. (2002). Características morfológicas, culturales y patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 20(1): 24-30. <http://www.redalyc.org/html/612/61220105/>
- Hernández, F. L. M., R. Gómez J. and J. Andrés A. (2013). *Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano*. Libro Técnico Núm. 1. Campo Experimental Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. http://infapcirpac.gob.mx/publicaciones_nuevas/Importancia.%20plagas%20insectiles%20y%20enfermedades%20fungosas%20del%20cultivo%20del%20Guanabano.pdf
- Jiménez, Z. J., Balois, M. R., Alia, T. I., Juárez, L. P., Sumaya, M. M. and Bello, L. J. (2016). Caracterización de frutos de guanábana (*Annona muricata* L.) en Tepic, Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(6): 1261-1270. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i6.175>
- Montiel, C. A. (1997). *Pestalotiopsis psidii* (Pat.) Mordue causante de necrosis de frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) en plantaciones de los municipios Baralt y Mara del estado Zulia. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, 14: 341-347. http://www.revfacagronluz.org.ve/v14_3/v143z006.html
- Morales, G. J., Azpíroz, R. H. and Pedraza, S. M. (2009). Caracterización cultural, morfológica, patogénica e isoenzimática de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., causante de la antracnosis del aguacate (*Persea americana* Mill.) en Michoacán, México. *Revista Científica UDO Agrícola* 9(4): 848-856. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3394147>
- Muñoz, C., Gómez, L. and Umaña, G. (2003). Caracterización morfológica y bioquímica de aislamientos de *Colletotrichum* spp. y su patogenicidad en mango (*Mangifera indica* L.). *Tecnología en Marcha*, 16(1): 55-65. http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/1456/1339
- NCBI. (National Center for Biotechnology Information). (2018). Gen Bank. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Last checked: june 20th 2018.
- Nweke, C. N. & Ibiam, O. F. (2012). Pre and post-harvest fungi associated with the soft rot of the fruit of *Annona muricata*, and their effects on the nutrient content of the pulp. *American journal of Food and Nutrition Journals*, 2(4): 78-85. <https://www.scribd.org/AJFN/PDF/2012/4/AJFN-2-4-78-85.pdf>
- Ochoa, F. Y. M., Cerna, C. E., Gallegos, M. G., Landeros, F. J., Delgado, O. J. C., Hernández, C. S., Rodríguez, G. R. and Olalde, P. V. (2012). Identificación de especies de *Fusarium* en semilla de ajo en Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Micología*, 36: 27-31. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v36/v36a5.pdf>
- Okigbo, R. & Obire, O. (2009). Mycoflora and production of wine from fruits of soursop (*Annona muricata* L.). *International*

- Journal of Wine Research*, 1: 1-9. <http://doi.org/10.2147/IJWR.S4667>
- Raeder, U. & Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1: 17–20. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.1985.tb01479.x>
- Ruiz, C. M., Rios, V. C., Berlanga, R. D., Ornelas, P. J., Acosta, M. C., Romo, C. A., Zamudio, F. P. and Pérez, C. D. (2017). Incidencia y agentes causales de enfermedades de raíz y sus antagonistas en manzanos de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(3): 437-462. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1704-3>
- Ruiz, S. E., Chan, C. W., Pérez, G. A., Cristobal, A. J., Uch, V. B., Tun, S. J. and Munguía, R. R. (2011). Crecimiento, esporulación y germinación *in vitro* de cinco cepas de *Metarhizium* y su virulencia en huevos y ninfas de *Bemisia tabaci*. *Revista Mexicana de Micología* 33: 9-15. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v33/v33a3.pdf>
- Sandoval, S. M., Nieto, Á. D., Sandoval, I. S., Téliz, O. D., Orozco, S. M. and Silva, R. V. (2013). Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Manguijera indica* L.). *Agrociencia*, 47(1): 61-73. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v47n1/v47n1a6.pdf>
- SIAP. (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2017). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. <http://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> Last checked: june 15th 2018.
- Than, P. P., Jeewon, R., Hyde, K. D., Pongsupasamit, S., Mongkolporn, O. and Taylor, P. W. (2008). Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. *Plant Pathology*, 57: 562-572. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01782.x>
- Villanueva, A. R., Yáñez, M. M. and Hernández, A. A. (2008). Especies de *Colletotrichum* en Chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Agrociencia*, 42: 689-701. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v42n6/v42n6a9.pdf>
- Watanabe, T. (2002). *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. Second edition.* Whashington, D.C. USA. CRC PRES, New York.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Press, A. (Ed.), *PCR protocols: A guide to methods and applications*. 315–322 pp. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>