

## Estudio de la Antracnosis en Guanábana (*Annona muricata* L.) II. Efecto en la Morfología de los Tallos<sup>1</sup>

J. Subiros\*, E. Flores\*\*, E. Vargas\*\*\*

### ABSTRACT

Healthy seedlings of soursop (*Annona muricata* L.) 25 to 30 cm long were locally inoculated with a suspension of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. conidia. Samples of the inoculated and healthy young stems were taken at various time intervals. The epidermis showed the first signs of cell collapse 48 hours after inoculation, followed by folding and rupture of the anticlinal and periclinal cell walls, respectively. Sixty hours later, small lesions were observed; the epidermis, phellogen and cortical parenchyma were the tissues that suffered the greatest damage. The lesions were fully developed fifty days after inoculation. Detachment of the external layers of tissue was observed, as well as an abnormal cell division between the affected sections and the apparently healthy ones. It is suggested that penetration in intact epidermal cells might occur by the enzymatic action of the fungus; this penetration can also take place via lenticles, in which case greater damage occurs. Fungus infection was also detected at the node level, resulting in a total necrosis of the apex and foliar primordia on the axillary buds. *Colletotrichum gloeosporioides* reached the vascular tissues through the foliar trace when this type of infection took place.

### INTRODUCCION

El cultivo de la guanábana (*Annona muricata*) adquiere cada día más importancia por los varios usos que se le puede dar a la fruta, tanto para su consumo fresco como para su industrialización. La fruta es rica en vitaminas y minerales y tiene un sabor muy agradable (4, 6, 19, 26).

La antracnosis, cuyo agente causal es *Colletotrichum gloeosporioides* de la clase Deuteromycetes y el estado teleomórfico *Glomerella cingulata*, produce

<sup>1</sup> Recibido para publicación el 11 de enero de 1987.

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

\* Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. Dirección actual: Azucarera El Viejo, Departamento de Investigación y Agronomía, Apartado 2571-1000, San José, Costa Rica.

\*\* Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica.

\*\*\* Escuela de Fitotecnia, Universidad de Costa Rica.

### COMPENDIO

Se tomaron plantas sanas de guanábana de 25 a 30 cm de longitud y se inocularon en forma localizada con una suspensión de conidios de *Colletotrichum gloeosporioides*. Se colectaron muestras de los tallos inoculados y secciones sanas, a diferentes intervalos de tiempo. Cuarenta y ocho horas después de la inoculación, la epidermis mostró evidencias de un colapso celular, doblamiento de paredes anticlinales y rupturas en la pared externa. A las 60 horas se observaron pequeñas lesiones; las células epidérmicas, el felógeno y el parénquima cortical fueron los tejidos que sufrieron mayor daño. Se sugiere que la penetración puede ocurrir por la acción enzimática del hongo en la epidermis y por vía lenticular, en este último caso, produciendo gran alteración en el desarrollo de la lenticela. A los 50 días, la lesión se desarrolló por completo. Se produjeron divisiones celulares anómalas que separaron las porciones enfermas de las aparentemente sanas, con desprendimiento de tejido en las zonas externas. El patógeno alcanzó el cilindro central a través de la traza foliar. Cuando la infección se inició en los nudos, el ápice y los primordios foliares de las yemas axilares sufrieron una necrosis total.

daños muy severos en los tallos, especialmente en zonas de alta precipitación y humedad constituyendo un factor limitante para el aprovechamiento de la fruta (2, 22, 23).

La fruta es susceptible a la infección, especialmente en las zonas de crecimiento (2, 4, 19, 23, 27, 33). En los tallos, la enfermedad se inicia con pequeñas manchas necróticas en las ramas jóvenes y con lesiones tipo chancro en las ramas más viejas. Estas se originan, con frecuencia, en las axilas; avanzan progresivamente, causando luego el marchitamiento y muerte de la rama. También, el patógeno puede pasar al cilindro vascular a través de los peciolos, provocando la muerte descendente (2, 3, 18, 22, 24, 26, 29, 33).

El presente estudio describe las alteraciones morfológicas que el patógeno causa al efectuar inoculaciones artificiales en tallos jóvenes de guanábana.

### MATERIALES Y METODOS

Se inocularon tallos jóvenes de guanábana con gotas de una suspensión de conidios de *Colletotrichum*

*gloeosporioides* utilizando un asa con el cuidado de no provocar heridas. Los conidios utilizados procedían de aislamientos de lesiones de tallos de guanábana y se cultivaron en un medio nutritivo de papa, dextrosa y agar en platos de petri; a los 15 días de edad, se removieron con agua destilada y se concentraron por centrifugación. En el lugar donde se aplicaron las esporas, se colocó una cobertura de algodón y papel de filtro humedecido con agua destilada que se sostuvo con piezas de cinta plástica; los bordes se sellaron con cinta adhesiva para favorecer la germinación de las esporas. El ensayo se realizó durante los meses de agosto, setiembre y octubre de 1982 bajo condiciones de invernadero. La temperatura y humedad relativa promedio mensual, durante esos meses, fue de 20° C, 20° C, 19° C y 90, 93 y 94%, respectivamente.

Cada ocho horas se colectaron muestras inoculadas y sanas hasta completar 24 horas; cada 12 horas hasta completar 48 horas y cada 24 horas hasta completar cinco, siete, nueve y ochenta días.

El material para microscopía de luz fue fijado en FAA (16) y/o glutaraldehído (18); luego, se lavó con agua destilada, se deshidrató por medio de una serie de alcohol butílico terciario (15) y se infiltró en parafina. Se practicaron cortes seriados transversales y longitudinales, entre 20 y 25  $\mu\text{m}$ . Más tarde, el material se tiñó usando la técnica de Sharman (32) para su observación al microscopio de luz.

El material para microscopía electrónica de barrido se fijó en glutaraldehído al 4% en buffer de fosfatos a pH 7.0. Posteriormente, se lavó en solución buffer, se deshidrató por medio de una serie de alcoholes y acetato de amilo. Las muestras secadas con  $\text{CO}_2$  se cubrieron con oro y se examinaron al microscopio electrónico de barrido.

## RESULTADOS

### Tallos sanos con crecimiento primario

El tallo joven es pubescente, los tricomas en su mayoría son bicelulares, con sustancias oscuras, de apariencia fenólica en el extremo distal. La pubescencia desaparece al iniciarse el crecimiento secundario. Estructuralmente, el tallo consta de una epidermis de células redondeadas, parénquima cortical con células secretoras, distribuidas en forma irregular y una médula parenquimática. Con frecuencia, esta última presenta células pétreas, con gran cantidad de puntuaciones simples. El tejido vascular primario forma una eustela (Fig. 1). Se hicieron inoculaciones en este estado de desarrollo pero fue difícil reproducir los

sintomas de la lesión. Por tal razón, se seleccionaron porciones jóvenes con inicios de desarrollo secundario.

### Tallos sanos con crecimiento secundario

El crecimiento secundario se inicia mediante la rediferenciación del parénquima de las áreas interfasciculares y del procambium en los haces vasculares, formando un anillo continuo de cambium que da origen a la madera y al floema secundario. Externamente, en este estado de desarrollo, el tallo conserva aún su coloración verde, la pubescencia se pierde y las lenticelas se encuentran en estado avanzado de desarrollo.

Los tallos maduros constan de una peridermis de aproximadamente siete células de grosor y de lenticelas horizontales. Los miembros de los tubos cribosos del floema están rodeados por fibras y es típica la presencia de rayos dilatados. En el xilema, los elementos de los vasos pueden ser solitarios o múltiples, a veces en grupo de cuatro; las fibras xilicas son fusiformes. El xilema presenta poca cantidad de parénquima axial; es del tipo apotraqueal, distribuido en banda delgada; también se observa poco parénquima paratraqueal (Fig. 2). Los elementos de los vasos poseen placas de perforación simple, con inclinación de la pared terminal. Las puntuaciones rebordadas son alternas en las paredes laterales. Los rayos son multiseriados, heterocelulares y heterogéneos. Muchas veces, estos rayos se encuentran divididos por el crecimiento intrusivo de las fibras. Ocasionalmente, se presentan cristales romboidales en las células de parénquima.

En el parénquima cortical, los rayos vasculares y la médula presentan, a veces, células con contenidos oscuros de apariencia fenólica.

### Germinación de las esporas y efecto del hongo en el tallo

La mayoría de las esporas germinaron entre las 24 y 36 horas después de la inoculación. Durante las primeras 36 horas no se observó ninguna alteración anatómica significativa; bajo el microscopio de disección se constataron pequeñas lesiones que eran imperceptibles a simple vista. A las 48 horas se notó en la epidermis un amplio colapso de las células y un doblamiento de las paredes anticlinales de las células subepidérmicas, lo mismo que un oscurecimiento general de las paredes celulares en los lugares afectados (Fig. 3). La pared externa de la epidermis puede romperse y levantarse. En tallos con crecimiento secundario, las lenticelas adquieren una coloración oscura negro rojiza; algunas células de parénquima del

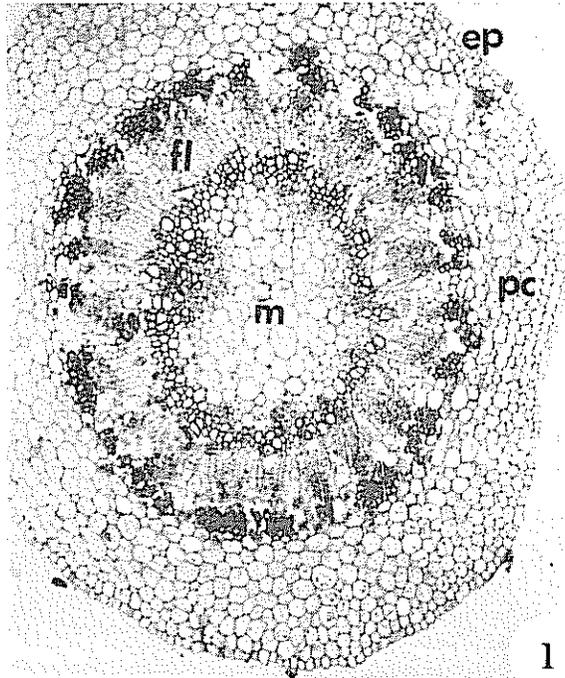


Fig 1. Sección transversal de tallo en los primeros estados de desarrollo (39 X), ep: epidermis, pc: parénquima cortical, fl: floema, X: xilema, m: médula

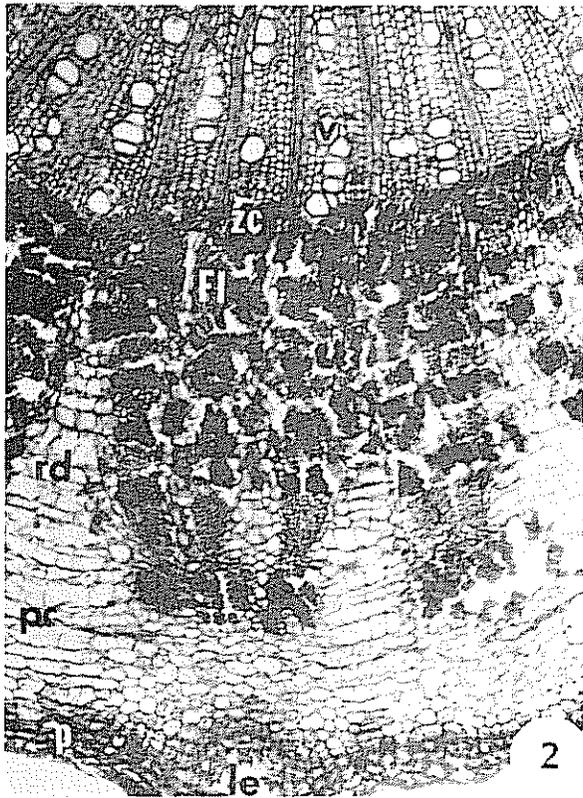


Fig 2. Sección transversal de tallo en crecimiento secundario (39X) P: peridermis, le: lenticela, pc: parénquima cortical, f: fibras, rd: rayos dilatados, fl: floema, ze: zona cambial, X: xilema, V: elementos de los vasos.

tejido de relleno se colapsan y las células del felógeno sufren distorsión. En ocasiones, los apresorios desarrollan hifas infectivas sobre la superficie externa de la planta sin penetrar las paredes celulares de la epidermis, característica que se mantiene a través del tiempo.

Transcurridas 60 horas, se notan pequeñas lesiones; en ellas, las células epidérmicas son completamente destruidas. Las células subepidérmicas y el felógeno sufren gradualmente un daño progresivo; otras células se desarrollan en forma anómala y más tarde se necrosan (Fig. 4). Ciertas células de la epidermis parecen perder parte de sus organelas sin cambiar su forma; con frecuencia, el núcleo adopta una posición lateral, contigua a la pared (Fig. 5). Si hay lenticelas, éstas sufren el mayor daño; es factible notar la presencia de micelio en los lugares donde se forman las lesiones. En general, se produce un oscurecimiento de la zona afectada.

Al cabo de 72 horas, la epidermis se comprime y hay un colapso total de las células y pliegue de las paredes anticlinales. La ruptura de las paredes celulares se acentúa (Fig. 5).

El tejido de relleno de las lenticelas sufre hiperplasia e hipertrofia, especialmente en las zonas externas. Las células de parénquima cortical sufren divisiones anómalas en las zonas aparentemente sanas pero cercanas a la lesión (Fig. 5); externamente, se notan lesiones sin distorsión morfológica pronunciada.

Al cuarto día, la epidermis aparece destruida. Las lesiones en este estadio son pequeñas, se extienden lateral e internamente, aproximadamente a seis células de profundidad, adquiriendo una forma cónica, más ancha en el exterior. Las lenticelas se observan muy dañadas (Fig. 6). Al quinto, sétimo y noveno día, se observan daños similares a los vistos anteriormente.

Transcurridos 50 días, las lesiones han alcanzado pleno desarrollo en la zona comprendida entre la epidermis y las cercanías del floema, causando daños bastantes severos. El felógeno se daña en forma total y las lenticelas muestran desarrollo del micelio en el interior. El tejido de relleno y el felógeno de la lenticela son severamente afectados. Externamente, se observa gran cantidad de micelio distribuido en toda la sección afectada. Dentro de la lesión, las células se necrosan y algunas se desintegran. En zonas carentes de lesión, vecinas a las áreas infectadas, la epidermis es dañada probablemente por la acción química del hongo; se producen desprendimiento celulares, que dejan secciones de tejido directamente expuestos al hongo (Figs. 7 y 8).

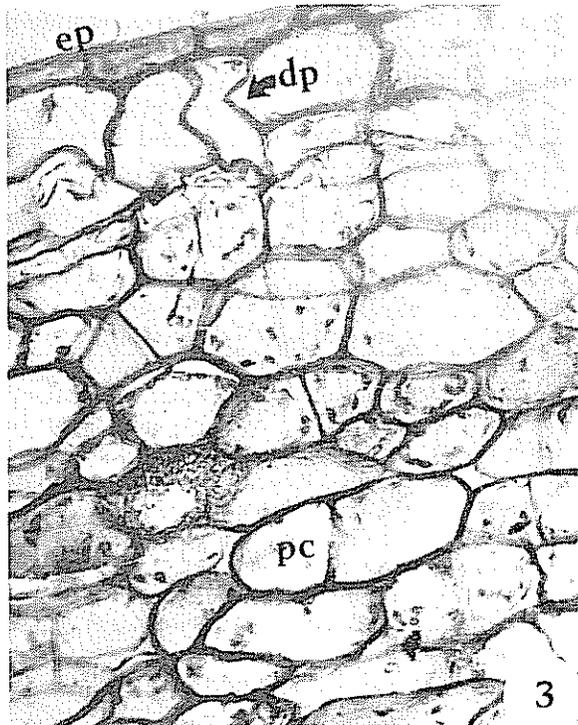


Fig. 3. Sección transversal de tallo, mostrando el colapso de las células epidérmicas y el doblamiento de las paredes anticlinales, 48 horas después de realizada la inoculación (336X)  
ep: epidermis, pc: parénquima cortical, dp: doblamiento de pared

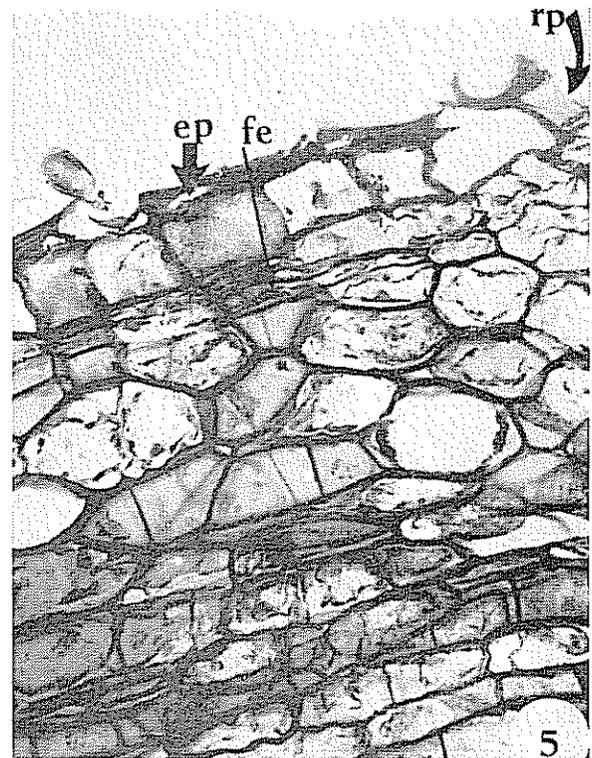


Fig. 5. Corte transversal de tallo, mostrando el rompimiento de la pared y compresión de las células epidérmicas, 72 horas después de inocular (336X).  
ep: epidermis, rp: rompimientos de pared, fe: felógeno

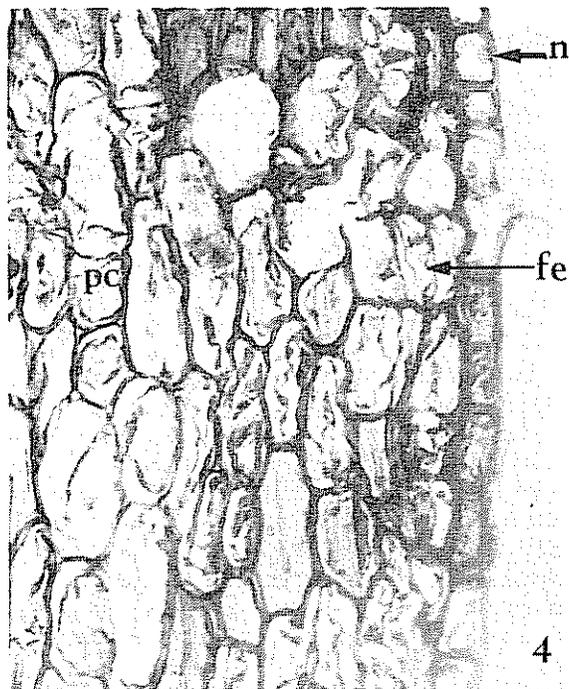


Fig. 4. Tallo con lesión en formación 60 horas después de realizada la inoculación (336X).  
ep: epidermis, fe: felógeno, pc: parénquima cortical, n: núcleo

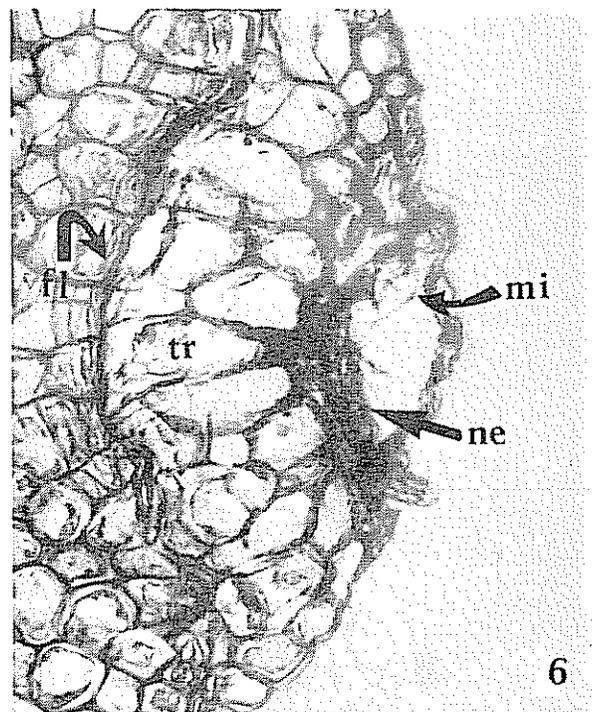


Fig. 6. Lenticela dañada por el hongo, al cuarto día de realizada la inoculación (336X) tr: tejido de relleno, fl: felógeno de la lenticela, ne: necrosamiento celular.

Alrededor de la lesión, se presentan cambios en el patrón normal de división celular, formándose una área bandeada que separa la sección enferma de la aparentemente sana (Figs. 7 y 8).

No se observó alteración del tejido vascular. Con frecuencia, aparecieron células con levaduras de gran tamaño, en especial, en los lugares dañados pero en poca cantidad.

Transcurridos 80 días, la magnitud de los daños es similar a los ya descritos. Cuando la infección alcanza el xilema causa daños muy serios; provoca un necrosamiento y distorsión de las células. Algunos de los elementos de los vasos, fibras y células de parénquima sufren lisis en sus paredes. El hongo puede movilizarse en sentido radial; en este caso, se produce un aumento de la densidad del citoplasma en las células de los rayos. El hongo se desplaza también en sentido vertical por medio de los elementos de los vasos, alejándose bastante del sitio de penetración (Fig. 9). La penetración y desplazamiento del hongo en el xilema ocurre también por medio de los elementos de los vasos de la traza foliar, del pecíolo o de las cicatrices foliares hasta alcanzar el cilindro central.

Cuando el desarrollo de la enfermedad coincide con un nudo, los primordios foliares de las yemas axilares sufren un necrosamiento total (Fig. 10). Esporádicamente, se produce muerte descendente de las plantas jóvenes.

#### DISCUSION

El extremo distal de tallo presenta una abundante pubescencia que podría constituir una barrera para que los conidios alcancen la epidermis y germinen. También, estas células contienen sustancias oscuras, presumiblemente fenoles, las cuales podrían actuar como inhibidores y jugar un papel importante en la defensa de la planta (1, 7, 21), ya que fue difícil reproducir lesiones en forma artificial en estos puntos. En caso de que los conidios germinen, es necesario que prevalezcan largos períodos de humedad y temperaturas adecuadas para que el micelio alcance la epidermis y el hongo pueda desarrollarse.

En los tallos de la planta de guanábana, la germinación de los conidios fue similar a la observada en las hojas (33). Esta observación es apoyada por estudios realizados en otros hospedantes con un hongo del mismo género (8, 25, 30). Lo mismo sucedió con el desarrollo de los apresorios sobre la superficie epidérmica; la mayoría se formó entre las 16 y 48 horas después de la inoculación (33).

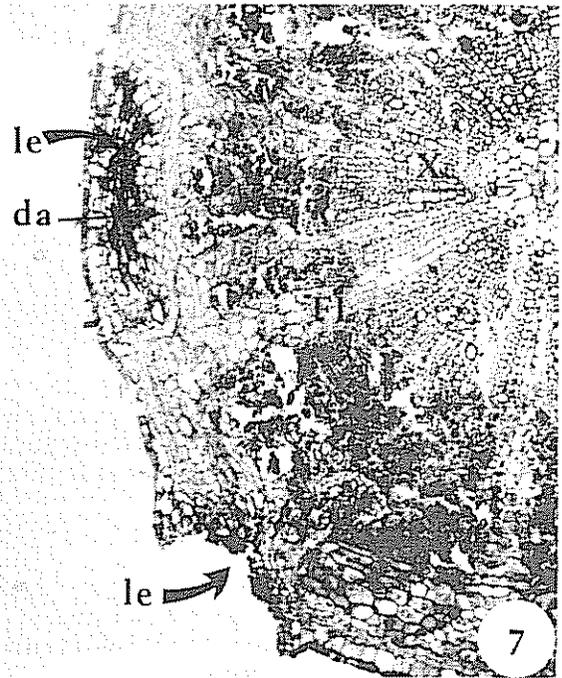


Fig. 7. Sección transversal de tallo, 50 días después de realizada la inoculación; se observa la lesión en formación, el oscurecimiento general de la zona y las divisiones anormales separando la zona enferma de la aparentemente sana (67X) le: lesión, da: divisiones anormales, x: xilema, fl: floema.

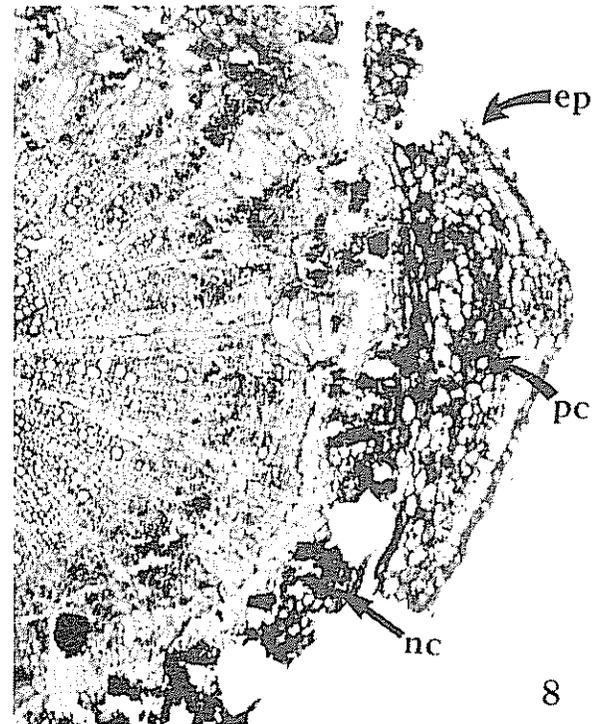


Fig. 8. Corte transversal de tallo mostrando los daños severos que causa el hongo, 50 días después de haber sido inoculado (67X) ep: epidermis, pc: parénquima cortical, nc: necrosamiento celular.

Se pudo notar el desarrollo de la hifa infectiva sin penetrar totalmente la pared celular, lo que sugiere que los apresorios son estructuras latentes de supervivencia que se forman cuando las condiciones no son favorables (8, 12, 28, 38).

Las observaciones histopatológicas del presente estudio sugieren que uno de los mecanismos de penetración en los tallos lo constituye la acción enzimática del hongo, la cual facilita el ingreso al interior del órgano (5, 12, 20, 27, 31, 36, 38).

La formación de agregados citoplasmáticos cerca del punto donde se ubicaron los apresorios, se puede considerar como un reconocimiento inicial mutuo entre las células del hospedero y el patógeno (5, 33), ya sea como respuesta de la célula a la penetración del hongo o como secreción, por parte del apresorio, de algunas sustancias enzimáticas.

En los tallos jóvenes inoculados, el desarrollo normal del felógeno se alteró mucho produciéndose una peridermis atípica en la que el meristema lateral quedó imposibilitado de producir tejido de relleno en la lenticela y en general, corcho en el resto del tallo. La formación de este tipo de peridermis aumenta la vulnerabilidad del tallo a la penetración del patógeno. Los tallos con peridermis normal son susceptibles a infección severa sólo a través de heridas.

Si bien la penetración se puede efectuar en forma directa por la epidermis (5, 25), con frecuencia se produce por vía lenticular. En este último caso, la enfermedad se desarrolla más fácilmente que por vía epidérmica. Las lenticelas inmaduras pueden ser puntos de fácil acceso a la infección, pero no es frecuente que esto ocurra en las lenticelas que se suberizan (1, 36, 37). El tejido de relleno de estas estructuras es bastante laxo; tienen la capacidad de retener mucha humedad (13), así como la de exponer directamente el tejido, al producirse rupturas como consecuencia de las divisiones continuas del felógeno de la lenticela. Por otra parte, como se explicó en la estructura sana, a la hora de efectuar las inoculaciones, la epidermis no había sido sustituida por la peridermis y al producir felógeno corcho hacia el exterior y felodermis hacia el interior, las células epidérmicas son incapaces de compensar el aumento en volumen, produciéndose rupturas que exponen directamente el parénquima cortical y facilitan la penetración del patógeno.

*Colletotrichum gloeosporioides* se desarrolla fácilmente en el xilema, del cual obtiene los minerales y el agua necesarios para su desarrollo. El desplazamiento a otras células por medio del parénquima de los rayos ocurre con facilidad pero aún esto es más fácil por

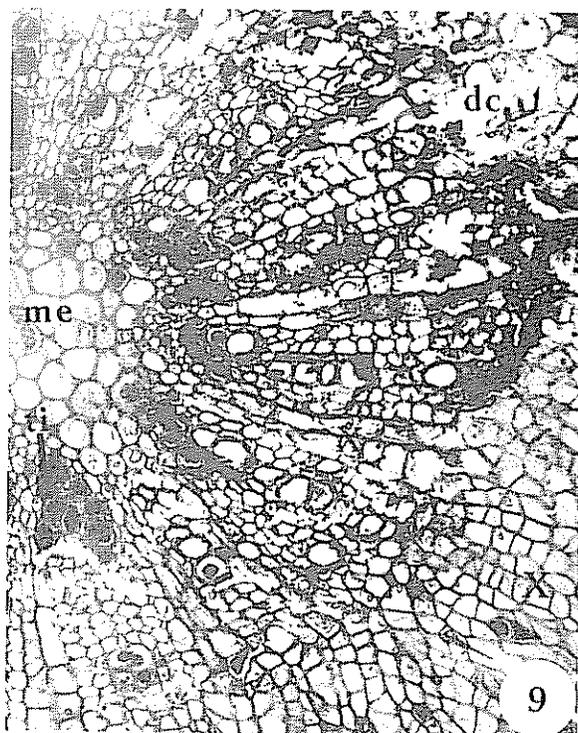


Fig. 9. Sección transversal de xilema con distorsión celular, necrosamiento, formación de tilides y desintegración de ciertas zonas 80 días después de inocular (168X). dc: desintegración celular, me: médula, ti: tilides, x: xilema.

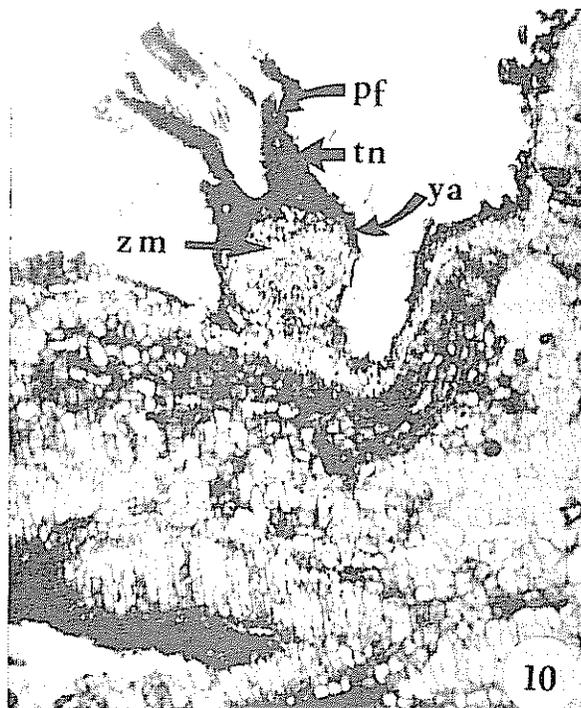


Fig. 10. Yema axilar y primordios foliares dañados por el hongo, 80 días posteriores a la inoculación (67X). ya: yema axilar, pf: primordio foliar, zm: zona meristemática, tn: tejido necrosado.

las placas perforadas y las ornamentaciones de las paredes laterales de los elementos de los vasos. También el patógeno puede pasar al cilindro central por la traza y cicatrices foliares, lo mismo que por las yemas axilares. Al desarrollarse el hongo en el xilema, se produce un bloqueo en el transporte de agua y de sales minerales debido a la formación de tílides, lo cual imposibilita el crecimiento vegetativo y la producción de flores y frutos. Se ha sugerido que la formación de tílides se produce como respuesta a productos tóxicos de las células invadida y que estos productos no son translocados pero afectan una región restrictiva del xilema y en general, su formación no es clara (21, 36, 37)

Cuando el floema sufre daño, se afecta el transporte acrópeto y basípeto de los productos fotosintéticos. El desarrollo y desplazamiento del hongo en este tejido es lento debido a la estructura de la placa cribosa de los elementos conductores los cuales, en el caso del floema, retardan más el desplazamiento del patógeno en comparación con el xilema (12)

La formación de una capa celular que separa la parte enferma de la aparentemente sana, sugiere una respuesta de hipersensibilidad, como consecuencia de una reacción de defensa de la planta a la invasión del patógeno (10, 16, 35, 36). Este fenómeno se ha observado en un amplio rango de hospederos (35). Las células pueden producir compuestos fenólicos y productos oxidados que se forman rápidamente después de entrar el patógeno. Estas sustancias exhiben propiedades antimicrobianas y se considera como un mecanismo de resistencia de la planta (16, 21, 36, 37). No obstante, podría ser que la verdadera resistencia sea bioquímica y la respuesta morfológica constituya una reacción puramente secundaria, generada por el cambio bioquímico (9).

Las lesiones formadas bajo condiciones de campo (34) y las observadas en el presente trabajo revelan semejanza, excepto en los casos en los cuales se observa el daño producido por taladradores del tallo y posterior infección del hongo. Estas alteraciones superan la magnitud de los daños producidos mediante inoculación artificial.

Los insectos taladradores provocan heridas muy profundas que atraviesan los tejidos vasculares; además de afectar los procesos normales de transporte facilitan la entrada de otros patógenos, colaborando muchas veces con la patogénesis de la enfermedad (11, 34).

La poda, como medida terapéutica (10, 13), tendría una justificación si la enfermedad llegara a alcanzar los tejidos vasculares. De no realizarse, el hon-

go se desplazaría fácilmente por medio de los elementos de los vasos

Las secreciones oscuras en el tallo, las cuales son frecuentes en condiciones de campo, podrían ser un indicador de que la enfermedad ha alcanzado los tejidos vasculares.

Aunque la muerte descendente de ramas jóvenes no fue común en las plántulas inoculadas, es frecuente encontrarlas bajo condiciones de campo y en consecuencia, se hace necesario podar. Sin embargo, esta práctica produce deformaciones en la arquitectura de los árboles y la eliminación de ramas que eventualmente podrían proporcionar frutos, retardándose así los ciclos de producción. Por esta razón, es necesario establecer métodos de control integrados, así como seleccionar aquellas plantas que muestren resistencia para disminuir la incidencia de la enfermedad.

#### LITERATURA CITADA

1. AKAI, S 1959. Histology of defense in plants. Plant pathology. An advanced treatise. Ed. by J.A. Harsfall y A.E. Dimond. Vol. 1. The diseased plant. Academic Press, New York. 674 p.
2. ALVAREZ, L.A. 1949. Anthracnose of the Annonaceae in Puerto Rico. Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico 33(1):27-43.
3. ARRUDA, S.C. 1940. Anthracnose e cancro das anonaceas. O'Biologica 4(8):224-225.
4. AWAN, J.A.; KAR, H.; UDOUDOH, P.J. 1980. Preliminary studies on the seeds of *Annona muricata* Linn. Qualitas Plantarum. Plant Foods and Human Nutrition 30(2):163-168.
5. BAKER, J 1978. Cutin degradation by plant pathogenic fungi. Phytopathology 68:1577-1584.
6. BENERO, J.R.; RODRIGUEZ, A.J.; ROMAN DE SANDOVAL, A. 1971. A soursop pulp extraction procedure. Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico 55(4):518-519.
7. BAILEY, J.A.; VINCENT, G.G.; BURDEN, R.S. 1974. Diterpenes from *Nicotiana glutinosa* and their effects on fungal growth. Journal of General Microbiology 85:57-64.
8. BINYAMINI, N.; SCHIFFMANN-NEDEL, M. 1972. Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. Phytopathology 62:592-594.
9. BUSH, L.V.; WALKER, J.C. 1958. Studies of cucumber anthracnose. Phytopathology 48(6):302-304.

10. COSTA, J.J.; MARGHERITIS, A.E.; MARCICO, O.J. 1974. Introducción a la terapéutica vegetal. Argentina. Hemisferio Sur.
11. DOMINGUEZ, D.E. 1978. Insectos perjudiciales del guanábano (*Annona muricata* L.) en el Estado de Zulia, Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía 4(3):149-163
12. HEITFUSS, R.; WILLIAM, P.H. 1976. Physiological Plant Pathology. Berlin Springer Verlag 890 p.
13. JAUCH, C. 1976. Patología Vegetal. Argentina. El Ateneo 270 p.
14. JENSEN, A.W. 1962. Botanical Histochemistry Berkely, California. W.H. Freeman. 326 p.
15. JOHANSEN, D.A. 1940. Plant Microtechnique. New York, MacGraw Hill Book. 523 p.
16. KENAGA, C.B. 1974. Principles of phytopathology Balt Publishers. II Edición. Lafayette, Indiana 402 p.
17. KORNOWSKY, M.J. 1965. A formaldehyde gluteraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. Journal of Cell Biology 27:137-138.
18. LEAL, J.M. 1970. Notas sobre la guanábana (*Annona muricata*) en Venezuela. Proceedings of the tropical region. American Society for Horticultural Science 14:118-121
19. LEON, J. 1968. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. San José, IICA. 487 p.
20. MCKEEN, W.E.; REIMER, S.R. 1973. Initial penetration process in powdery mildew infection of susceptible barley leaves. Phytopathology 63:1049-1053.
21. MISAGHI, I.J. 1982. Plant pathogen interaction. New York. Plenum Press. 287 p.
22. MORALES, F. 1979. Observaciones sobre la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) de la guanábana (*Annona muricata*) en Costa Rica Resúmenes. Maracaibo, Venezuela
23. MORALES, F. 1981. Ensayo sobre fungicidas para el combate de antracnosis en guanábana (*Annona muricata* L.). Agronomía Costarricense 5(1/2):75-80.
24. MORION, J.F. 1976. The soursop guanabana (*Annona muricata* Linn.) Proceedings of the Florida State Horticultural Society 79:355-366
25. NAIR, J.; CORBIN, J.B. 1981. Histopathology of *Pinus radiata* seedlings infected by *Colletotrichum acunatum*. Phytopathology 71:777-783.
26. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. 1975. Underexploited tropical plants with promising value. Washington, D.C. p 80-83.
27. NICHOLSON, R.L.; KUC, J.; WILLIAMS, E.B. 1972. Histochemical demonstration of transitory sterase activity in *Venturia inaequalis*. Phytopathology 62:1242-1247.
28. PARBERY, D.G.; EMMET, R.W. 1977. Hypothesis regarding appresoria, spores, survival and phylogeny in parasitic fungi. Review de Mycologie 41:429-447.
29. PRIMER CURSO INTERNACIONAL SOBRE FRUITICULTURA TROPICAL. 1978. El cultivo de la guanábana Maracay, Venezuela. p. 1-28.
30. QUIMIO, I.H.; QUIMIO, A.J. 1975. Pathogenicity of mango anthracnose organism. Philippine Agriculturist 58(7/8):322-329.
31. SCHMITTHENNER, A.F. 1952. Hydrolysis of pectin and cellulose by isolates of *Colletotrichum phomoides*, *C. lagenarium* and *Glomerella cingulata*. Phytopathology 42(9):474
32. SHARMAN, V.C. 1943. Tannic acid and iron alum with safranin and orange G in studies of the shoot apex. Stain Technology 18:105-111.
33. SUBIROS, J.F.; FLORES, E.M.; VARGAS, E. 1984. Estudio de la antracnosis en guanábana (*Annona muricata* L.). I. Efecto en la morfología de las hojas. Turrialba 34(2):221-228.
34. SUBIROS, J.F.; FLORES, E.M.; VARGAS, E. 1984. Estudio morfológico de los daños causados por *Colletotrichum gloeosporioides* y otros organismos asociados en tallos y hojas de guanábana. XXIV Reunión Anual de la Sociedad Americana de Fitopatología. San José. 1984.
35. VAN DER PLANK, J.E. 1973. Disease resistance in plants. New York. 3 ed Academic Press 206 p.
36. WHEELER, H. 1975. Plant pathogenesis. Berlin, Springer Verlag 106 p.
37. WHITNEY, P.J. 1977. Microbial plant pathology. New York. Pica Press. 160 p.
38. WILLIAMS, P.H. 1978. How fungi induce disease. In Plant Disease: An Advanced Treatise. Ed. by J.G. Horsfall, E.B. Corling. London, Academic Press Vol. IV p 163-179.