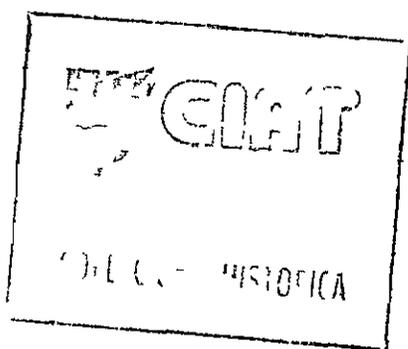


SB  
379  
S68  
M45

INFORME TECNICO FINAL

107517

CARACTERIZACION MOLECULAR Y AGROMORFOLOGICA DE  
LA VARIABILIDAD GENETICA NATIVA DEL GUANABANO (*Annona  
muricata* L ) Y DE ESPECIES DE ANONACEAS RELACIONADAS



Presentado por

Alvaro MEJIA JIMENEZ<sup>3</sup>, Nelson ROYERO<sup>1</sup>, Raul SAAVEDRA<sup>2</sup>, Ines SANCHEZ<sup>2</sup>,  
Gerardo GALLEGO<sup>3</sup>, Myriam C DUQUE<sup>3</sup>, Argemiro DOMINGUEZ<sup>2</sup>, Alberto ROSERO<sup>2</sup>  
Alvaro CAICEDO<sup>2</sup> Jorge CABRA<sup>1</sup> Edmundo GARCIA<sup>2</sup> y Joe TOHME<sup>3</sup> M  
Martinez Osejo

1 CORPORACION BIOTEC, 2 C I CORPOICA – PALMIRA,

3 CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL – CIAT

Palmira - Valle, Noviembre de 2002

# **1 IDENTIFICACION DEL PROYECTO**

## **1.1 Titulo y codigo del proyecto**

Caracterizacion molecular y agromorfológica de la variabilidad genética nativa del guanabano (*Annona muricata* L) y especies de anonáceas relacionadas

CODIGO 1282-12-10427

## **1.2 Numero del contrato que lo respalda**

Contrato 222-2000

## **1.3 Nombre del Investigador principal**

Alvaro Mejía Jimenez, PhD

## **1.4 Nombre del grupo de investigación**

Biotecnología aplicada a frutales

CORPORACION BIOTEC – C I CORPOICA PALMIRA Y CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL - CIAT

## **1.5 Nombre de la entidad ejecutora**

CORPORACION BIOTEC

## **1.6 Fecha de presentación del informe**

Noviembre 22 de 2002

# **2 SINOPSIS**

El guanabano (*A. muricata* L) es un frutal neotropical perteneciente a la familia *Annonaceae*. El delicioso sabor de su fruto, del cual se preparan jugos, postres y yogures, hace que este

goce de una alta demanda principalmente en Latinoamérica. Uno de los principales problemas que afrontan los productores de la fruta es la escasa disponibilidad de variedades caracterizadas. Lo mismo sucede con otras especies anonáceas relacionadas como la chirimoya (*A. cherimola*), el anón (*A. squamosa*), el anón amazónico (*Rollinia edulis*), la anóna colorada (*A. reticulata*) entre otras, igualmente originarias del trópico americano.

Nosotros reportamos la caracterización agromorfológica de 87 árboles de 31 accesiones de guanabano del banco genético colombiano conservado por el C I Corpoica Palmira-Colombia. Igualmente reportamos la caracterización molecular con marcadores tipo AFLPs de 82 accesiones, 42 de ellas de guanabano y 40 de especies de los géneros *Annona* y *Rollinia*. La caracterización se realizó principalmente desde el punto de vista de su utilidad para el establecimiento de cultivos comerciales o el mejoramiento genético.

Entre las accesiones de guanabano evaluadas agromorfológicamente que tenían hasta 15 años de sembradas, se encontraron frecuencias de polinización natural entre 0 y 16,6% (11 accesiones no produjeron frutos), productividades sin polinización artificial de hasta 116 kg/árbol/año (23,69 ton/ha/año/204 árboles/ha) y la no incidencia de antracnosis en 3 árboles de 2 accesiones, los cuales no corresponden a las accesiones más productivas de las evaluadas. En cuanto a las características del fruto se encontraron pesos de entre 1300 y 7300g (3163g en promedio), longitudes de fruto entre 13,0 y 37,9 cm (24,3 cm en promedio), sólidos solubles (°Brix) entre 9 y 19,6 (promedio 14,3), acidez (%) entre 0,6 y 1,4 (promedio 1,02) y sabor y aroma calificados como excelentes para el 80% de las accesiones evaluadas.

El análisis molecular en las anonáceas arrojó a 0,55 de similaridad 7 agrupamientos y dos accesiones que no se colocaron en ningún agrupamiento, que corresponden con bastante seguridad a por lo menos 9 especies diferentes de la siguiente manera: 1 *A. glabra*, 2 *Annona* spp. sin identificar, 3 *Rollinia* spp., 4 *A. montana*, 5 *A. muricata*, 6 *A. purpurea*, 7 *A. reticulata*, 8 *A. cherimola*, 9 *A. squamosa*. Las accesiones clasificadas como Atemoyas se colocaron entre los agrupamientos 8 y 9.

Las accesiones pertenecientes a *A. muricata* aunque no presentaron duplicados, mostraron niveles de similaridad altos, de por lo menos 0,81. Tanto entre los guanabanos como en las anonas relacionadas, se encontraron accesiones que por su calidad de frutos y producción, son aptas para el establecimiento de cultivos comerciales.

Se concluye que la variabilidad de las accesiones de guanabano conservadas en el banco es baja, mientras que la de especies de anonáceas relacionadas es alta, pero el número de accesiones es bajo. Esto hace necesario la realización de colectas y el para ampliar la base genética disponible de estas especies.

## 2 1 Abstract

Soursop (or guanabano in Spanish, *Annona muricata* L.) family *Annonaceae* is a fruit tree species that is native to tropical America. The preparation of delicious juices, desserts and yogurts from the pulp of the soursop fruits has spurred a thriving industry which has created a demand for them. The current level of production however cannot meet this demand. One of the major constraints militating against soursop production is the lack of disease-free planting materials of elite clones. This dearth of clean planting materials also militates against the large-scale production of the fruits of related species from the *Annonaceae* family equally native to the American tropics such as cherimoya (*A. cherimola*), anon (*A. squamosa*), anon amazonico (*Rollinia edulis*) and anona colorada (*A. reticulata*).

We report the agro-morphological characterization of a total of 87 trees of soursop selected from 31 accessions. We also report the molecular characterization with AFLP markers of a total of 82 accessions: 42 of them of soursop and 40 of different species of the genera *Annona* and *Rollinia* maintained mainly in the C. I. Corpoica, Valle-Colombia. This was in order to gather data that would guide the selection of materials for the establishment of commercial plantations as well as for the genetic improvement of the species.

The soursop accessions aged between 7 and 15 years, evaluated for agronomic and morphological characters, showed frequencies of natural pollination between 0 and 16.6% (11 trees did not produce fruits). Yields without artificial pollination as high as 116 kg/tree/year (23.7 ton/ha/year, 204 trees/ha) were recorded. Also, there was no anthracnose incidence in three trees belonging to two accessions. Average fruit weights ranged between 1.3 and 7.3 kg (3.2 kg on average), fruit lengths between 13.0 and 37.9 cm (24.3 cm in average), soluble solids (°Brix) between 9 and 19.6 (average 14.3), and acidity between 0.6 and 1.4% (average 1.02%). Also, the taste and aroma of 80% of the analyzed accessions were classified as excellent by a taste panel.

In the accessions evaluated with molecular markers the measure of genetic similarity delimited 7 groups while 2 accessions did not fall within any groups. These 7 groups and the 2 outliers corresponded to at least 9 different species, as follows: 1 *A. glabra*, 2 unidentified *Annona* spp., 3 *Rollinia* spp., 4 *A. montana*, 5 *A. muricata*, 6 *A. purpurea*, 7 *A. reticulata*, 8 *A. cherimola*, and 9 *A. squamosa*. The *squamosa* X *cherimola* hybrids known as atemoyas, all fell within groups 8 and 9. The accessions belonging to *A. muricata* even though there were no duplicates showed high levels of similarity of at least 0.81.

Based on fruit quality and production several accessions of soursop and the related anonas were determined as good for the establishment of commercial fruit orchards. We also concluded that the genetic variability amongst the soursop accessions in the germplasm bank is low while the variability of related anona species is very high even though the number of accessions was low. The collection of more accessions is therefore necessary in order to broaden the genetic base of these species available to growers and scientists.

### 3 RESUMEN

**Objetivo general** Caracterizar molecularmente y agromorfológicamente la variabilidad genética de guanabana y otras anonáceas nativas disponible en bancos de germoplasma nacionales y otros centros de investigación

**Objetivo específico 1** Caracterizar la agromorfología de accesiones seleccionadas que se encuentran en el Banco de Germoplasma de C. I. Corpoica

Agromorfológicamente se analizaron un total de 87 árboles de guanabano (*A. muricata* L.), correspondientes a 31 accesiones. Se identificaron tres árboles de cada accesión, con excepción de 9 accesiones de las cuales solo existen uno o dos árboles.

*Arquitectura y del Arbol* En general la distribución de las ramas en los árboles es densa y compacta y la copa es de forma cónica con un eje central principal. Se destaca la accesión 2513 (árbol 1) por presentar una distribución equilibrada de las ramas y un interior algo descubierto que favorece la circulación del aire.

*Polinización Natural y Productividad (kg Promedio árbol/año)* El porcentaje de cuajamiento natural de los frutos varió entre 0 y 16.6%. La no formación de frutos fue registrada en 11. Se encontraron 15 accesiones que presentaron niveles de polinización natural superiores a 5%. Estos niveles son superiores a los registrados por Guzmán (1992) que oscilan entre 1.7 y 4.8, pero inferiores a los reportados por Villalta (1988) en Costa Rica, que oscilan entre los 18 y 24. En 25 de la totalidad de árboles evaluados se formaron 10 o más frutos. Entre todas las accesiones, 8 que produjeron más de 45 kg/árbol (9.3 ton/ha, calculadas a razón de 204 árboles por hectárea), lo que es superior al promedio nacional que está en 9 ton/ha. La productividad de todas las accesiones sin embargo está por debajo de la reportada para el clon de guanabano "Elita" de 191.8 kg/árbol/año (Ríos Castaño, 2001, Vivero Profrutales S.A.) lo que correspondería a 39 ton/ha/año.

*Incidencia de Antracnosis* La enfermedad tuvo mayor incidencia en las accesiones de guanabana que en las anonas relacionadas, en la mayoría de las cuales no se presentó. En A

*muricata* la incidencia de la enfermedad fue de la siguiente manera 3 arboles (3.3%) sin incidencia, 57 arboles (63.4%) con grado 1 (bajo) 20 arboles (22.2%) con grado 2 (medio) y 10 arboles (11.1%) con grado 3 (Alto) El primer grupo lo constituyen arboles que presentan una muy baja formación de frutos El segundo grupo representa la mayoría de las accesiones, dentro de las cuales se encuentran 10 arboles destacados por rendimiento El tercer grupo incluye 2 arboles destacados por rendimiento El cuarto grupo, con mayor incidencia, presenta arboles que no produjeron frutos y otros de baja producción

*Características Organolépticas del Fruto* Los resultados de la calidad organoléptica corresponden a la información reunida de la evaluación de los frutos de 65 de los 87 arboles de *A. muricata* En los 22 arboles restantes no se realizó análisis organoléptico

*Peso y Tamaño Promedio del Fruto* Los datos de las variables peso y longitud de fruto para las 65 accesiones presentan una alta variabilidad el peso promedio de los frutos varía entre 1.3 kg y 7.3 kg con una media de 3.2 kg Esta variación de peso permite clasificar los arboles evaluados de *A. muricata* en dos grandes grupos así 31 produce frutos de peso entre 1 y 3 kg y 33 produce frutos de peso superior a 3 kg Con respecto a la longitud del fruto, la mayoría de los arboles producen frutos entre 20 y 30 centímetros tamaño asociado directamente con pesos entre 2000 y los 4800 gramos Los frutos con peso menor a 2000 gramos, presentan entre 13.0 y 19.4 cm de longitud

*Variables Organolépticas* Se encontraron niveles de sólidos solubles entre 9 y 19.6, con una media de 14.27, y de acidez entre 0.6 y 1.4 con una media de 1.02 El sabor y aroma fue calificado entre 3.5 y 5, correspondiendo los niveles entre 4 y 5 a un excelente sabor y aroma Se detectó una alta asociación y positiva entre sólidos solubles y el sabor y aroma, una correlación significativa estadísticamente baja y negativa entre la acidez y el sabor y aroma y ningún tipo de asociación entre los sólidos solubles y la acidez

Los resultados indican que la gran mayoría de las accesiones de guanábana podrían ser utilizadas tanto para el consumo en fresco como para la industria

## **Objetivo Específico 2 Caracterizar la variabilidad genética disponible por medio del uso de marcadores moleculares tipo AFLP**

Molecularmente, por medio del uso de marcadores de tipo AFLPs se analizaron un total de 44 accesiones de especies de anonáceas pertenecientes a los géneros *Annona* y *Rollinia* y 42 accesiones de guanábano Se evaluaron varias combinaciones de cebadores para la amplificación selectiva de fragmentos de ADN de las muestras y se escogieron tres combinaciones que presentaron el mayor número de bandas polimórficas legibles

Las accesiones del grupo de anonaceas presentaron con la combinacion N 274 bandas, todas ellas polimorficas menos una (practicamente 100 % de polimorfismo) La accesion Cadmia en este analisis se incluyo como un elemento de referencia externo al grupo ("outgroup") La unica banda monomorfica para todas las *Annona* y *Rollinia* no se presento en esta accesion, lo que permite proponer esta banda o marcador como especifico para este grupo de anonaceas de importancia horticola El numero de bandas por individuo estuvo entre 18 y 48 Con la combinacion M se obtuvieron 225 bandas en todo el grupo 100 % polimorficas

En lo que tiene que ver con las accesiones de guanabano, cuatro de las accesiones del banco, clasificadas inicialmente como pertenecientes a esta especie presentaron patrones de AFLPs que a simple vista difirieron de los presentados por el resto de las accesiones Estas 4 accesiones agruparon despues del analisis de similaridad efectivamente junto con otras pertenecientes a 3 especies diferentes *A glabra* (1958-3) *A montana* (1959-2), *Rollinia* spp (1920-1) y *A montana* (1919-3), a las cuales parecen pertenecer Es necesario verificar estos resultados con la ayuda de un taxonomo vegetal y proceder a su reclasificacion en el banco

Las 42 accesiones de guanabano presentaron 75 bandas de AFLP para la combinacion F y 53 bandas para la combinacion M de cebadores El numero de bandas por individuo estuvo entre 41 y 58 con la primera combinacion y entre 20 y 40 con la segunda La combinacion F produjo 67 bandas polimorficas y fue la mas eficiente en detectar polimorfismos (67/75) Tomando las dos combinaciones de cebadores en conjunto, se presentaron 105 bandas polimorficas, representando un polimorfismo del 82 % (105/128)

*Correlacion de las matrices de similitud* La comparacion de las matrices de similaridad obtenidas con las dos combinaciones de cebadores para el grupo de anonaceas y el grupo de las guanabanos mostro alta correlacion ( $r = 0.93$  y  $r = 0.95$  respectivamente)

*Variabilidad Genetica e Identificacion Taxonomica de las Accesiones de Especies de Anonaceas* El analisis de la similaridad segun la ecuacion de Nei-Li (1979) arrojó el dendrograma que se presenta en la figura A para las anonas y la figura B para los guanabanos En el caso de las anonas el dendrograma muestra, a nivel de 0.10 de similaridad dos grandes grupos, uno en el que se colocan todas las accesiones pertenecientes a los generos neotropicales *Annona* y *Rollinia* objeto de este estudio, y el otro donde se encuentra la tambien anonacea *Cadmia* (*Cananga odorata*), de origen asiatico, utilizada como testigo Ya concentrandose solo en las accesiones neotropicales a un nivel de similaridad de 0.55 se detecta un total de 7 agrupamientos y 2 accesiones que no se colocaron dentro de ningun agrupamiento (Fig A, agrupamientos y accesiones estan marcados con G1 al G9) Despues de un analisis mas detallado de las accesiones que se localizan en cada agrupamiento, y en vista de que la afiliacion taxonomica de varias de estas se conoce con certeza, es posible deducir

que cada uno de los agrupamientos detectados a un nivel de similitud de 0.55 corresponde a por lo menos una especie de los generos *Annona* o *Rollinia* tal como se representa en la Figura A

Figura A Dendrograma resultante del analisis de similitud con el indice Nei Li (1979) de muestras de anonaceas a partir de sus patrones de AFLP (combinaciones de cebadores M y N) A la derecha se encuentran señalizados los diferentes agrupamientos detectados a un nivel de similitud de 0.55 y la especie a la que posiblemente pertenecen

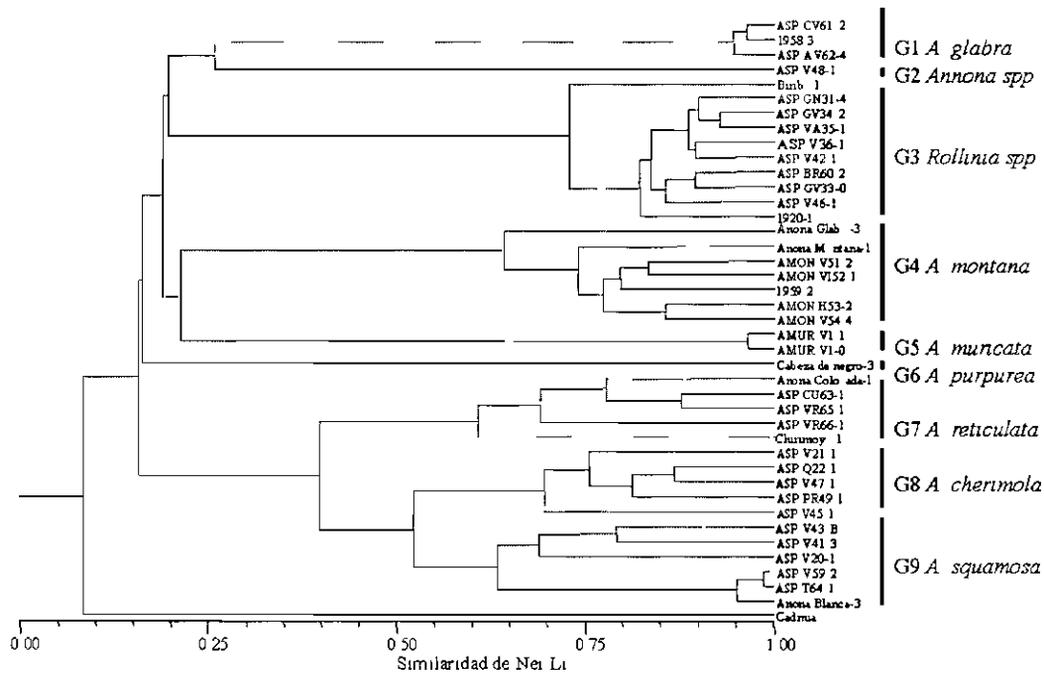
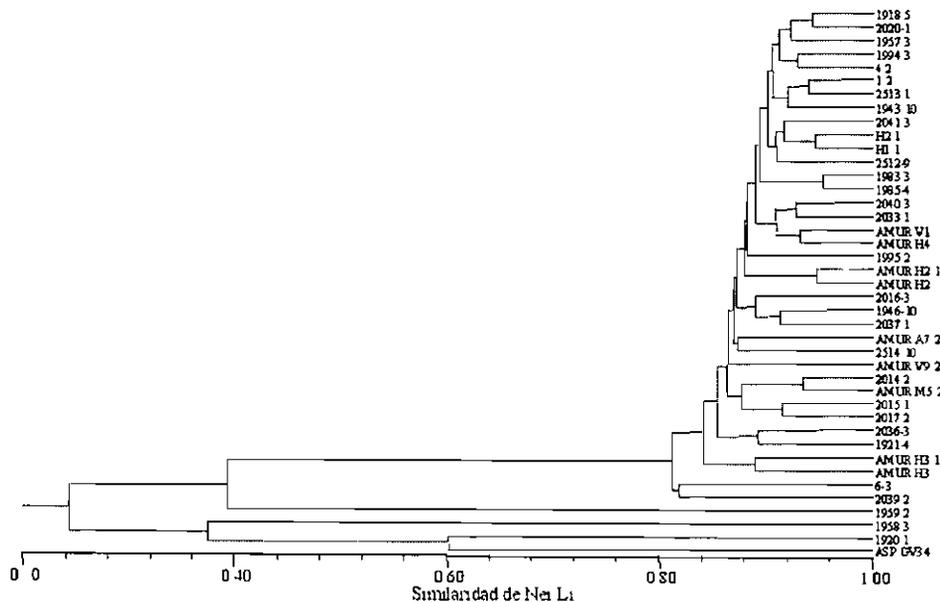


Figura B Dendrograma resultante del analisis UPGMA de estimados de la similitud genetica segun Nei Li basado en el analisis del patron de bandas de ADN (combinaciones de cebadores F y M), de las diferentes accesiones clasificadas como pertenecientes al guanabano La accesion ASP GV34 corresponde a un outgroup del genero *Rollinia*, mientras que las accesiones 1959 2 1958 3 y 1920 1 resultaron pertenecer a especies diferentes al guanabano



*Variabilidad Intraespecifica en Guanabano* Las accesiones del grupo de guanabanos presentaron similitudes entre 0.80 y 0.95 (Fig. B). Las relaciones genéticas establecidas a partir del análisis con las dos combinaciones de cebadores no permiten detectar grupos organizados por su origen geográfico. Esto se puede deber a que semillas de esta especie hayan sido transportadas por el hombre continuamente de un lugar a otro en el pasado. Aunque todas las accesiones de guanabano fueron diferentes entre sí, se obtuvo un grupo bastante homogéneo y que muestra un alto nivel de similitud. Los resultados obtenidos plantean la necesidad de realizar colectas que incluyan un mayor número de regiones agroecológicas de toda el área de distribución natural de la especie.

*Implicaciones de los Resultados del Análisis Molecular para la Taxonomía de las Especies del Género Annona y de los Géneros Annona y Rollinia* En varios aspectos los resultados del presente estudio confirman la clasificación taxonómica realizada por Safford (1914) y se alejan de los resultados obtenidos por Samuel *et al.* (1991) en un estudio en el que se analizaron 11 loci de aloenzimas como marcadores bioquímicos, y en el que se incluyeron accesiones de 5 especies del género *Annona* y una del género *Rollinia*. Lo que es bastante sorprendente en los resultados del presente estudio es el agrupamiento de las accesiones clasificadas dentro del género *Rollinia* no como un género aparte por fuera del agrupamiento que contiene las especies del género *Annona*, sino como un agrupamiento más dentro de los obtenidos del género *Annona*. Este resultado sugiere que no existirían méritos para clasificar el género *Rollinia*, por fuera del género *Annona*, lo que debe ser revisado con cuidado, si es posible con marcadores moleculares de otro tipo, pues estaría sugiriendo que la clasificación taxonómica de *Annona* y del género afín *Rollinia*, ampliamente aceptada en la literatura, debería ser revisada y corregida.

### **Objetivo No. 3. Inventario Preliminar de la Variabilidad Genética de Guanabanos y Anonáceas Afines Existentes en Herbarios y Colecciones Nacionales**

Se visitaron los tres principales herbarios del país: Herbario Nacional Colombiano (COL) del Instituto de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia; Herbario Amazónico (COAH) del Instituto de Estudios Amazónicos "Sinchí" y Herbario del Instituto Alexander von Humboldt (HAvH) y se preparó un listado de las especies de anonáceas descritas allí. El cumplimiento de este objetivo fue facilitado con la publicación del primer inventario de las Annonaceae de Colombia por parte del experto José A. Murillo (2001) investigador del Instituto Nacional de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia.

**Objetivo No 4 Incrementar la variabilidad genetica del banco de germoplasma vivo de guanabano y anonaceas afines de C I Corpoica con materiales que se encuentran en fincas de agricultores y colecciones de universidades**

Durante la realizacion del proyecto el banco de germoplasma de guanabano y especies de anonaceas relacionadas se incremento en 23 accesiones de guanabano traídas del C I Corpoica Natama Igualmente se incremento en 7 accesiones de las especies *A montana* *A squamosa* *Rollinia spp* *A glabra* y *A muricata*

**Objetivo No 5 Diseñar estrategias de utilizacion sostenible de la variabilidad caracterizada, en la produccion de material de siembra para el establecimiento de cultivos tecnificados**

Se propone evaluar varias de las accesiones de guanabano caracterizadas que se destacaron por presentar una alta productividad, una alta frecuencia de polinizacion natural, una baja incidencia de antracnosis o que produjeron frutos de tamaño pequeño, en diferentes localidades del pais aptas para el cultivo, y en asocio con agricultores, comercializadores y procesadores Igualmente se propone evaluar accesiones de especies de anonaceas relacionadas como variedad o como patron para la injertacion

## **4 INFORME DE RESULTADOS**

### **4.1 DESCRIPCION DEL PROYECTO**

Colombia es un pais rico en biodiversidad de especies de la familia *Annonaceae*, en la que se clasifican tres generos con especies que producen frutos comestibles *Annona* *Rollinia* y *Raimondia* (Murillo 2001) La mayoría de estas tienen una distribucion al parecer natural, en estado silvestre o semisilvestre en fincas, huertos o chagras distribuidas por las distintas regiones del pais la guanabana (*A muricata* L), la chirimoya (*A cherimola* Mill) el anon (*A squamosa*, L), la guanabana del Choco o cimarrona (*A montana* Macfad), el anon amazonico (*Rollinia spp*), la cabeza de negro el anon morado (*A cinerea* Dunal), el anon pelon, mamon o corazon de buey (*A reticulata* L), el anon liso (*A glabra* L) el manirote o turangua (*A purpurea* Mac & Sesse ex Dunal, Perez Arbelaez, 1990, Escobar y Sanchez, 1992 y Romero Castañeda, 1991) El valor genetico de las especies silvestres para “mejorar y asegurar la produccion de chirimoyas, guanabanas y anones en el pais” ya habia sido reconocido por Perez Arbelaez en 1935, en su libro ‘Plantas Utiles de Colombia’ (1990)

Sin embargo esta riqueza en variabilidad genética contrasta con la escasa disponibilidad de variedades y material de siembra de calidad para el establecimiento de cultivos tecnificados de estos frutales

Actualmente Colombia importa alrededor de un 40% de la guanabana que su creciente industria de jugos demanda. En el caso de la Chirimoya, una anonacea con amplia aceptación en los mercados extranjeros, Colombia no figura entre los países exportadores de la fruta (CCI y UA, 1996) a pesar de contar con las tierras y los climas andinos ideales para su cultivo. Es más, esta deliciosa fruta “sin duda uno de los más sabrosos frutos de América y quizá del mundo” (Perez Arbelaez, 1990) ha desaparecido casi completamente de los mercados nacionales. De igual manera otras anonaceas, que solo se producen y consumen localmente, podrían gozar de una amplia aceptación en mercados nacionales y extranjeros.

Uno de los problemas básicos que no ha permitido el desarrollo de cultivos tecnificados de anonaceas es la escasa oferta de material de siembra caracterizado y de óptima calidad fitosanitaria y genética de estas especies frutales. Actualmente en Colombia solo se distribuye comercialmente un clon seleccionado que ha sido caracterizado durante varios años, el clon ‘Elita’ (Rios Castaño *et al* 1996). Este clon tiene alta producción (191 Kg / árbol / año), excelentes características organolépticas de fruto (entre 13 y 19 % de sólidos solubles y 0,89 % de acidez) y un tamaño (3 Kg / fruto en promedio, Rios Castaño, descripción del clon “Elita”, Vivero Profrutales, Candelaria-Valle 2001) que lo hace apropiado para el procesamiento industrial, más no para el consumo en fresco, para el que son preferidos frutos de menor tamaño (comunicación personal con productores y comercializadores).

Es importante anotar que no se dispone de variedades de guanabana que presenten tolerancia a la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* P), la enfermedad más importante del guanabano, que puede producir pérdidas hasta del 90 % de la producción (Escobar y Sánchez, 1992). El control de la antracnosis en cultivos comerciales en Colombia, se realiza mediante aplicaciones permanentes, cada 10 a 25 días, de diferentes fungicidas: Benlate (al 1/1000), Mancozeb (Dithane M-45, al 10/1000), Captan (Orthocide, al 4/1000) entre otros (Escobar y Sánchez, 1992). Algunos de estos insumos químicos tienen una elevada toxicidad y estimulan el desarrollo de mecanismos de resistencia. El uso indiscriminado de fungicidas provoca cambios en aguas y suelos (p.ej. acidez), y alteraciones en las cadenas tróficas de los sistemas hidrobiológicos.

En el caso de las chirimoyas, y anones, existen más variedades seleccionadas y caracterizadas, las que se ofrecen comercialmente a los agricultores, en países que han importado estas especies como Estados Unidos, Australia, España e Israel, que en Colombia.

La variabilidad genética del guanabano y otras anonáceas existente en el país, puede ser utilizada de diferentes maneras para generar material de siembra de óptima calidad y mejorar las condiciones actuales del cultivo

- Mediante la búsqueda, selección y caracterización de los materiales es posible la identificación de individuos superiores a los clones disponibles actualmente, que posean una mayor tolerancia a la antracnosis y/o que se adapten a climas o suelos diversos (p.ej. a altitudes superiores a los 1200 msnm), y/o que produzcan frutos del tamaño y calidad que el mercado lo requiera
- Materiales de guanabana o especies de anonáceas afines, que muestren resistencia a enfermedades del suelo, robusticidad, adaptación a climas y tipos específicos de suelos pueden ser utilizadas como patrón o portainjerto, para ampliar la resistencia a enfermedades o el rango de adaptación de clones elite seleccionados. En Venezuela, país del cual Colombia importa la mayor cantidad de guanabana, el patrón que mejores resultados ha mostrado es *Annona purpurea* (Guzmán 1982). Al contrario en Colombia ningún material ha sido seleccionado exclusivamente para que sirva como patrón
- Hacia el futuro, en programas de mejoramiento genético de anonáceas, por medio de cruces entre variedades o especies y selección de genotipos específicos en la progenie de los híbridos es posible obtener nuevas variedades que combinen características deseables de diferentes especies. Es así como en Australia, Israel y los Estados Unidos se han seleccionado variedades de atemoya, un híbrido interespecífico entre el anon y la chirimoya, de excelente calidad y sabor (George *et al.*, 1987)

Además de la importancia que tiene la guanabana y las anonáceas afines en la alimentación humana y la economía del país, diferentes especies de anonáceas son ricas en compuestos bioactivos con potente actividad biológica, conocidos como acetogéninas (Tabla no 1). Las acetogéninas desde su descubrimiento (1982) se han convertido en uno de los grupos de productos naturales bioactivos de mayor crecimiento. Estos compuestos son considerados como unos de los más potentes inhibidores del complejo I (NADH ubiquinona oxidoreductasa) del sistema de transporte de electrones de las mitocondrias y de la enzima NADH oxidasa de la membrana plasmática, que es característica de células cancerígenas. Ciertas acetogéninas tienen la capacidad de inducir apoptosis (muerte celular programada) en células cancerígenas, probablemente como consecuencia de la supresión de la disponibilidad de ATP (McLaughlin *et al.* 1997). Acetogéninas de la guanabana y de otras anonáceas tienen un excelente potencial como biopesticidas y agentes antitumorales. Extractos crudos de acetogéninas de semillas de la guanabana, podrían ser utilizados como pesticidas económicos, efectivos y no contaminantes del medio ambiente (McLaughlin *et al.* 1997)

En varias especies de Anonaceas, entre ellas las de mayor valor hortícola la protoginia y la existencia de insectos que intervienen en la polinización, favorecen la polinización cruzada. Un requisito importante para el desarrollo de variedades con características especiales de calidad de fruto y resistencia a enfermedades y productividad, es la aplicación de métodos de propagación vegetativa una vez se ha identificado un individuo superior, para lograr mantener las características seleccionadas a lo largo del tiempo.

Por esta razón el establecimiento de cultivos de estos frutales por semilla, como se acostumbra en Colombia (se estima que el 95% de los cultivos de guanabana del país han sido establecidos con plantas propagadas sexualmente) produce variación genética, heterogeneidad en las plantas y la pérdida de las características agronómicas de interés. A esta práctica se puede atribuir la baja productividad de los cultivos comerciales de guanabano en Colombia, que está alrededor de 9 ton/ha.

Corporación Biotec y la Unidad de Biotecnología del CIA7 (Centro Internacional de Agricultura Tropical) han desarrollado una metodología de propagación *in vitro* de guanabano a través de la microinjertación (Royero *et al* 1999). Esta metodología, que podría ser adaptable a otras especies de Anonaceas, permite la propagación rápida de genotipos seleccionados. Su aplicación en programas de desarrollo de variedades sería de gran utilidad. Otra bondad de esta tecnología es la posibilidad de producir plantas libres de enfermedades y de esta manera evitar la difusión de enfermedades con el material de siembra, un riesgo constante de la propagación vegetativa.

Sin embargo para poder aprovechar esta tecnología en el desarrollo de variedades o en la producción de material de siembra para el establecimiento de cultivos comerciales se requiere la disponibilidad de genotipos promisorios, clones seleccionados o variedades caracterizadas.

C I Corpoica Palmira posee uno de los pocos bancos de germoplasma de anonáceas con énfasis en guanabana del mundo (Bettencourt *et al* , 1992), el cual cuenta con 31 accesiones de guanabana, y otras 11 accesiones de anonáceas afines. Este banco solo alberga una pequeña cantidad de las especies de anonáceas de Colombia y el trópico americano (9 especies de las más de 60 conocidas, ver Escobar y Sánchez, 1992). Actualmente se desconoce la variabilidad genética de las accesiones de guanabana que allí se conservan y si estas representan la variabilidad genética de la especie en el país, o si es necesario incrementar la colección. De la misma manera el valor hortícola de la colección aun no se ha evaluado completamente.

La presente propuesta tiene como objetivo hacer un inventario preliminar y caracterizar agromorfológica y molecularmente la variabilidad genética de guanabana y especies de

anonaceas afines nativas que se encuentran particularmente en C I Corpoica Palmira y en otros centros de investigacion

La caracterizacion agromorfologica permitira evaluar las accesiones disponibles principalmente desde el punto de vista de su utilizacion en la produccion de material de siembra de tipo clonal para el establecimiento de cultivos tecnificados Para la caracterizacion molecular se cuenta con tecnicas como los AFLP (Vos *et al* , 1995) Esta caracterizacion permitira aclarar dudas existentes sobre la clasificacion taxonomica de algunas de las especies de anonaceas del pais analizar la variabilidad de las accesiones de guanabana conservadas y detectar duplicados en la coleccion Esta informacion sera util para plantear estrategias de conservacion y uso sostenible de la diversidad de guanabanas y especies de anonaceas afines de Colombia

Este proyecto pretende contribuir a dar respuesta a las siguientes preguntas

¿Cual es la diversidad de anonaceas con que se cuenta en el pais, principalmente en bancos de germoplasma?

¿Esa biodiversidad es util en la produccion de material de siembra?

¿Contiene el banco de germoplasma una variabilidad genetica representativa de la biodiversidad de anonaceas del pais?

## 4.2 Materiales y métodos

### 4.2.1 Lugar de ejecución del proyecto

El proyecto fue ejecutado en el Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT, Km 17 recta Cali-Palmira (caracterización molecular) y en el C I Corpoica Palmira (caracterización agromorfológica)

### 4.3 Localización y Registro de Condiciones Agroecológicas del Banco de germoplasma de Guanabana y especies de Anonáceas relacionadas

La caracterización agromorfológica se inició en enero del año 2001 y se tomaron registros en campo durante 23 semanas. Las actividades se finalizaron el 16 de junio del 2002. El huerto de guanabana está localizado en el C I Corpoica el cual se encuentra a 3° 31' de latitud norte y 76° 19' de longitud oeste, altitud de 1008 m, con una precipitación promedio anual de 1288 mm, temperatura media anual de 24°C, brillo solar de 5.8 horas/día y humedad relativa de 75.0%. La zona se clasifica como Bosque Seco Tropical.

El material está ubicado en el lote N° 23 del C I Palmira, en un área aproximada de 1 hectárea. Los suelos según Rivillas e Ibarra (1975), corresponden a la serie Palmeras, se encuentran localizados en la Planicie Aluvial del Río Cauca, son de relieve plano, con profundidad efectiva de 1.2 m y de textura arcillo-limosa y presentan las siguientes características químicas:

pH	7	Reacción neutra a alcalina
M O	4.5	Alto contenido de materia orgánica
P	53.5	Alto contenido de fósforo
Ca	14.7	Alto contenido de calcio
K	0.58	Alto contenido de potasio
Na	0.2	Bajo contenido de sodio
C I C	32	De media a alta
C E	0.31	Baja

En general, los suelos son fértiles y aptos para siembra de cultivos semestrales en rotación pastos, frutales semipermanentes y permanentes.

#### **4 4            Composicion del Banco de Germoplasma**

El trabajo se adelanto con un total de 87 arboles de guanabana (*A muricata* L.) y 30 de anonas relacionadas, correspondientes a 31 y 11 accesiones respectivamente, establecidas en el C I Palmira. Informacion general sobre cada uno de los materiales se indica en la Tabla 1. Para adelantar la caracterizacion agromorfologica se identificaron tres arboles de cada accesion, con excepcion de 9 accesiones de las cuales solo existen uno o dos arboles. En total se registro informacion de 117 arboles correspondientes a 42 accesiones. A pesar de que algunos de los arboles fueron producidos por multiplicacion vegetativa, la informacion recopilada de cada arbol, fue manejada independientemente (Tabla 1)

Tabla 1 Accesiones de Guanabano (*A. muricata* L.) y de Especies de Anonas Relacionadas Existentes en el Banco de Germoplasma del C I Corpoica Palmira (Agosto – 2002)

ACCESIONES DE GUANABANA			
ACCESION	ORIGEN	METODO PROPAGACION	FECHA INTRODUCCION
1994 1 1994 2 1994 3	El Bolo – Valle	Semilla	I – 89
2045 1 2045 4 2045 5	Palmira – Valle	Semilla	X – 89
H 2 1	Sonso – Valle	Semilla	IX – 89
2512 7 2512 9 2512 10	Palmira Valle UNAL	Injerto	IX – 95
2511 3 2511 5 2511 11	V Gorgona – Valle	Injerto	IV – 95
H 1 1 H 1 3 H 1 4	Sonso – Valle	Semilla	IX – 89
2020-1 2020 2 2020 5	Buga – Valle	Semilla	VII – 89
2016 1 2016 3 2016 4	Buga – Valle	Semilla	IV – 89
2017 1 2017 2 2017 5	Buga – Valle	Semilla	IV – 89
1957 2 1957 3 1957 4	Caicedonia – Valle	Semilla	VIII – 87
1995 1 1995 2 1995 4	V Gorgona – Valle	Injerto	I – 89
1983 1 1983 2 1983 3	Palmira – Valle	Semilla	V – 87
1985 3 1985-4 1985 5	Bajo Calima – Valle	Semilla	V – 88
1946 6 1946 8 1946 10	Alcala – Valle	Semilla	VII – 87
1943 1 1943 3 1943 10	Palmira – Valle	Semilla	VII – 87
2014 2014 2	Barras Venezuela	Semilla	I – 89
2015 1 2015 2	Luisigusa – Cundinamarca	Semilla	II – 89
2036 1 2036 2 2036 3	Sonso – Valle	Injerto	IX – 89
2042 1 2042 2 2042-4	Sonso – Valle	Injerto	IX – 89
1921-4 1921 6 1921 9	Gnebra – Valle	Semilla	V – 87
2040 1 2040 2 2040 3	Sonso – Valle	Injerto	IX – 89
2041 2 2041 3 2040 4	Sonso – Valle	Injerto	IX – 89
2039 1 2039 2 2039 3	Sonso – Valle	Injerto	IX – 89
6 1 6 2 6 3	Palmira – Valle	Injerto	IX – 95
1918 3 1918 5 1918 9	Manizales – Caldas	Semilla	IV – 87
4 1 4 2	Palmira – Valle	Injerto	IX – 95
2037 1 2037 3 2037 4	Sonso – Valle	Injerto	IX – 89
2033 1 2033 3 2033 4	Sonso – Valle	Injerto	IX – 89
1 1 1 2	Palmira – Valle	Injerto	IX – 95
2513 1 2513 4 2513 7	CI Palmira – Valle	Injerto	II – 86
2514-10 2514 11 2514 12	Sonso Valle	Injerto	IX – 89

ANONAS RELACIONADAS			
NOMBRE	ORIGEN	METODO PROPAGACION	FECHA INTRODUCCION
1959 1 1959 2	Sabaletas – Chocó	Semilla	VIII – 87
1958 1 1958 2 1958 3	Sabaletas – Chocó	Semilla	VIII – 87
1919 2 1919 3 1919 7 <sup>1</sup>	Sumina – Caldas	Semilla	V – 87
1920 1 1920 2 1920 3	Victoria – Caldas	Semilla	V – 87
Cabeza de Negro 2 Cabeza de Negro 3 Cabeza de Negro 4	Desconocido	Semilla	VIII – 79
Chirimoya 1	Palmira – Valle	Semilla	VII – 63
Anona Colorada 1 Anona	Desconocido	Semilla	X – 36

Colorada 3 Anona Colorada 4			
<b>Biriba 1 Biriba 2 Biriba 3</b>	Brisol	Semilla	V – 59
Anona Blanca 2 <b>Anona Blanca 3</b> Anona Blanca 4	Palmito – Valle	Semilla	V – 70
<i>Annona glabra</i> 1 <i>Annona glabra</i> 2 <i>Annona glabra</i> -3	Baudo Choco	Semilla	Pendiente
<i>Annona montana</i> -1 <i>Annona montana</i> 2 <i>Annona montana</i> 3	Baudo – Choco	Semilla	Pendiente

**Nota 1** Los híbridos H 1 y H 2 corresponden a semilla originada por cruzamientos entre arboles de *A. muricata* seleccionados en 1989 en la Finca del señor Diego Lince. Los cruzamientos fueron H-1 (fruto pequeño x fruto grande) H-2 (fruto grande x fruto grande)

**Nota 2** Por observaciones hechas de la morfología del árbol y del fruto, además de los resultados de la caracterización molecular, las accesiones 1919, 1920, 1958 y 1959 se trasladaron durante el proyecto al grupo de las anonas relacionadas.

**Nota 3** Los árboles evaluados por medio de marcadores AFLPs se encuentran resaltados en negrilla.

#### 4.4.1 Accesiones utilizadas para la caracterización molecular

A nivel molecular y en lo que respecta al guanabano, se analizó un total de 42 muestras que corresponden a un árbol de cada una de las accesiones del banco de germoplasma (marcados en la Tabla 1 en negrilla), además del clon “Elita” del Vivero Profrutales (Candelaria- Valle), otros clones seleccionados como altamente productivos de cultivos comerciales en fincas del departamento del Huila (marcados con códigos AMUR-H2, H3 y H4) además de otros materiales de diversa procedencia (Tabla 2). En lo que respecta a especies de anonáceas relacionadas de importancia hortícola, se analizaron 11 accesiones del banco (Tabla 1, resaltadas en negrilla), y otros materiales de diversa procedencia, más que todo de fincas del Valle del Cauca (Tabla 2). Estos últimos materiales se reconocen por sus nombres comunes o locales, pero no han sido completamente identificados a nivel taxonómico.

Tabla 2 Accesiones de guanabanos y especies de anonaceas afines que estan siendo utilizadas por la C Biotec y el CIAT en la propagacion clonal *in vitro* (como yema o patron) y que fueron caracterizadas molecularmente en la presente investigacion

CODIGO	NOMBRE LOCAL	PROCEDENCIA Lugar (Depto )	LOCALIZACION <sup>1</sup> ARBOL EVALUADO AFLPs	METODO DE PROPAGACION	ESPECIE
AMUR V1	Guanabano Clon Elita	Vivero Profrutales Candelaria (Valle)	AMUR V1 1 (semilla) CM <sup>2</sup> AMUR V1 2 (clon) CM	Injerto	<i>A muricata</i>
AMUR H2	Guanabano Clon Rosa	Yaguara (Huila)	AMUR H2 1 (semilla) I/26 AMUR H2 2 (clon) CM	Injerto	<i>A muricata</i>
AMUR H3	Guanábano Clon Cristina	Yaguara (Huila)	AMUR H3 1 (semilla) J/23 AMUR H3 2 (clon) CM	Injerto	<i>A muricata</i>
AMUR H4	Guanabano Clon Francia	Yaguara (Huila)	AMUR H4 (clon) CM	Injerto	<i>A muricata</i>
AMUR M5	Guanábano	Cienega (Magdalena)	AMUR M5 2 D/23	Semilla	<i>A muricata</i>
AMUR A7	Guanabano	Turbo (Antioquia)	AMUR A7 2 G/24	Semilla	<i>A muricata</i>
AMUR V9	Guanábano	Villa Gorgona (Valle)	AMUR V9 -2 I/24	Semilla	<i>A muricata</i>
ASP V20	Anona Blanca Lisa	Finca la Esneida Guacarí (Valle)	ASP V20 1 B/25	Semilla	<i>A squamosa</i> ?
ASP V21	Chirimoya Imbanaco	Cali (Valle)	ASP V21 1 CM	Semilla	<i>A cherimolia</i>
ASP Q22	Chirimoya	Armenia (Quindio)	ASP Q22 CM	Semilla	<i>A cherimolia</i>
ASP GN31	Anon Amazónico	Margen Rio Inirida (Guainia)	ASP GN31 4 F/30	Semilla	<i>Rollinia mucosa</i> ?
ASP VA32	Anon Amazónico	(Vaupés)	NO	Semilla	<i>Rollinia mucosa</i> ?
ASP GV33	Anon Amazónico	Finca la Primavera San Jose (Guaviare)	ASP GV33 0 CM	Semilla	<i>Rollinia mucosa</i> ?
ASP GV34	Anon Amazónico	Finca la Primavera San Jose (Guaviare)	ASP GV34 2 I/28	Semilla	<i>Rollinia mucosa</i> ?
ASP VA35	Anon Amazónico	(Mitu) Vaupes	ASP VA35 1 G/27	Semilla	<i>Rollinia mucosa</i> ?
ASP V36	Anon Amazonico	Desconocido (Donado por Carton Colombia)	ASP V36 1 Al frente del hotel CIAT	Semilla	<i>Rollinia mucosa</i> ?
ASP Q38	Anon	La Tebaida (Quindio)	ASP Q38 1 C/24	Semilla	?
ASP V41	Atcmoya	Finca la Esneida. Guacarí (Valle)	ASP V41 3 F/25	Semilla	<i>A cherimolia</i> x <i>A squamosa</i>
ASP V42	Atcmoya	Finca Venecia Caicedonia (Valle)	ASP V42 1 J/27	Semilla	<i>Rollinia mucosa</i> ?
ASP V43	Atcmoya	Desconocido Almacenes Lito Cali (Valle)	ASP V43 B E/24	Semilla	<i>A cherimolia</i> x <i>A squamosa</i>
ASP V45	Atcmoya	Finca Varahonda Pradera (Valle)	ASP V45 CM	Semilla	<i>A cherimolia</i> x <i>A squamosa</i>
ASP V46	Chiriguana bana	Casa Ciudad Jardin Cali (Valle)	ASP V46 CM	Semilla	?
ASP V47	Chirimoya	Bolo (Valle)	ASP V47 CM	Semilla	?
ASP V48		USA	ASP V48 CM	Semilla	?

CODIGO	NOMBRE LOCAL	PROCEDENCIA Lugar (Depto )	LOCALIZACION <sup>1</sup> ARBOL FVALUADO AFLPs	METODO DE PROPAGACION	ESPECIE
ASP PR49		Puerto Rico	ASP PR49 CM	Semilla	?
AMON V51	Guanábana Cimarrona	Inca la Esneda, Guacari (Valle)	AMON V51 2 E/28	Semilla	<i>A montana</i>
AMON V152	Guanabana Cimarrona	Cumaribo (Vichada)	AMON V152 1 D/27	Semilla	<i>A montana</i>
AMON H53	Guanabana Cimarrona	(Huila)	AMON H53 2 A/28	Semilla	<i>A montana</i>
AMON V54	Guanabana Cimarrona	Palmira (Valle)	AMON V54 4 C/30	Semilla	<i>A montana</i>
ASP V59	Anon	Desconocido Almacenes Lito Cali (Valle)	ASP V59 2 B/24	Semilla	<i>A squamosa?</i>
ASP CV61		Costa Pacifica (lmites Valle Chocó)	ASP CV61 2 E/30	Semilla	<i>A glabra?</i>
ASP A62	Guanabanilla	Turbo (Antioquia )	ASP A62 4 H/30	Semilla	<i>A glabra?</i>
ASP CU63	Anon Liso	Mercado de Girardot (Cundinamarca)	ASP CU63 1 C/23	Semilla	?
ASP T64	Anón	Espinul (Iolima)	ASP 164 1 A/23	Semilla	<i>A squamosa?</i>
ASP BR60		Brasil	ASP BR60 2 CM	Semilla	?
ASP VR65		Robles (Valle)	ASP VR65 a CM	Semilla	?
ASP VR66		Robles (Valle)	ASP VR66 CM	Semilla	?

<sup>1</sup>En la parcela del CIAT o en la casa de malla (CM) de la Unidad de Biotecnología del CIAT

<sup>2</sup>NO no fue incluido en el analisis molecular

Las accesiones analizadas pertenecen a especies de los generos *Annona* y *Rollinia*

## 4 5 Mantenimiento del Banco de Germoplasma

### 4 5 1 Control de Malezas

En las calles se realiza cada 21 dias con guadaña accionada por el tractor Alrededor del arbol se platea mediante la aplicacion de Round up + urea (2 l + 1 kg ) / 55 galones de agua, luego de dos controles quimicos, se hace plateo con guadaña manual, para despues repetir el control quimico

### 4 5 2 Podas

Cada 6 meses se eliminan chupones, ramas enfermas y secas, en esta forma se mantiene el arbol a una altura maxima de 3 5 m Durante el proceso se desinfecta la herramienta al pasar

de un árbol a otro y se cicatriza la parte cortada. Durante el recorrido diario se realiza poda sanitaria mediante recolección de ramas, hojas, flores y frutos afectados por antracnosis.

#### 4.5.3 Fertilización

Se realiza según análisis de suelo cada 3 meses y en corona con los siguientes productos:

Producto	Dosis / Planta (g)
DAP	260
Urea	213
Sulfato de Potasio	120
Borax	25
Quelato de Zinc	34
Gallinaza	10000

#### 4.5.4 Riego

Luego de la fertilización se aplica riego por gravedad cada 15 – 20 días.

#### 4.5.5 Embolsado

Para prevenir la instalación de los insectos *Bephratelloides maculicollis* y *Cerconota annonella* se realizó el embolsado de los frutos cuando alcanzaron de 3 a 5 cm de longitud, utilizando bolsas plásticas impregnadas con insecticida.

#### 4.5.6 Manejo de Plagas y Enfermedades

En el huerto se realizó la identificación previa de varios insectos – plaga y enfermedades destacando el tipo de daño y la severidad del mismo así:

INSECTOS PLAGAS	TIPO DE DAÑO	SEVERIDAD
Chinche encaje ( <i>Corythuca sp</i> )	Chupador del follaje	Alta
Afidos ( <i>Aphis sp</i> )	Chupador del follaje	Baja
Acaros ( <i>Eriophyes sp</i> )	Chupador del follaje	Alta
Lorito verde ( <i>Empoasca sp</i> )	Chupador del follaje	Media
Mosca blanca ( <i>Aleurodicus sp</i> )	Chupador del follaje	Baja
Pasador del fruto ( <i>Cerconota annonella</i> )	Perforador	Baja
Membracido ( <i>Aconophora sp</i> )	Chupador del follaje	Baja
Avispa perforadora del fruto ( <i>Bephratelloides maculicollis</i> )	Perforador	Baja

ENFERMEDADES	TIPO DE DAÑO	SEVERIDAD
Antracnosis ( <i>Collectotrichum gloesporoides</i> )	Lesiones necróticas oscuras de bordes definidos Afecta hojas, ramas, flores y frutos. Causa defoliación y momificación en frutos pequeños. En frutos causa la pudrición seca, la cual invade la parte interior.	Media a Alta
Mancha blanca ( <i>Cercospora annonae</i> )	Lesiones redondeadas de color café oscuro. Causa defoliación.	Alta

**Nota:** calificación del daño (severidad 0 a 3) donde 0 es inexistente y 3 es muy alta

#### 4.5.7 Mecanismos de Control Utilizados

##### *Insectos Plagas*

Se efectuó recolección permanente de material vegetal afectado

- Malathion 57% 40 cc/20 l agua Para chinches, áfidos, lorito verde y mosca blanca
- Micobiol HE 10 g/l Para chinches, áfidos, lorito verde y mosca blanca
- Agromm 10 g/l Para chinches, áfidos, lorito verde, mosca blanca y ácaros
- Biomel 10 g/l Para Mosca blanca y lorito verde

Se continuó rotación con segunda aplicación de malathion una vez se incrementaron las poblaciones

##### *Enfermedades*

Recolección permanente de material vegetal afectado

Micobiol T 10 g/l para prevención de antracnosis y cercospora

## 4 6 Metodología utilizada para la caracterización agromorfológica

### 4 6 1 Evaluación de Parámetros

#### *Arquitectura del Arbol*

Como descriptor de esta característica se tomó la distribución de las ramas en el árbol. En esta forma los materiales fueron calificados como densos o esparcidos y de forma cónica u ovada.

#### *Robusticidad (Diámetro del Tronco en cm) y Volumen del Arbol*

El descriptor de esta característica lo definió el diámetro del tronco, el cual es indicativo de desarrollo vegetativo y la capacidad metabólica del árbol. Dos mediciones se realizaron a 50 cm de altura de la base, al comienzo y al final de los semestres A y B. El volumen de la copa se registró igualmente durante los semestres A y B y se determinó mediante la aplicación de la fórmula:

$$V = h (D^2 \Pi) / 4, \text{ donde}$$

$$V = \text{volumen en m}^3,$$

h = altura de la copa en metros,

D = es la medida resultante entre el diámetro de la copa oriente – occidente y diámetro de la copa norte – sur,  $\Pi = 3.1416$

#### *Polinización Natural y Producción*

Para la evaluación de estas características se realizaron lecturas cada 15 días de flores, erizos, frutos en desarrollo y frutos cosechados con su respectivo peso. El porcentaje de polinización natural se determinó en forma indirecta al relacionar el número de frutos cosechados con el número de flores registradas en los estados II y III (flores semiabiertas, Escobar y Sánchez 1992). La producción se calculó mediante el registro del número y peso total de frutos por árbol de cada accesión.

#### *Incidencia de Antracnosis*

El registro de Antracnosis para cada uno de los árboles evaluados de las 42 accesiones, se realizó cada 15 días, para lo cual se utilizó una escala de calificación de 0 a 3, donde

0 = No incidencia

1 = Baja incidencia

2 = Incidencia Media

3 = Alta Incidencia

A través de Tablas de distribución de frecuencias se estableció la calificación del grado de incidencia de antracnosis para cada árbol de la siguiente manera

Se calcula la distribución de frecuencias relativas del grado de incidencia en cada árbol de cada accesión ( $f_i$ ), donde  $i = 0, 1, 2, 3$

Se calcula la distribución de frecuencias relativas del grado de incidencia general, para todos los árboles de las accesiones ( $F_i$ ), donde  $i = 0, 1, 2, 3$

Como criterio de asignación del grado de incidencia definitivo de la enfermedad para cada árbol se tomó la siguiente regla de decisión

Si  $f_i > F_i$ , entonces el grado de incidencia para el árbol es  $i$ , para  $i = 0, 1, 2, 3$

Si existen dos casos donde  $f_i > F_i$ , se asigna el  $i$  que presente la mayor diferencia entre  $f_i - F_i$

Con el anterior procedimiento se calificó el grado de incidencia definitivo para cada uno de los 117 árboles evaluados

### *Calidad Organoléptica De Frutos*

Se tiene en cuenta que la calidad es un concepto que comprende numerosos atributos tanto físicos como químicos. Para el presente trabajo la característica se basó principalmente en la determinación de

Peso y tamaño del fruto, sabor y aroma, sólidos solubles y acidez. La actividad se realizó en el laboratorio del C I Corpoica Palmira y para cada carácter se aplicó un procedimiento, acompañado de una calificación así

### *Peso y Tamaño del Fruto*

Esta característica se determinó una vez cosechado y lavado el fruto y después de revisar que no estuviese afectado por algún daño. La calificación se determinó mediante tres valores límites así:

Calificación	Característica
< 1 kg	Fruto Liviano
1 l a 3 0 kg	Fruto Mediano
3 l a 5 kg	Fruto Pesado
> 5 l kg	Fruto Muy Pesado

### *Aroma y Sabor*

Para determinar estas características se tuvo en cuenta que “el aroma” está conformado por dos componentes: sabor y olor. El sabor se calificó por la sensación al probar el jugo, mientras que el olor se determinó por estímulo de receptores olfativos de los componentes orgánicos volátiles de la guanabana. La calificación fue la siguiente:

Calificación	Característica
0 – 2 0	Sin aroma ni sabor
2 1 – 4 0	Agradable aroma y sabor
4 1 – 5 0	Excelente sabor y aroma

### *Grados Brix (Sólidos Solubles)*

Esta característica, representada principalmente por los azúcares, fue determinada en el refractómetro aplicando el protocolo adaptado por Gallo Pérez (1997, Anexo 1) y fue calificada mediante tres valores límites así:

Calificacion	Caracteristica
< 10	Bajos contenidos
10 – 12	Contenidos medios
> 12	Altos contenidos

### *Acidez*

Esta característica representada por los ácidos predominantes en la fruta fue determinada mediante la aplicación del protocolo adaptado por Gallo Perez (1997, Anexo 1) y fue calificada mediante tres valores límites así:

Calificacion	Caracteristica
> 10	Alta
0.71 – 1.0	Media
< 0.71	Baja

### *Longitud diámetro peso de la pulpa corteza y columella número y peso de semillas*

Otros parámetros relacionados con la calidad de los frutos, como longitud y diámetro, peso de la pulpa, corteza y columella, número y peso de semillas, fueron medidos en una gran cantidad de frutos pero no fueron incluidos dentro del análisis estadístico por no contar con una muestra representativa para varios de las accesiones evaluadas. Estos se presentan sin embargo en el Anexo 2.

## **4.7 Metodología Utilizada para la Caracterización molecular**

La caracterización molecular se realizó a través de dos actividades principales, la obtención de los marcadores de tipo AFLP de las diferentes accesiones, y el análisis comparativo de estos marcadores entre dichas accesiones.

### **4.7.1 Obtención de Marcadores AFLP de las Accesiones**

Para obtener los AFLP primero se colectó tejido foliar de las diferentes accesiones a continuación se extrajo su ADN y luego se aplicó la técnica de AFLP desarrollada por Vos *et al.*, 1995.

## 4 7 2      **Recoleccion de Tejido Foliar**

En experimentos preliminares se ensayaron tres metodos de recoleccion de tejido foliar joven para la extraccion de ADN   recoleccion en nitrogeno liquido, en hielo y en silica-gel

### *Metodologia de Recoleccion en Silica Gel*

Cinco a 10 hojas juvenes sin lignificacion fueron colectadas de cada arbol y guardadas en una bolsa plastica de sellado hermetico con perlas de silica-gel deshidratadas Estas bolsas debidamente marcadas con el numero del individuo colectado se almacenaron en un sitio seco hasta su llegada al laboratorio Una vez allí a cada bolsa de muestras se le cambio periodicamente la silica-gel para continuar con el secado del tejido hasta la extraccion del ADN

### *Metodologia de Recoleccion en Hielo*

Cinco a diez hojas juvenes fueron colectadas de cada arbol y depositadas en bolsas plasticas de cierre hermetico y almacenadas en una nevera de icopor y cubiertas con sustitutos de hielo "Blue ice" (Rubbermaid) En el laboratorio las bolsas se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la extraccion del ADN

### *Metodologia de Recoleccion en Nitrogeno Liquido*

La misma cantidad de hojas juvenes guardadas en bolsas plasticas marcadas se introdujeron en nitrogeno liquido en un termo, y una vez en el laboratorio se transfirieron a un congelador de  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la extraccion del ADN

Temiendo en cuenta la experiencia con la silica-gel y lo engorroso y costoso que puede resultar la manipulacion de nitrogeno liquido en campo, las muestras (tejido foliar de muestras faltantes y degradadas anteriormente) se recolectaron en hielo y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la extraccion del ADN

## 4 7 3      **Extraccion de ADN**

Se utilizo la metodologia descrita por Dellaporta *et al* (1983), aplicando dos variaciones principales la utilizacion del antioxidante Polyvinylpirrolidone (PVP) en el buffer de extraccion al 1 %, y dos lavados con cloroformo / alcohol isoamilico (24 / 1) antes de la precipitacion del ADN Igualmente la metodologia se adapto para realizarla en tubos

ependorf de 1.5 ml. El protocolo está descrito paso a paso en el anexo 2 (protocolos de marcadores moleculares estandarizados)

#### **4.7.4 Producción de los AFLPs**

Los marcadores AFLP se generaron aplicando la metodología desarrollada por Vos *et al* (1995) y siguiendo el protocolo del Kit AFLP Analysis System I de Gibco BRL (Life Technologies, ahora Invitrogen). Los patrones de AFLP de las diferentes muestras se visualizaron en geles de poliacrilamida al 6 % teñidos con nitrato de plata (anexo 3, geles de la caracterización molecular). Los protocolos de AFLP y tinción con plata están descritos en el anexo 2.

Con las metodologías estandarizadas se evaluaron 15 combinaciones de cebadores en las amplificaciones selectivas (Tabla 8, anexo 2). Se verificó la reproducibilidad de los patrones de AFLP de las 4 combinaciones de cebadores que mayores polimorfismos presentaron. El análisis de variabilidad genética de las accesiones disponibles se realizó con las combinaciones de cebadores F, M y N (Tabla 8, anexo 2).

#### **4.7.5 Análisis Comparativo de los Marcadores AFLP entre las Diferentes Accesiones**

Los patrones de AFLP de las diferentes muestras se registraron como presencia (1) o ausencia (0) de bandas y se compararon entre sí mediante un análisis de agrupamientos (“cluster”) realizado a partir de las similitudes genéticas calculadas entre ellas.

##### *Calculo de Similitud Genética*

Las similitudes genéticas entre las accesiones de guanábano, y entre las especies de anonáceas, fueron calculadas, para cada par de individuos, con el coeficiente de Nei-Li (1979)

$$S = 2a / (2a + b + c)$$

S: similitud,

a: bandas compartidas por ambos individuos

b: bandas presentes en el individuo 1 pero no en el 2

c: bandas presentes en el individuo 2 pero no en el 1

y posteriormente fueron organizadas en una matriz de similitud

### *Analisis de Agrupamiento*

Las matrices de similaridad fueron analizadas con el metodo UPGMA (“unweighted paired grouped mean arithmetics” – Sneath y Socol, 1973) del programa estadistico NTSYS (Rohlf, 1994) para determinar dendrogramas. Se establecieron correlaciones entre las matrices de similaridad con el NTSYS.

## **4 8            Resultados y Discusion**

### **4 8 1            Caracterizacion Agromorfologica**

#### *Arquitectura del Arbol*

Aunque por lo general la arquitectura de un arbol frutal debe ser formada por el agricultor mediante podas, esta característica es influenciada igualmente por el genotipo. La utilización en cultivos comerciales de accesiones con arquitecturas que permitan la circulación del aire al interior del arbol, puede disminuir el riesgo de desarrollar enfermedades en el cultivo (en especial de la *Antracnosis*) y de esta manera bajar los costos de producción.

En general la distribución de las ramas en los arboles de *Annona muricata* es densa y compacta, y la copa es de forma conica con un eje central principal. De las 8 anonas relacionadas 6 tienen ramas compactas, y son de forma conica mientras que en la accesion clasificada como chirimoya (que a la postre no agrupo en el analisis con marcadores moleculares con accesiones pertenecientes a la especie *A. cherimola* sino con otras pertenecientes a la *A. reticulata*) y Anona Blanca, tienen ramas esparcidas y son de forma ovada.

Con esta arquitectura del arbol delineada en gran parte por la poda ha sido posible mantener el arbol con densidad, volumen y forma definida para que no compita con sus adyacentes y se logre alta eficiencia de la copa ya sea con producción de follaje o con formación de flores.

Dentro de los materiales evaluados de *A. muricata*, es destacable la accesion 2513 (arbol 1) por presentar una distribución equilibrada de las ramas y un interior algo descubierto que favorece la circulación del aire. Caso similar se presenta en Cabeza de Negro, con la diferencia de que en este ultimo se forma una copa mas cerrada debido a la alta densidad de hojas y ramas.

### *Robusticidad del Arbol y Volumen de la Copa*

Aunque la robusticidad y el tamaño de un árbol varía de acuerdo a la edad de este. Debido a que los árboles evaluados fueron sembrados en diferentes años, esta característica no puede ser comparada entre las accesiones. Si embargo su evaluación puede aportar información sobre la adaptabilidad de una accesión a condiciones agroecológicas determinadas, sobre el desarrollo vegetativo y potencial productivo de un árbol. La robusticidad se midió con base en el diámetro del tronco, en dos épocas del año (Tabla 3). Al respecto, trabajos en cacao demuestran que existe una correlación positiva entre grosor del tronco y producción de mazorcas en poblaciones clonales (Foxopeus, 1987). Esta respuesta no fue evidente en *A. muricata* ni en las anonas relacionadas. Es probable que en las especies analizadas esta característica no pueda usarse como indicativo de la producción de frutos, o que deba usarse con cuidado, debido a que una baja tasa de polinización natural (asociada en el guanabano y en las otras especies con el fenómeno de la protoginia o a la falta de insectos polinizadores), como la que se midió en este estudio puede afectar negativamente la expresión del potencial productivo de una accesión.

La información recopilada muestra que las tres accesiones de Cabeza de Negro, presentaron los mayores volúmenes de copa con 735.4, 927.8 y 719.2 m<sup>3</sup> respectivamente en el semestre B y el mayor diámetro del tronco con 41.4, 54.7 y 31.8 cm respectivamente, le siguieron las accesiones identificadas 2513-1, 2513-4 y 2513-7 con 357.7, 236.2 y 215.0 m<sup>3</sup> de copa respectivamente y con 31.5, 26.1 y 23.2 cm de diámetro del tronco (Tabla 3).

De acuerdo con los datos tomados el incremento en volumen de la copa varió entre -3.3 y 338.5 m<sup>3</sup>, mientras que el incremento del diámetro del tronco varió entre 0 y 2.2 cm. No se detectó ninguna correlación entre el crecimiento del volumen de la copa y el del diámetro del tronco, lo que es evidente en el árbol 4 de la accesión Cabeza de Negro, que fue el que más crecimiento mostró en el volumen de la copa mientras que en el diámetro del tronco no mostró ninguna variación.

Tabla 3 Evaluación de crecimiento de las accesiones de *Annona muricata* y de especies de anonáceas relacionadas con respecto a volumen y diámetro del tronco Corpoica CI Palmira Agosto 2002

ACCESIONES GUANABANA						
NOMBRE	VOLUMEN (m <sup>3</sup> )			ROBUSTICIDAD (Diámetro Tronco cm)		
	SEM A	SEM B	VAR	SEM A	SEM B	VAR
1994 1	65 4	114 5	49 1	19 7	20 7	1 0
1994 2	22 25	42 1	19 9	15 6	15 6	0
1994 3	88 55	112 1	23 6	21 0	21 0	0
2045 1	63 77	90 9	27 1	19 7	19 7	0
2045 4	41 58	66 2	24 6	17 2	17 8	0 6
2045 5	82 30	133 5	51 2	20 4	21 0	0 6
H 2 1	93 35	165 1	71 8	18 5	18 8	0 3
2512 7	70 57	81 7	11 1	19 1	19 4	0 3
2512 9	43 29	56 8	13 5	15 6	15 6	0
2512 10	53 03	84 1	31 1	18 1	18 5	0 3
2511 3	38 41	52 5	14 1	14 3	15 9	1 6
2511 5	32 27	50 5	18 2	22 6	22 6	0
2511 11	32 27	63 4	31 1	15 9	16 2	0 3
H 1 1	83 36	122 7	39 3	18 1	18 8	0 6
H 1 3	116 51	159 3	42 8	20 4	20 4	0
H 1 4	85 01	105 0	20	18 8	19 4	0 6
2020 1	107 23	194 5	87 3	22 9	23 6	0 6
2020 2	75 57	135 0	59 4	21 0	21 6	0 6
2020 5	94 32	199 1	104 8	22 3	22 6	0 3
2016 1	109 16	156 3	47 1	22 6	22 6	0
2016 3	111 16	153 4	42 2	23 2	23 2	0
2016 4	88 33	107 6	19 3	21 3	21 3	0
2017 1	164 71	252 8	88 1	27 4	28 0	0 6
2017 2	131 14	170 2	39 1	29 6	29 9	0 3
2017 5	119 71	174 5	54 8	29 0	29 0	0
1957 2	76 15	127 9	51 8	21 3	21 6	0 3
1957 3	92 13	148 0	55 9	23 2	23 6	0 3
1957 4	60 46	115 6	55 1	20 4	20 7	0 3
1995 1	51 98	79 7	27 7	16 9	17 2	0 3
1995 2	50 85	89 9	39 1	20 7	20 7	0
1995 4	28 96	58 2	29 2	15 6	15 9	0 3
1983 1	110 90	129 0	18 1	21 6	21 6	0
1983 2	148 34	243 6	95 3	28 6	29 0	0 3
1983 3	146 54	250	103 5	25 8	25 8	0
1985 3	17 18	27 4	10 2	16 2	16 2	0
1985 4	44 18	55 0	10 8	15 9	16 2	0 3
1985 5	49 29	54 0	4 7	14 3	14 6	0 3
1946 6	25 91	66 0	40 1	15 6	16 9	1 3
1946 8	34 95	72 8	37 9	17 5	18 1	0 6
1946 10	47 72	86 1	38 4	16 6	16 6	0
1943 1	73 21	108 9	35 7	19 4	19 7	0 3
1943 3	98 76	123 8	25 0	22 0	22 3	0 3

ACCESIONES GUANABANA						
NOMBRE	VOLUMEN (m <sup>3</sup> )			ROBUSTICIDAD (Diámetro Tronco cm)		
	SEM A	SEM B	VAR	SEM A	SEM B	VAR
1943 10	82 80	135 9	53 1	20 4	20 7	0 3
2014 1	11 32	30	18 7	14 0	14 3	0 3
2014 2	41 74	63 2	21 5	20 4	20 4	0
2015 1	30 04	48 7	18 7	14 0	14 0	0
2015 2	55 05	79 6	24 6	18 8	19 1	0 3
2036 1	24 62	35 6	11 0	15 6	15 6	0
2036 2	34 30	56 8	22 5	15 6	15 9	0 3
2036 3	31 21	46 4	15 2	15 9	16 2	0 3
2042 1	54 81	70 7	15 9	19 1	19 4	0 3
2042 2	116 41	148 1	31 7	21 6	21 6	0
2042 4	78 23	103 5	25 3	21 3	21 3	0
1921 4	86 25	155 2	69 0	22 9	23 2	0 3
1921 6	102 92	203 4	100 5	24 8	25 5	0 6
1921 9	54 89	65 3	10 4	14 6	15 0	0 3
2040 1	93 64	167 6	74 0	21 0	21 3	0 3
2040 2	31 09	52 4	21 3	16 6	16 6	0
2040 3	27 34	41 9	14 6	18 8	18 8	0
2041 2	21 32	26 2	4 9	16 6	16 6	0
2041 3	28 42	29 1	0 7	16 9	17 2	0 3
2041 4	36 04	45 4	9 4	15 6	15 9	0 3
2039 1	25 75	33 4	7 7	16 2	16 6	0 3
2039 2	56 38	65 1	8 7	19 1	19 1	0
2039 3	52 3	71 2	18 9	16 9	17 2	0 3
6 1	57 3	66 5	9 2	15 6	15 9	0 3
6 2	49 05	51 1	2 1	15 3	15 3	0
6 3	46 37	51 4	5 0	15 3	15 6	0 3
1918 3	107 94	179 7	71 8	24 8	25 1	0 3
1918 5	164 7	234 4	69 7	26 7	27 4	0 6
1918 9	109 16	154 4	45 2	22 6	22 9	0 3
4 1	65 47	97 7	32 2	16 9	17 8	1 0
4 2	56 02	71 3	15 3	14 0	14 3	0 3
2037 1	27 92	33 6	5 7	18 5	18 5	0
2037 3	45 42	60 2	14 8	22 9	23 2	0 3
2037 4	33 13	67 3	34 2	19 4	19 7	0 3
2033 1	104 42	134 0	29 6	21 6	21 6	0
2033 3	30 64	28 0	2 6	13 4	13 7	0 3
2033 4	70 14	91 7	21 6	18 5	18 5	0
1 1	93 84	169 5	75 7	18 5	20 1	1 6
1 2	116 02	132 8	16 8	21 6	21 6	0
2513 1	261 37	357 7	96 3	31 5	31 5	0
2513 4	203 66	236 2	32 5	26 1	26 1	0
2513 7	107 82	215 0	107 2	22 6	23 2	0 6
2514 10	172 74	227 9	55 2	24 5	25 5	1 0
2514 11	95 74	130 6	34 9	18 8	19 4	0 6
2514 12	242 76	277 1	34 3	38 8	38 8	0
1959 1	148 01	187 0	39 0	27 4	27 7	0 3

ACCESIONES GUANABANA						
NOMBRE	VOLUMEN (m <sup>3</sup> )			ROBUSTICIDAD (Diámetro Tronco cm)		
	SEM A	SEM B	VAR	SEM A	SEM B	VAR
1959 2	119 36	158 1	38 7	25 8	26 1	0 3
1958 1	161 82	225 7	63 9	31 8	31 8	0
1958 2	69 11	72 3	3 2	33 4	33 7	0 3
1958 3	181 74	188 7	7 0	29 6	29 6	0
1919 2	72 13	117 9	45 8	21 3	22 0	0 6
1919 3	79 63	94 4	14 8	22 6	23 2	0 6
1919 7	111 60	157 4	45 8	28 3	28 6	0 3
1920 1	111 02	151 5	40 5	27 4	27 7	0 3
1920 2	60 32	88 6	28 3	16 6	16 6	0
1920 3	117 05	139 8	22 8	28 0	28 0	0
Cabeza de Negro 2	566 05	735 4	169 4	41 4	41 4	0
Cabeza de Negro 3	840 41	927 8	87 4	54 7	54 7	0
Cabeza de Negro 4	383 42	719 2	335 8	31 8	31 8	0
Chirimoya 1	58 15	60 9	2 8	14 3	14 3	0
Anona Colorada 1	129 88	168 5	38 6	15 9	15 9	0
Anona Colorada 3	56 27	73 1	16 8	12 4	12 4	0
Anona Colorada 4	90 93	129 8	38 9	14 0	14 0	0
Biriba 1	89 24	105 9	16 7	19 7	19 7	0
Biriba 2	151 26	187 9	36 6	26 7	26 7	0
Biriba 3	180 06	196 8	16 7	25 5	25 5	0
Anona Blanca 2	3 63	4 8	1 2	9 5	10 2	0 6
Anona Blanca 3	26 68	23 4	3 3	11 1	13 4	2 2
Anona Blanca 4	35 65	45 3	9 7	15 0	15 0	0
<i>Annona glabra</i> 1	86 54	144 2	57 7	16 6	16 6	0
<i>Annona glabra</i> 2	73 55	113 3	39 8	17 2	17 2	0
<i>Annona glabra</i> 3	60 64	100 1	39 5	15 6	15 6	0
<i>Annona montana</i> 1	168 35	251 1	82 8	28 6	29 3	0 6
<i>Annona montana</i> 2	138 13	204 5	66 4	25 5	25 8	0 3
<i>Annona montana</i> 3	91 18	125 8	34 6	21 6	21 6	0

#### *Polinización Natural y Productividad (kg Promedio árbol/año)*

En el guanabano diversos autores han reportado frecuencias bastante bajas de polinización natural y 'cuajamiento' de frutos de entre 2 y 3% para diferentes regiones del país entre estas el Valle del Cauca (Escobar y Sanchez 1992) Aunque se ha reportado que la guanabana es autógama (Escobar y Sanchez 1992) esto no se ha podido comprobar en 4 clones diferentes mantenidos en condiciones de invernadero del CIA Γ, que en cuatro años no han producido ni un solo fruto por autopolinización pero sí por polinización artificial. Esto se puede deber al carácter protógamico de la flor como mecanismo que impide la autopolinización y favorece la polinización cruzada, sumado a la ausencia de los polinizadores entomófilos. La polinización natural parece depender además de factores externos como la temperatura y la humedad relativa (Escobar y Sanchez 1992)

Debido a la baja tasa de polinización natural, una práctica común en los cultivos comerciales de guanabano en el país, es la realización de polinizaciones manuales de las flores para garantizar una buena producción y la formación de frutos simétricos de buen aspecto (Ing Agr Francisco Arboleda, com personal 2002) La realización de esta práctica requiere de personal calificado y aumenta los costos de producción por mano de obra en los cultivos Por esta razón encontrar accesiones o variedades que no requieran o que requieran en menor proporción de la polinización artificial, puede tener un gran impacto en la productividad y los costos de producción de cultivos de guanabano

En el presente estudio la polinización natural se midió como el porcentaje de flores registradas que formaron frutos durante un año de mediciones Si bien la lectura de flores se realizó cada 15 días hubo mucha dificultad para cuantificar el total de flores formadas, debido al gran número de flores abortadas y a la formación de nuevas flores entre cada una de las lecturas

En el caso de *A muricata*, se observó que el porcentaje de formación de frutos varió entre 0 y 16.6% La no formación de frutos fue registrada en 11 de los 90 árboles evaluados Se encontraron 15 accesiones que presentaron niveles de polinización natural superiores a 5% Estos niveles son superiores a los registrados por Guzmán (1992) que oscilan entre 1.7 y 4.8 en diferentes meses del año, pero inferiores a los reportados por Villalta en Costa Rica, que oscilan entre los 18 y 24 (Citado por Peña *et al* 2002)

En 25 de la totalidad de árboles evaluados se formaron 10 o más frutos (Tabla ) Entre todas las accesiones se destacan por rendimiento las siguientes 8 que produjeron más de 45.9 kg /árbol (9.37 ton/ha, calculadas a razón de 204 árboles por hectárea), lo que es superior al promedio nacional que es esta en 9 ton/ha 2513-1, 2513 -4 , 1983-2, 6-3, 2015-2, 2042-4, H-2-1, 1983-3 y 2513-1 En estas dos últimas accesiones, se obtuvieron productividades superiores a las 20 ton/ha (109 y 116 kg /árbol, Tabla ) La productividad de todas las accesiones sin embargo está por debajo de la reportada por el Ing Agr Larrota de la empresa Agronilo-Grajales de La Unión-Valle (2000) que es de 130 kg /árbol para árboles de 6.5 años de edad, y la reportada por para el clon de guanabano "Elita " que puede llegar a producir 191.8 kg /árbol/año (Ríos Castaño, 2001, descripción del Clon Elita Vivero Profrutales S A ) lo que correspondería a 39 ton/ha/año

En las 8 accesiones más productivas, la afección por antracnosis fue calificada como media (2) en los árboles 2513-1 y -4, mientras que en las 6 accesiones restantes, la afección fue baja (1)

En las Anonas relacionadas, el porcentaje de formación de frutos fue muy bajo y solo 15 de los 27 árboles evaluados produjeron algunos frutos con excepción de la accesión clasificada como Chirimoya (la cual corresponde a la especie *A reticulata* según los resultados de la

evaluación con marcadores moleculares) en la cual se cosecharon 36 frutos con un peso total de 5.4 kg (0.15 kg /fruto) correspondientes al cuajamiento del 33.3% de las flores

Cabe anotar que varias de las accesiones evaluadas podrían producir mucho más de lo medido si se establecieran cultivos clonales con ellas, y si estos recibieran un manejo más tecnificado durante todo su crecimiento, que el que se le puede dar en el banco de germoplasma. Entre las prácticas de manejo se debería incluir la polinización artificial.

Tabla 4 Polimizacion natural de las accesiones de *Annona muricata* y de Anonas relacionadas basada en numero de flores y numero de frutos cosechados Corpoica C I Palmira Agosto 2002

ACCESIONES DE GUANABANA					
Arbol	Numero Flores	N° Frutos Cosechados	Peso Total Frutos kg	Peso Promedio Fruto kg	% Frutos Formados
1994 1	252	6	23 20	3 86	2 4
1994 2	113	0	0	0	0
1994 3	141	9	12 40	1 37	6 4
2045 1	90	10	29 05	2 90	11 1
2045 4	131	5	14 70	2 94	3 8
2045 5	86	0	0	0	0
H 2 1	395	16	62 25	3 89	4 1
2512 7	256	15	39 25	2 61	5 9
2512 9	130	12	28 30	2 35	9 2
2512 10	176	10	28 05	2 80	5 7
2511 3	369	7	17 60	2 51	1 9
2511 5	232	5	16 50	3 30	2 2
2511 11	551	0	0	0	0
H 1 1	818	1	2 80	2 80	0 1
H 1 3	1004	10	36 90	3 69	1 0
H 1 4	250	8	23 30	2 91	3 2
2020 1	477	4	13 00	3 25	0 8
2020 2	170	2	9 10	4 55	1 2
2020 5	257	5	26 30	5 26	1 9
2016 1	256	10	28 70	2 87	3 9
2016 3	402	9	28 55	3 17	2 2
2016 4	341	3	10 85	3 61	0 9
2017 1	373	10	39 00	3 90	2 7
2017 2	269	4	8 70	2 17	1 5
2017 5	314	4	15 50	3 87	1 3
1957 2	58	0	0	0	0
1957 3	84	1	2 50	2 50	1 2
1957 4	73	0	0	0	0
1995 1	183	2	14 60	7 30	1 1
1995 2	304	9	29 15	3 23	3 0
1995 4	223	4	14 85	3 71	1 8
1983 1	426	11	21 75	1 97	2 6
1983 2	234	24	72 75	3 03	10 3
1983 3	422	35	109 00	3 11	8 3
1985 3	116	1	4 00	4 00	0 9
1985 4	153	0	0	0	0
1985 5	373	0	0	0	0
1946 6	187	2	8 70	4 35	1 1
1946 8	175	31	12 90	4 30	1 7
1946 10	471	4	23 70	5 92	0 8
1943 1	247	14	33 90	2 42	5 7

1943 3	152	12	32 55	2 71	7 9
1943 10	210	4	11 65	2 91	1 9
2014 1	89	9	14 60	1 62	10 1
2014 2	145	24	39 50	1 64	16 6
2015 1	238	9	28 10	3 12	3 8
2015 2	234	20	45 95	2 29	8 5
2036 1	359	10	24 70	2 47	2 8
2036 2	422	7	17 80	2 54	1 7
2036 3	418	0	0	0	0
2042 1	427	3	6 50	2 16	0 7
2042 2	768	4	17 60	4 40	0 5
2042 4	431	21	64 65	3 07	4 9
1921 4	476	7	22 10	3 15	1 5
1921 6	291	3	20 80	6 93	1 0
1921 9	466	18	35 50	1 97	3 9
2040 1	295	16	43 00	2 68	5 4
2040 2	286	5	9 50	1 90	1 7
2040 3	119	3	8 40	2 80	2 5
2041 2	197	3	7 50	2 50	1 5
2041 3	343	2	8 00	4 00	0 6
2041 4	349	2	5 10	2 55	0 6
2039 1	94	4	13 60	3 40	4 3
2039 2	268	6	13 40	2 23	2 2
2039 3	318	9	29 00	3 22	2 8
6 1	237	7	17 40	2 48	3 0
6 2	234	4	17 05	4 26	1 7
6 3	321	17	49 15	2 89	5 3
1918 3	468	0	0	0	0
1918 5	433	0	0	0	0
1918 9	694	12	38 10	3 17	1 7
4 1	819	7	24 80	3 54	0 9
4 2	559	16	34 25	2 14	2 9
2037 1	123	5	19 15	3 83	4 1
2037 3	298	4	13 30	3 32	1 3
2037 4	212	9	31 45	3 49	4 2
2033 1	562	8	36 60	4 57	1 4
2033 3	164	2	8 00	4 00	1 2
2033 4	556	10	36 70	3 67	1 8
1 1	207	3	11 00	3 66	1 4
1 2	180	2	8 40	4 20	1 1
2513 1	551	33	116 15	3 52	6 0
2513 4	1077	23	94 20	4 09	2 1
2513 7	542	3	10 30	3 43	0 6
2514 10	1269	2 1	6 00	3 00	0 2
2514 11	467	2 1	5 20	2 60	0 4
2514 12	1105	1	1 30	1 30	0 1
<b>ANONAS RELACIONADAS</b>					
1959 1	1927	0 1	0	0	0
1959 2	1580	0	0	0	0

1958 1	580	10	5 30	0 53	1 7
1958 2	790	7	2 40	0 34	0 9
1958 3	652	9	2 80	0 31	1 4
1919 2 <sup>1</sup>	1562	2	5 40	2 70	0 1
1919 3 <sup>1</sup>	1697	1	0 93	0 93	0 1
1919 7 <sup>1</sup>	1373	0	0	0	0
1920 1	75	3	3 20	1 06	4 0
1920 2	123	4	7 70	1 92	3 3
1920 3	49	4	3 80	0 95	8 2
Cabeza de Negro 2	70	0	0	0	0
Cabeza de Negro 3	503	0	0	0	0
Cabeza de Negro 4	394	2	2 60	1 30	0 5
Chirimoya 1	108	36	5 40	0 15	33 3
Anona Colorada 1	343	0	0	0	0
Anona Colorada 3	602	0	0	0	0
Anona Colorada 4	332	4	2 20	0 55	1 2
Biriba 1	151	0	0	0	0
Biriba 2	172	0	0	0	0
Biriba 3	419	0	0	0	0
Anona Blanca 2	55	5	0 35	0 70	9 1
Anona Blanca 3	107	6	1 10	0 18	5 6
Anona Blanca 4	121	0	0	0	0
Annona glabra 1	1727	1	0 65	0 65	0 1
Annona glabra 2	965	1	0 45	0 45	0 1
Annona glabra 3	1198	1	0 40	0 40	0 1
Annona montana 1	1331	0	0	0	0
Annona montana 2	1243	0	0	0	0
Annona montana 3	1213	4	3 70	0 92	0 3

### *Incidencia de Antracnosis*

La antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* P, es la enfermedad mas importante del guanabano y puede producir perdidas hasta del 90 % de la produccion (Escobar y Sanchez, 1992)

La valoracion sobre todo el arbol permitio observar que la enfermedad se presenta en brotes tiernos, hojas, ramas, botones florales y en frutos. En general en los arboles afectados se observaron lesiones necroticas de color cafe o marron oscuro en bordes, parte interna y en nervaduras de las hojas con deformacion foliar y posterior defoliacion. En botones florales las lesiones son de forma variable y generan necrosamiento y caida del boton. En frutos jovenes la enfermedad indujo momificacion y su desprendimiento del arbol. La anterior sintomatologia es reportada por Zarate (2000) Escobar y Sanchez (1992)

Los resultados de la evaluación presentados en la Tabla 5, indican que la enfermedad tuvo mayor incidencia en las accesiones de guanabana que en las anonas relacionadas, en la mayoría de las cuales no hubo incidencia de la enfermedad, con excepción de las accesiones 1959, *A glabra* y *A montana* (identificadas posteriormente como pertenecientes a la especie *A montana*), que mostraron incidencias calificadas como 3, 1 y 3 respectivamente. En *A muricata* la incidencia de la enfermedad fue de la siguiente manera: 3 árboles (3.3%) sin incidencia, 57 árboles (63.4%) con grado 1 (bajo), 20 árboles (22.2%) con grado 2 (medio) y 10 árboles (11.1%) con grado 3 (Alto). El primer grupo lo representan los árboles 1985-3 y -4 y 2041-3, todos reportados con muy baja formación de frutos. El segundo grupo representa la mayoría de las accesiones, dentro de las cuales se encuentran los árboles destacados por rendimiento: 1983-1, -2, -3, 2014-1, -2, 2015-1, -2, 2042-1, -4, y H-2-1. El tercer grupo incluye la accesión destacada por rendimiento 2513-1 y -4. El cuarto grupo, con mayor incidencia, presenta árboles que no produjeron frutos (2045-5 y 1918-3 y -5) y otros árboles (2020-1, 2017-5, 1985-5, 1921-4 y 6, y 2514-12) registradas por baja producción.

Por ser esta enfermedad un problema importante en la producción del guanabano, es necesario en trabajos futuros comprobar las observaciones hechas, propagando clonalmente los árboles que no mostraron incidencia o en los cuales esta fue baja, inoculándolos artificialmente y bajo condiciones controladas con diferentes razas de la enfermedad.

Tabla 5 Incidencia de Antracnosis en las accesiones de *Annona muricata* y en especies de Anonas relacionadas La escala de calificación fue de la siguiente manera 0 = No incidencia, 1 = Baja incidencia, 2 = Incidencia Media y 3 = Alta Incidencia  
Corpoica C I Palmira Agosto 2002

ACCFSION	INCIDENCIA ANTRACNOSIS	ACCESION	INCIDFNIA ANTRACNOSIS
1994 1	1	2040 1	2
1994 2	1	2040 2	2
1994 3	1	2040 3	1
2045 1	1	2041 2	1
2045 4	2	2041 3	0
2045 5	3	2041 4	1
H 2 1	1	2039 1	1
2512 7	1	2039 2	1
2512 9	1	2039 3	1
2512 10	1	6 1	1
2511 3	1	6 2	1
2511 5	1	6 3	2
2511 11	2	1918 3	3
H 1 1	1	1918 5	3
H 1 3	1	1918 9	1
H 1 4	1	4 1	1
2020 1	3	4 2	1
2020 2	2	2037 1	1
2020 5	2	2037 3	1
2016 1	1	2037 4	1
2016 3	2	2033 1	1
2016 4	1	2033 3	1
2017 1	2	2033 4	1
2017 2	2	1 1	2
2017 5	3	1 2	2
1957 2	1	2513 1	2
1957 3	2	2513 4	2
1957 4	1	2513 7	2
1995 1	1	2514 10	1
1995 2	1	2514 11	1
1995 4	1	2514 12	3
1983 1	1	1959 1	3
1983 2	1	1959 2	3
1983 3	1	1958 1	0
1985 3	0	1958 2	0
1985 4	0	1958 3	0
1985 5	3	1920 1	0
1946 6	1	1920 2	0
1946 8	1	1920 3	0
1946 10	1	Cabeza de Negro 2	0
1943 1	1	Cabeza de Negro 3	0
1943 3	1	Cabeza de Negro 4	0

ACCESION	INCIDENCIA ANTRACNOSIS
1943 10	1
2014 1	1
2014 2	1
2015 1	1
2015 2	1
2036 1	1
2036 2	1
2036 3	2
2042 1	1
2042 2	2
2042 4	1
1921 4	3
1921 6	3
1921 9	1
1919 2 <sup>1</sup>	3
1919 3 <sup>1</sup>	2
1919 7 <sup>1</sup>	2

ACCESION	INCIDENCIA ANTRACNOSIS
Chirimoya 1	0
Anona Colorada 1	0
Anona Colorada 3	0
Anona Colorada 4	0
Biriba 1	0
Biriba 2	0
Biriba 3	0
Anona Blanca 2	0
Anona Blanca 3	0
Anona Blanca 4	0
Annona glabra 1	0
Annona glabra 2	0
Annona glabra 3	1
Annona montana 1	3
Annona montana 2	3
Annona montana 3	0

La accesion 1919 2 resulto pertenecer a la especie *A. montana* en el analisis molecular

### *Caracteristicas Organolepticas del Fruto*

Los resultados de la calidad organoleptica corresponden a la informacion completa reunida de la evaluacion de los frutos 65 de los 90 arboles de *A. muricata*. En los 25 arboles restantes de *A. muricata* como en las 27 de especies relacionadas no se realizo analisis organoleptico por diferentes causas asi: no produccion, maduracion desuniforme, daño por insectos – plaga, pudricion interna causada por enfermedades o endurecimiento del fruto originado posiblemente por desordenes fisiologicos.

### *Variables Morfologicas*

#### Peso y Tamaño Promedio del Fruto

Los datos de las variables peso y longitud de fruto para las 65 accesiones presentaron una alta variabilidad, como se ve en cuadro siguiente

Variable	N	Simple Statistics				
		Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum
PESOFRU	65	3163	1099	205598	1300	7300
LONGFRU	65	24.29	3.8	1579	13.00	37.93

Al someter los datos a la correlación lineal de Pearson, estos presentaron una asociación positiva alta, coeficiente de correlación  $r = 0.981$  y una significancia  $P < r$  de  $0.0001$

Bajo la anterior explicación, la información suministrada en la Tabla 6 y en la Figura 1, muestra el peso promedio del fruto en las diferentes accesiones es mayor de 1 kg o sea que no se encontraron accesiones con frutos livianos, por el contrario, se observa que en la mayoría de las accesiones, el peso promedio de los frutos varía entre 1.3 kg (para el árbol 1994-3, 2514-12) y 7.3 kg para el árbol 1995-1. Esta variación de peso permite clasificar los árboles evaluados de *A. muricata* en dos grandes grupos así: 31 produce frutos de peso entre 1 y 3 kg (frutos medianos) y 33 produce frutos de peso superior a 3 kg (Frutos pesados y muy pesados). Al respecto, se observa que los 8 árboles destacadas anteriormente por rendimiento se clasifican en dos grupos así: a) Frutos medianos, árboles 2014-2 y 2015-2, b) Frutos pesados, árboles 2513-1 y 2513-2, 1983-2, 1983-3, 2042-4 y H-2-1.

Con respecto a la longitud del fruto, la mayoría de los árboles producen frutos entre 20 y 30 centímetros y tamaño asociado directamente con pesos entre 2000 y los 4800 gramos. Los árboles con peso menor a 2000 gramos tales como 1994-3, 2014-1, 2014-2 y 2514-12, presentan entre 13.0 y 19.4 cm de longitud. Las accesiones con frutos de mayor peso, 2020-5, 1921-6 y 1995-1 presentan 31.2, 36.7 y 37.9 cm de longitud respectivamente (Tabla 6 y Figura 1).

Clones de muy buena calidad, altamente productivos y que producen frutos de tamaño grande (más de 3 kg de peso) como el "Elita" y otros seleccionados por C Biotec y CIAT (aun en evaluación) se encuentran disponibles. Sin embargo es de gran importancia para el mercado de la fruta en fresco seleccionar clones de fruto pequeño, de entre 1 y 2 kg (Ing. Larrota de Agronilo Grajales, com. Personal 2000). En este sentido valdría la pena propagar clonalmente los árboles más productivos y que producen los frutos de menor tamaño y evaluarlos en diferentes regiones del país, realizando polinizaciones artificiales si es necesario.

Tabla 6 Características organolépticas de accesiones de guanabana (*Annona muricata*)  
Corpoica C I Palmira Agosto 2002

Orden	Accesion	Peso Promedio Fruto (kg )	Longitud Fruto (cm)	Sabor y Aroma	Solidos Solubles	Acidez (%)
1	1 1	3 666	26 0	4 8	15 2	1 1
2	1 2	4 200	27 8	5 0	16 5	1 3
3	1918 3	3 000	26 0	4 5	13 2	0 8
4	1918 9	3 175	24 4	4 0	13 8	1 1
5	1919 2 <sup>1</sup>	2 700	22 8	3 5	10 8	1 4
6	1919 7 <sup>1</sup>	1 390	13 0	3 5	10 6	1 4
7	1921 4	3 157	24 3	4 5	14 6	0 9
8	1921 6	6 933	36 7	5 0	15 3	0 7
9	1921 9	1 972	20 4	5 0	16 4	1 0
10	1943 1	2 421	21 9	4 0	13 3	1 1
11	1943 10	2 912	23 5	3 5	9 0	1 1
12	1943 3	2 712	22 9	3 9	12 1	1 0
13	1946 8	4 300	28 1	4 0	13 1	1 2
14	1957 3	2 500	22 2	5 0	13 3	0 6
15	1983 1	1 977	20 5	4 5	13 4	1 1
16	1983 2	3 031	23 9	4 5	12 5	0 8
17	1983 3	3 114	24 2	5 0	16 8	0 9
18	1994 1	3 866	26 7	4 3	12 7	1 1
19	1994 3	1 377	18 5	4 3	11 7	0 9
20	1995 1	7 300	37 9	4 8	15 2	0 9
21	1995 2	3 238	24 6	4 3	13 1	0 9
22	1995 4	3 712	26 2	4 8	16 2	1 1
23	2014 1	1 622	19 3	4 5	15 1	1 0
24	2014 2	1 645	19 4	4 9	16 4	1 3
25	2015 1	3 122	24 2	4 8	16 1	0 9
26	2015 2	2 297	21 5	4 7	15 9	1 1
27	2016 1	2 870	23 4	4 3	13 6	1 1
28	2016 3	3 172	24 4	4 8	12 9	1 1
29	2016 4	3 616	25 8	5 0	14 2	0 8
30	2017 1	3 900	26 8	4 5	12 5	0 9
31	2017 2	2 175	21 1	4 0	12 7	1 2
32	2017 5	3 875	26 7	4 3	12 8	1 0
33	2020 2	4 550	28 9	4 8	14 5	1 1
34	2020 5	5 260	31 2	4 8	15 2	1 0
35	2033 1	4 575	29 0	4 5	13 9	1 0
36	2033 4	3 670	26 0	5 0	16 4	1 1
37	2036 1	2 470	22 1	5 0	17 6	1 1
38	2037 1	3 830	26 5	4 0	12 0	0 9
39	2037 4	3 494	25 4	4 8	13 8	1 0
40	2039 2	2 233	21 3	4 0	10 8	1 1
41	2039 3	3 222	24 5	5 0	18 4	0 9
42	2040 1	2 687	22 8	4 0	13 1	0 9
43	2040 2	1 900	20 2	5 0	19 6	1 3
44	2040 3	2 800	23 2	5 0	19 2	1 1

Orden	Accesion	Peso Promedio Fruto (kg )	Longitud Fruto (cm)	Sabor y Aroma	Solidos Solubles	Acidez (%)
45	2042 2	4 400	28 4	4 8	17 1	0 8
46	2042 4	3 078	24 1	5 0	15 4	0 9
47	2045 1	2 905	23 5	4 5	12 3	1 1
48	2045 4	2 940	23 6	4 3	12 2	1 2
49	2511 3	2 514	22 2	4 3	14 0	1 2
50	2512 10	2 805	23 2	5 0	14 6	1 0
51	2512 7	2 616	22 6	4 5	13 5	1 0
52	2512 9	2 358	21 7	4 3	12 4	1 1
53	2513 1	3 519	25 5	4 6	15 0	1 2
54	2513 4	4 095	27 4	4 5	14 7	1 0
55	2514 10	3 000	23 8	5 0	14 6	1 1
56	2514 11	2 600	22 5	5 0	15 6	1 1
57	2514 12	1 300	18 2	5 0	16 2	1 0
58	4 1	3 542	25 6	5 0	14 9	1 0
59	4 2	2 140	21 0	4 8	16 2	1 2
60	6 1	2 485	22 1	4 5	15 7	1 0
61	6 2	4 262	28 0	4 5	14 3	0 8
62	6 3	2 891	23 5	4 0	12 3	1 0
63	H 1 3	3 690	26 1	4 0	12 8	0 9
64	H 1 4	2 912	23 5	4 5	13 5	0 8
65	H 2 1	3 890	26 7	4 9	14 9	1 0

1 La accesion 1919 resultado pertenecer a la especie *A. montana* en la caracterizacion molecular

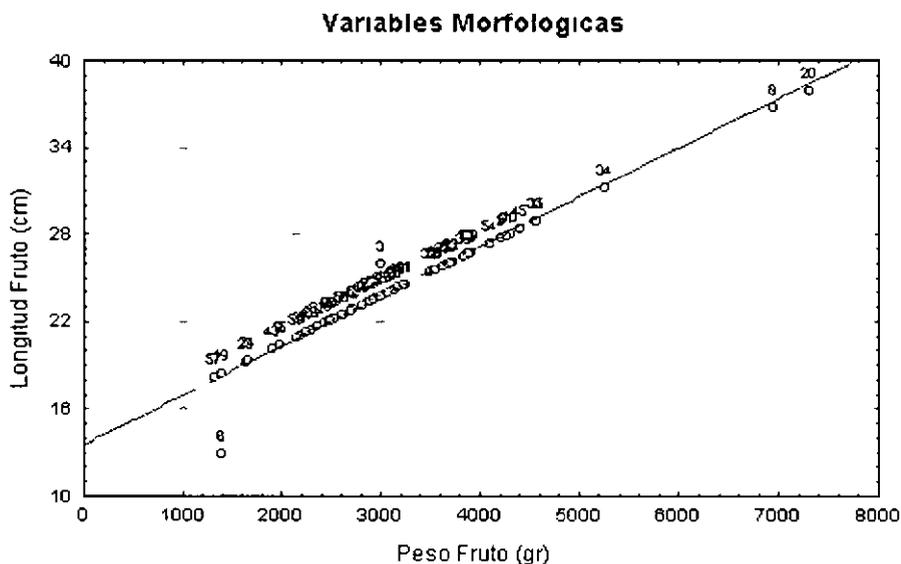


Figura 1 Peso (gr) y longitud del fruto (cm) de 65 accesiones de guanabana (*Anona muricata*) Corpoica C I Palmira Agosto 2002 (El punto marcado con el numero 6 corresponde a l arbol 1919-7 que resultado corresponder a la especie *A. montana* en la caracterizacion molecular)

### Variables Organolepticas

Las variables solidos solubles, acidez y sabor y aroma, presentaron las siguientes descripciones

Variable	N	Simple Statistics				
		Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum
Sabor y Aroma	65	4.54	0.42	295.40	3.50	5.00
Solidos Solubles	65	14.27	2.04	927.70	9.00	19.60
Acidez	65	1.02	0.15	66.70	0.60	1.40

La correlacion lineal de Pearson detecto una alta asociacion y positiva entre solidos solubles y el sabor y aroma (Tabla 7 y Figura 2), una correlacion significativa estadisticamente baja y negativa entre la acidez y el sabor y aroma (Tabla 7 y Figura 3), y ningun tipo de asociacion entre los solidos solubles y la acidez (Tabla 7 y Figura 4)

Tabla 7 Coeficientes de correlacion de Pearson para las variables organolepticas de 65 accesiones de guanabana (*Anona muricata*) Corpoica C I Palmira Agosto 2002

	Sabor y Aroma	Solidos Solubles	Acidez
Sabor y Aroma	1.00 <sup>1</sup>	0.7984	0.26102
	0.0 <sup>2</sup>	0.0001	0.0357
Solidos Solubles		1.00	0.02006
		0.0	0.8740
Acidez			1.00
			0.0

<sup>1</sup> Pearson Correlation Coefficients

<sup>2</sup> Prob > |R| under Ho: Rho=0

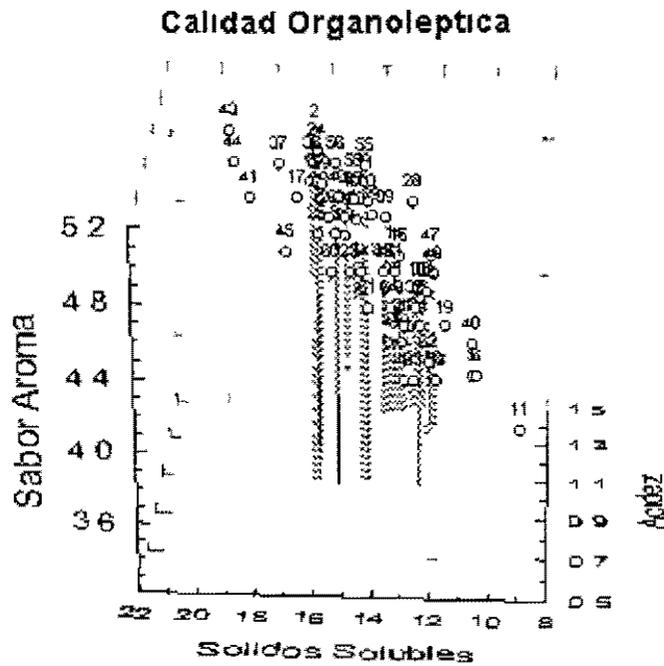


Figura 2 Asociacion entre sabor y aroma y solidos solubles para 65 accesiones de guanabana (*Annona muricata*) Corpoica C I Palmira Agosto 2002 (La numeracion corresponde al orden de la tabla 7)

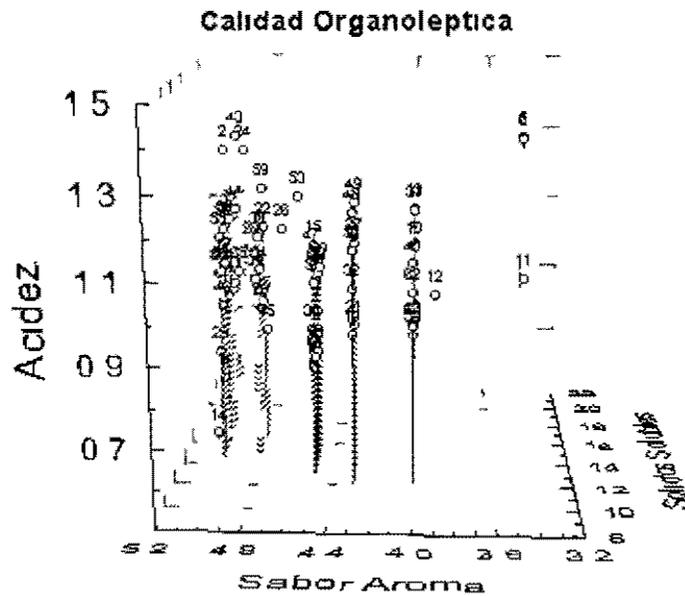


Figura 3 Asociacion entre acidez (%) y sabor y aroma para 65 accesiones de guanabana (*Annona muricata*) Corpoica C I Palmira Agosto 2002 (La numeracion corresponde al orden de la tabla 7)

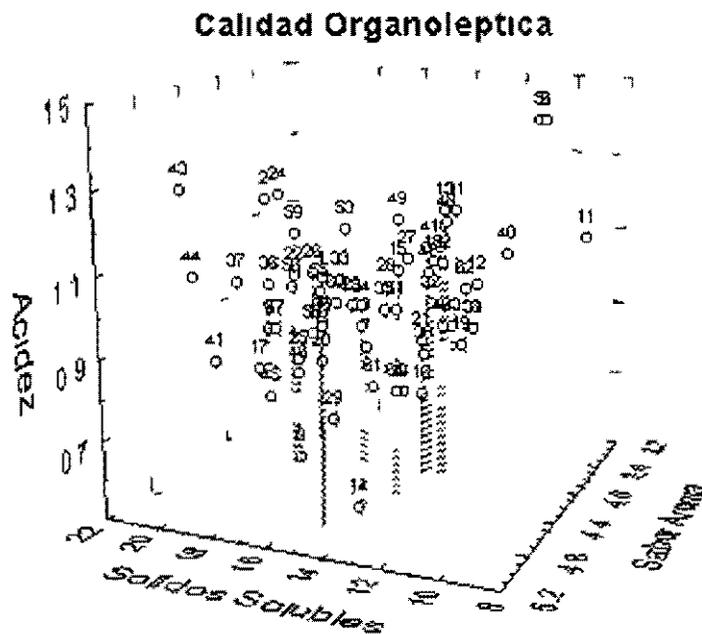


Figura 4 Asociación entre acidez (%) y sólidos solubles para 65 accesiones de guanabana (*Annona muricata*) Corpoica C I Palmira Agosto 2002 (La numeración corresponde al orden de la tabla 7)

#### *Sabor y Aroma*

La calificación de esta característica fue el resultado de un juicio completamente subjetivo. Se encontró que con excepción de los árboles 1919-2, 1919-7 (ambos resultaron pertenecer a *A. montana* en la caracterización molecular), 1943-3, 1943-10, el 94% de ellas presentaron valores entre 4.0 y 5.0 (Tabla 6) lo cual las califica con excelente sabor y aroma. Esto significa que la gran mayoría de las accesiones de guanabana existentes en el banco de germoplasma conservado en el C I Corpoica Palmira podrían ser utilizadas tanto para el consumo en fresco como para la industria.

#### *Sólidos Solubles y Acidez*

Los resultados obtenidos en sólidos solubles (Tabla 6) indican que con excepción de los frutos del árbol 1943-10 en todos los demás el valor fue mayor de 10 y presentó límite superior de 19.6 y 19.2 en los árboles 2040-2, 2040-3, respectivamente (desgraciadamente estas dos

accesiones no figuran entre las más productivas) Es importante destacar que la mayoría de las accesiones presentan una buena relación entre sólidos solubles y acidez, lo cual denota que son promisorias para la agroindustria

Los frutos de los árboles 1919-2, 1919-7 (que pertenecen a *A. montana* según los resultados de la caracterización molecular) 2014-2 y 2040-2 presentan los más altos valores de acidez (entre 1.3 y 1.4), todas las demás registran valores adecuados para esta variable, denotando las bondades de la mayoría de las accesiones existentes en el C I Palmira

Según Ángela Inés Reyes, Instructora Postcosecha del Sena en Buga (Comunicación personal 2000) los frutos del guanabano para ser aptos para la producción de pulpa, deben poseer las siguientes características: pH entre 3.8 y 4, sólidos solubles (°Brix) entre 14 y 16 y acidez titulable (ácido cítrico) entre 0.8 y 2.0. Aproximadamente la mitad de los árboles evaluados producen frutos con estas características

## **4 9            Caracterizacion Molecular de la Variabilidad Genetica del Guanabano y Especies de Anonaceas Relacionadas**

### **4 9 1            Colecta de Tejidos y Extraccion de ADN**

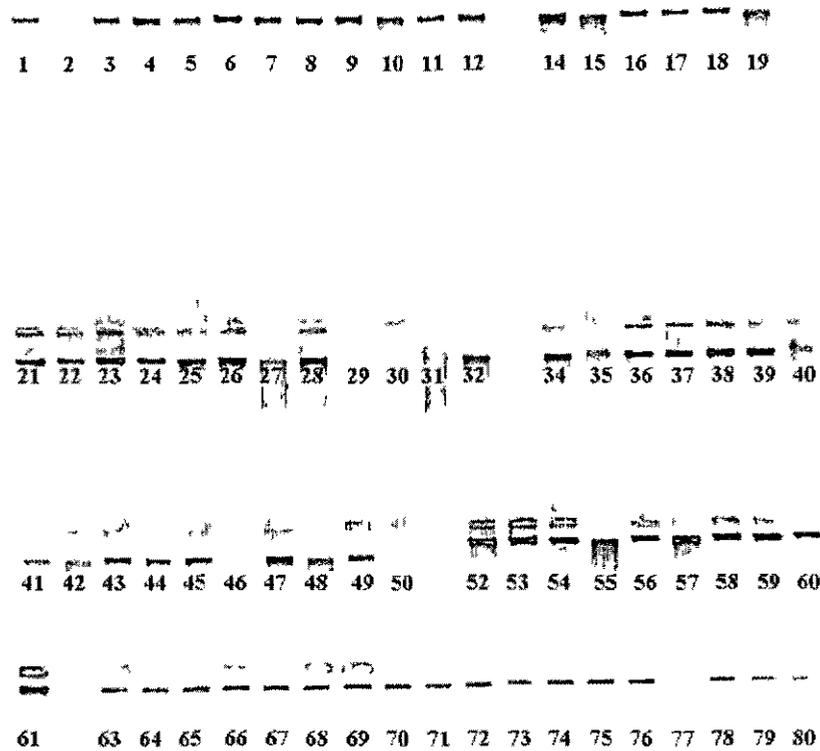
Con los tres metodos de recoleccion de tejido foliar se obtuvieron muestras de ADN de buena calidad (ver Fig 5) La recoleccion en hielo facilita la toma de tejido foliar a distancias relativamente cortas del laboratorio donde se realiza la extraccion (por ejemplo la distancia CIAT-C 1 Corpoica Palmira), siempre y cuando el tejido se congele, o se inicie la extraccion de ADN en las siguientes cinco horas aproximadamente Para distancias largas o en salidas de campo de varios dias, la recoleccion en silica-gel puede ser mas practica, con la condicion de que la relacion silica-gel/tejido permita el secado progresivo del tejido Esta relacion ha sido propuesta por Sytsma *et al* (1993) y corresponde a 10 gramos de silica gel por 1 gramo de tejido En una segunda colecta de tejido foliar se decidio recurrir unicamente a la recoleccion en hielo, obteniendose ADN de buena calidad, optimo para la digestion y las amplificaciones selectivas de la tecnica de AFLP (Fig 5)

### **4 9 2            Extraccion de ADN del Guanabano y de Especies de Anonaceas Relacionadas**

Con la metodologia estandarizada de extraccion de ADN se logro obtener entre 1600 y 16400 ng de ADN por 0 154 g de tejido foliar de guanabano (que es aproximadamente el peso de tejido foliar que se almacena en un tubo Eppendorf de 1 5 ml hasta la marca de 0 5 ml), cantidades que alcanzan para 64 a 656 reacciones completas de AFLP Con una cantidad similar de tejido foliar de las otras especies de anonaceas se obtuvieron entre 1300 y 15100 ng de ADN

Las soluciones de ADN de cada muestra en tampon TE (10 mM Tris-HCl pH8, 0 1 mM EDTA) se encuentran almacenadas a -20 °C La calidad del ADN utilizado para la obtencion de los marcadores AFLP se observa en la Figura 5

**Figura 5** Calidad de los ADNs de muestras de anonaceas del banco de germoplasma extraídas con el metodo de Dellaporta (1983) modificado (anexo 2) 1) 2036 1 2) 1920 2,3) 1921 6 4) 2036-3 5)



2042 1, 6) 1958 3 7) 1921-4 8) 2042-4 9) 1943-1 10) 2014 2 11) 2015-1 12) 1943-10, 14) 2016 1 15) H1 4, 16) 1995 4 17) 2020-1 18) 1918-5 19) 2037 3 21) 2016-3, 22) cabeza de negro 4 23) 1995 2 24) H1-3 25) 2041-3 26) 2017-2 27) 2020 2 28) 2037-1 29) 2041 4 30) Biriba 1 31) Biriba 2 32) 2039 1 34) 1957-3 35) Anona Colorada-4, 36) Chirimoya-1 37) 1959-2, 38) 2037 1 39) 4 1 40) Anona colorada 1 41) 1957 4 42) 2039-2 43) 1 1 44) cabeza de negro 2 45) 2512 7 46) Anona blanca 2 47) 2017-5 48) 6-3 49) 6 2, 50) Biriba 1, 52) 1983-3 53) 1958 2 54) 1985-4 55) 2014-1, 56) 1985 5 57) 1946 10 58) 1983-2 59) 1959 1 60) 5015 2 61) 1946 6 63) 2512 10 64) 4-2 65) 2033 4, 66) 2033-1, 67) 2045-1, 68) Anona montana 1 69) 2511 5 70) H1 1 71) 2511 3 72) 2512-9 73) 4 2 74) 1-2 75) 2033 4, 76) 2033-1, 77) Anona blanca 3 78) 2045 5 79) Anona montana 1 80) 2511 5 De las muestras marcadas con negrilla se obtuvieron patrones de AFLP

### 4 9 3 Marcadores AFLP de las Accesiones de Guanabano y Especies de Anonaceas relacionadas

El analisis preliminar de los polimorfismos mostrados por 15 combinaciones de cebadores en un grupo pequeño de guanabanos y anones amazonicos permitio seleccionar tres combinaciones para los analisis de variabilidad de todas las accesiones disponibles. Se seleccionaron las bandas legibles que mas polimorfismo mostraron (Tabla 8). La reproducibilidad de los patrones de AFLP para las tres combinaciones de cebadores seleccionados fue verificada en 4 individuos

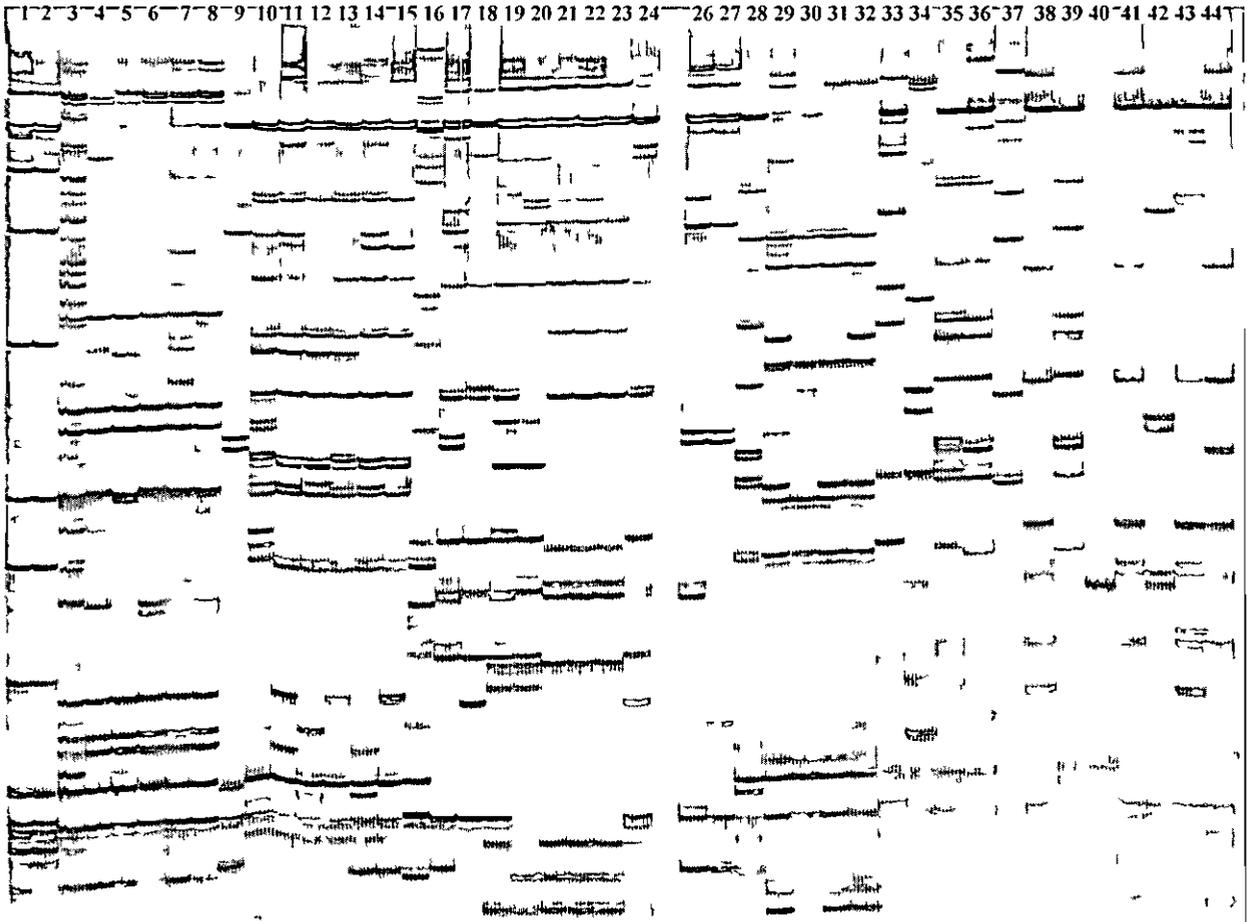
La Figura 6 muestra un gel representativo del patron de bandas obtenido en 42 muestras de accesiones de especies de anonaceas. Como se trato que accesiones de las que se sospechaba pertenecian a una misma especie quedaran agrupadas, se ven agrupaciones de accesiones con patrones muy similares entre si, como por ejemplo los patrones 1 y 2, 3 a 8, 10 a 15, 21 a 24, 26 y 27, 29 a 32, entre otros (ver Figura 12)

TABLA 8 Polimorfismo de 15 combinaciones de cebadores de AFLP en 3 muestras de guanabanos (*A. muricata*) y 3 de anones amazonicos (*Rollinia spp*) de diferentes regiones (Los cebadores corresponden al kit de AFLPs de Invitrogen)

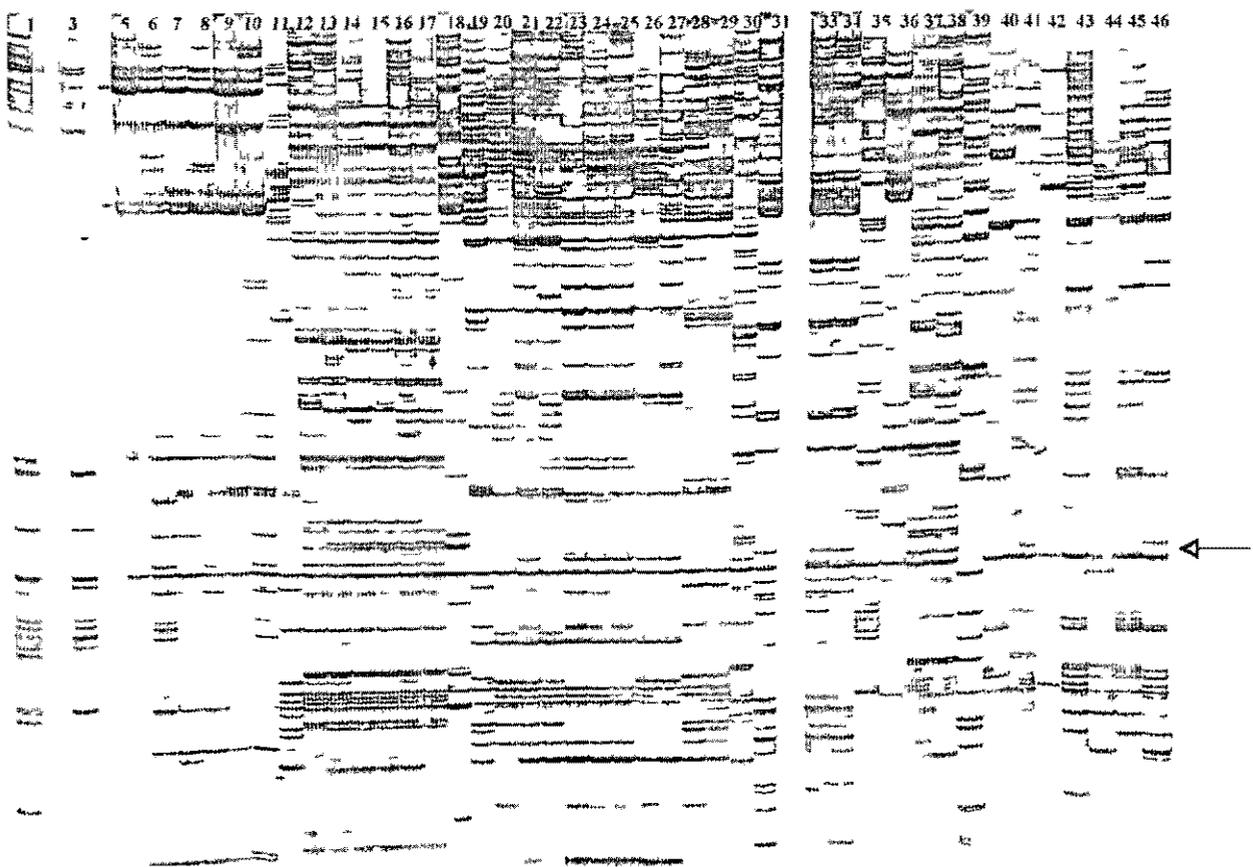
Combinacion de cebadores (Nucleotidos Selectivos)		Combinacion	Bandas legibles	Polimorfismo en guanabanos ( <i>A. muricata</i> )	Polimorfismo en anones amazonicos ( <i>Rollinia spp</i> )	Bandas polimorficas entre guanabanos y anones amazonicos
E AGG	M CTG	A	*			
E AGG	M CAC	B	*			
E AAC	M CAG	C	*			
E AAC	M CAT	D	*			
E ACT	M CTC	E	63	3	12	44
E ACT	M CAA	F	76	4	13	48
E ACA	M CTG	G	65	2	6	52
E ACA	M CAC	H	78	6	11	50
E ACC	M CTG	I	64	4	9	37
E ACC	M CAC	J	61	3	5	37
E ACA	M CAG	K	46	3	4	31
E ACA	M CAT	L	*			
E AGC	M CTC	M	67	5	7	39
E AGC	M CAA	N	66	7	2	40
E ACG	M CTG	O	*			

\* Las combinaciones de cebadores A, D, L y O presentaron numeros de bandas legibles inferiores a 40, por eso no se tuvieron en cuenta en el analisis de polimorfismos

Figura 6 Resultado de la tincion con nitrato de plata de patrones de bandas de AFLPs producidas con la combinacion de cebadores M y separadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida. Los patrones de bandas corresponden a 44 accesiones de anonaceas (solo la mitad superior del gel aparece en la foto)



Las 44 accesiones del grupo de anonaceas fueron analizadas con las combinaciones de cebadores M y N. Con la combinacion N presentaron 274 bandas, todas ellas polimorficas menos una (practicamente 100 % de polimorfismo). La accesion Cadmia en este analisis se incluyo como un elemento de referencia externo al grupo ("outgroup"). La unica banda monomorfica no se presento en esta accesion, lo que permite proponer a esta banda o marcador como especifico para este grupo de anonaceas de importancia horticola (Figura 7). El numero de bandas por individuo estuvo entre 18 y 48, siendo la accesion ASP V36-1 la que mas tuvo y ASP Q22-1 la que menos. Con la combinacion M se obtuvieron 225 bandas en todo el grupo 100 % polimorficas. La accesion ASP V48-1 fue la que menos bandas presento, 21, y Biriba la que mas presento con 63.

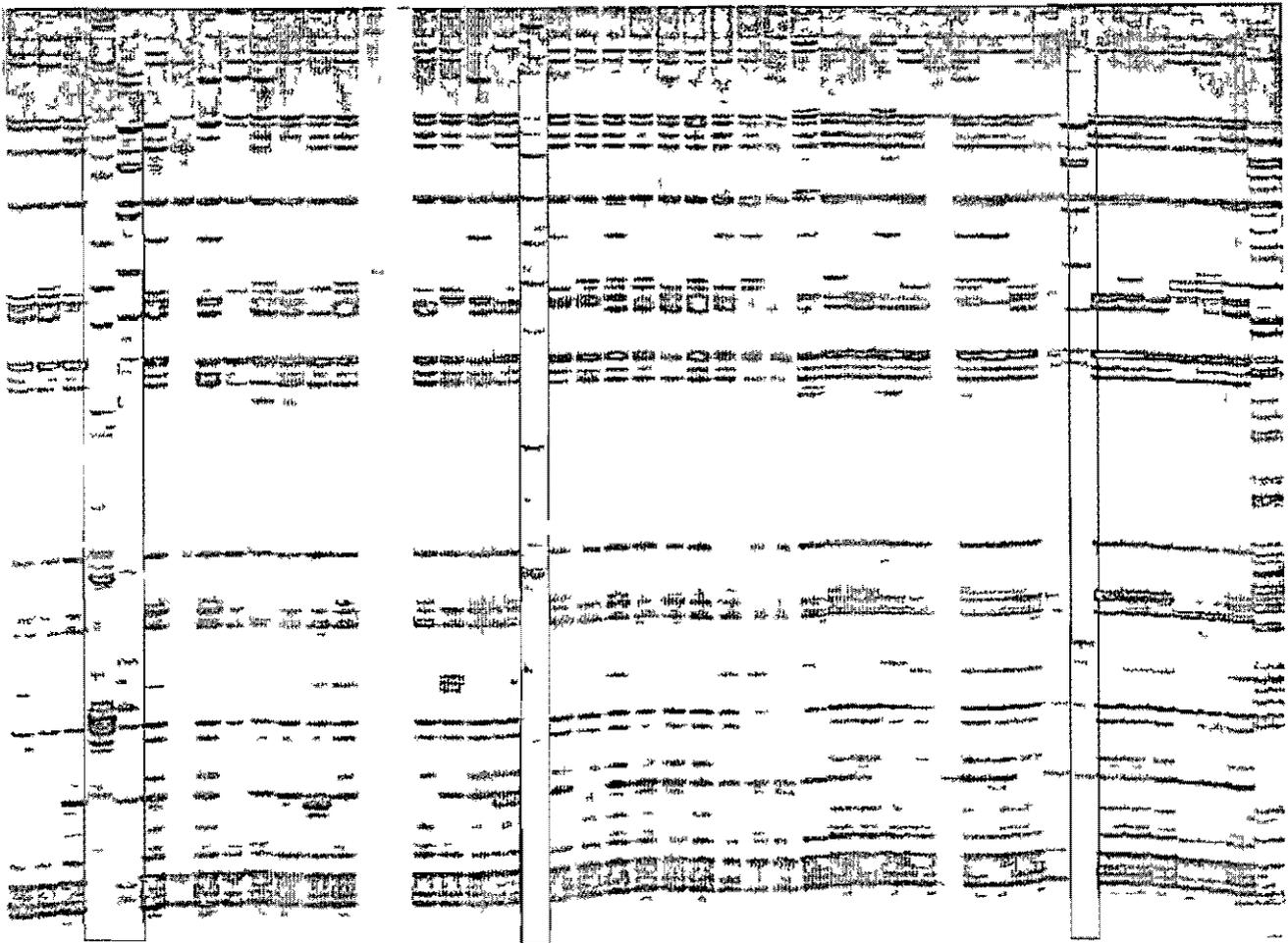


**Figura 7** Gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata que muestra la “huella dactilar” de fragmentos de ADN de accesiones de especies de anonáceas relacionadas con el guanabano amplificadas por medio de la técnica de AFLPs (combinación de cebadores N) 1) ASP CV61 2 3) ASP AV62 4 5) Anona Glabra 3 6) Anona Montana 1 7) AMON V51 2 8) AMON V152 1 9) AMON H53-2, 10) AMON V54 4 11) Anona Colorada 1 12) Biriba 1 13) ASP GN31 4 14) ASP GV34 2 15) ASP VA35 1 16) ASP V36-1 17) ASP V42 1 18) Cabeza de negro 3, 19) Chirimoya 1 20) ASP V21 1, 21) ASP V43 B 22) ASP V41 3 23) ASP V59 2 24) ASP T64 1 25) Anona Blanca 3 26) ASP V20 1 27) ASP Q38 1 28) ASP CU63 1 29) ASP VR65-1, 30) ASP BR60 2 31) AMUR V1 33) AMUR V1 1, 34) AMUR V1, 35) 1958 3 36) 1959 2, 37) 1920-1 38) ASP GV33 1 39) Cadmia, 40) ASP Q22 1 41) ASP V46 1 42) ASP V48 1, 43) ASP V47 1, 44) ASP VR66 1 45) ASP PR49 1 46) ASP V45 1 Las flechas indican una banda presente en todas las accesiones a excepción de Cadmia la accesión más diferente del grupo (menos de 0.1 de similitud – Figura 11)

La Figura 8 muestra un gel representativo de patrones de AFLP de 47 muestras de guanabanos

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47



**Figura 8** Gel de poliacrilamida teñido con plata que muestra la 'huella dactilar' de fragmentos de ADN de accesiones de clasificadas como *A. muricata* amplificadas por medio de la técnica de AFLPs (combinación de cebadores F) 1) 1985 4 2) 2513 1 3) 1957 3 4) 1958 1 5) 1959 2, 6) 1918 5 7) 6 3 8) 2014-2 9) 2015 1 10) 2016 3 11) 2017 2 12) 2040 3 13) 2041 3 16) AMUR V9, 17) AMUR A7 2 18) AMUR M5 2 19) 2033 1, 20) 1920 1 21) 2020 1, 22) 2512-9 23) 1994 3, 24) 2036 3 25) 1946 10 26) 1 27) 4 2 28) 2514 10 29) 2037 1 30) AMUR H3 2 31) AMUR H2 1 32) AMUR VI 33) AMUR H3 5 34) 1943 10, 35) 2039 2 36) H2 1 37) H1 1 38) 1983 3 39) 2045 1 40) 1919 3, 41) AMUR VI, 42) AMUR H2, 43) AMUR H4 44) 1921 4, 45) 1995-2 46) AMUR H2 47) ASP GV34 (*Rollinia* spp) El patron de bandas de las accesiones 4 (1958 I), 5 (1959 2), 20 (1920 1) y 40 (1919 3) es a simple vista completamente diferente al de las demas accesiones (guanabanos) Estas accesiones agruparon junto con las pertenecientes a *A. glabra* *A. montana* *Rollinia* spp y *A. montana* respectivamente

Tres de las accesiones clasificadas inicialmente como pertenecientes a la especie *A. muricata*, e incluidas como tal en los estudios con marcadores moleculares, fueron excluidas del grupo de los guanabanos durante la caracterización agromorfológica (Accesiones 1958, 1959 y 1920), por presentar características morfológicas diferentes a las del resto de los guanabanos

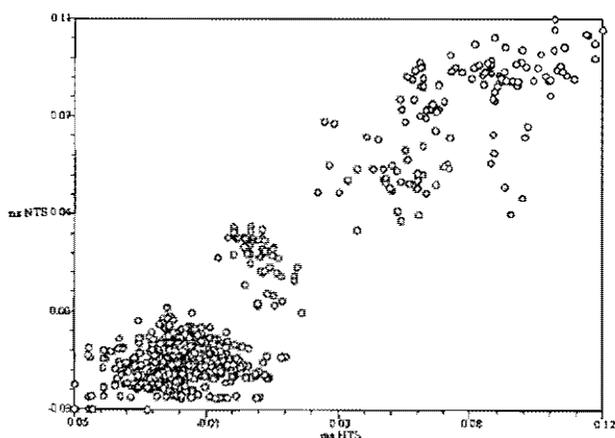
Estas 3 accesiones y una cuarta, la 1919 presentaron patrones de AFLPs que a simple vista difieren de los presentados por el resto de las accesiones de guanabanos (Fig 8, recuadros) Estas 4 accesiones agruparon despues del analisis de similitud efectivamente junto con otras pertenecientes a 3 especies diferentes *A glabra* (1958-3), *A montana* (1959-2), *Rollinia* spp (1920-1) y *A montana* (1919-3), a las cuales parecen pertenecer Es necesario verificar estos resultados con la ayuda de un taxonomo vegetal, y proceder a su reclasificacion en el banco

Las 42 accesiones de guanabano presentaron 75 bandas de AFLP para la combinacion F y 53 bandas para la combinacion M de cebadores El numero de bandas por individuo estuvo entre 41 y 58 con la primera combinacion y entre 20 y 40 con la segunda La combinacion F produjo 67 bandas polimorficas y fue la mas eficiente en detectar polimorfismos (67/75) Tomando las dos combinaciones de cebadores en conjunto, se presentaron 105 bandas polimorficas, representando un polimorfismo del 82 % (105/128) En un estudio de diversidad genetica de chirimoya, quizas el unico trabajo realizado con AFLP en una especie de anonacea de importancia horticola, la combinacion mas eficiente produjo 21 bandas polimorficas, y en conjunto ocho combinaciones de cebadores presentaron 33 % de polimorfismo (88/264) en 19 cultivares (Mahbubur Rahman *et al* 1998)

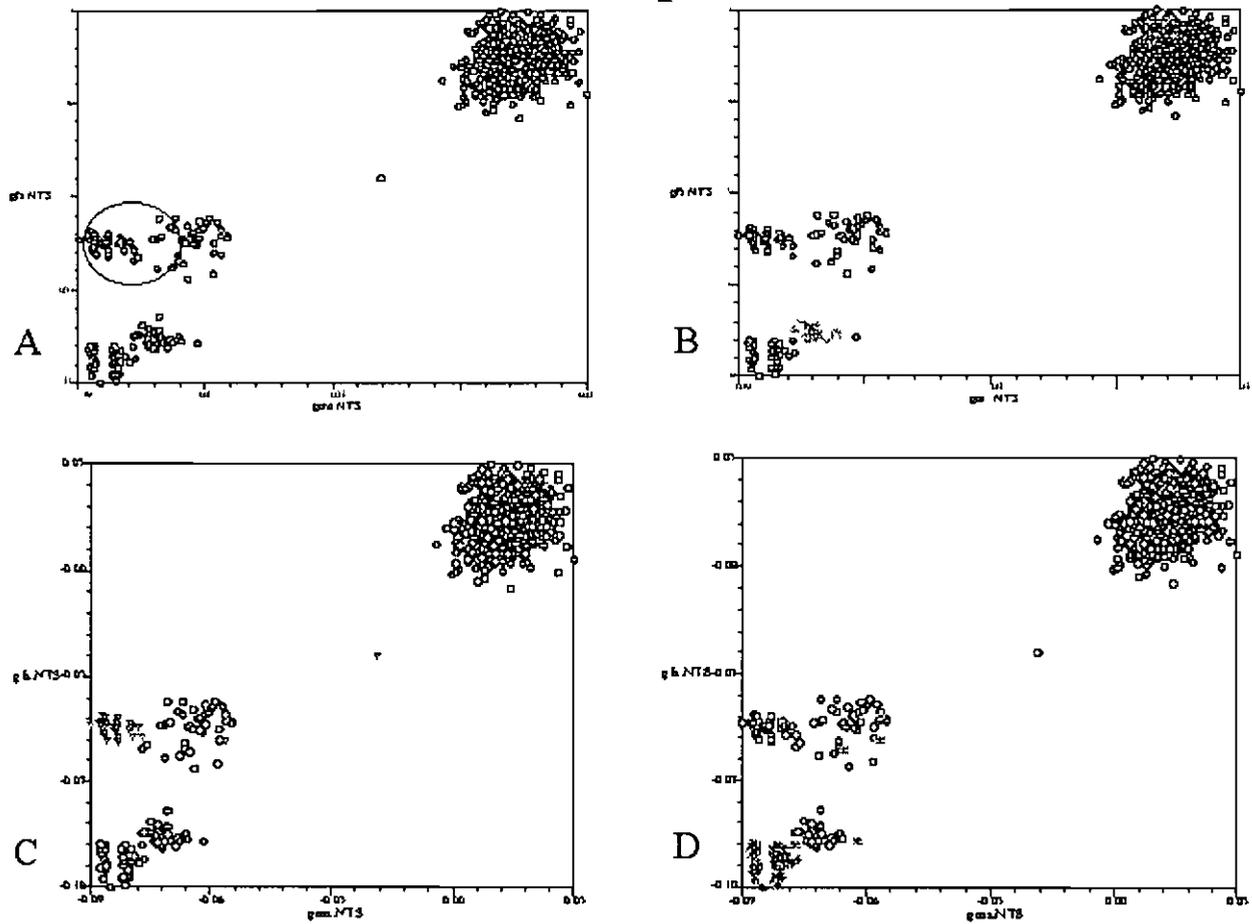
#### 4 9 4 Correlacion de las matrices de similitud

La comparacion de las matrices de similitud obtenidas con las combinaciones M y N para el grupo de anonaceas mostro alta correlacion ( $r = 0.93$ ), y se observo que las dos detectaron a un nivel similar la variabilidad genetica del grupo (Fig 9)

Figura 9 Analisis de correlacion de las matrices de similitud obtenidas con las combinaciones de cebadores M y N, en el analisis de variabilidad de accesiones de diferentes especies de anonaceas El eje horizontal muestra la similitud entre las muestras detectadas por la combinacion M, el eje vertical la similitud explicada por la N La similitud entre las muestras que se ubican en la diagonal esta siendo igualmente explicada por las dos combinaciones de cebadores



En el grupo de guanabanos, las matrices de similitud genética obtenidas para cada combinación de cebadores estuvieron también altamente correlacionadas ( $r = 0.95$ ). El análisis de correlación también determinó que la combinación F logró diferenciar mejor algunas accesiones que la combinación M (Figura 10)



**Figura 10** Análisis de correlación de las matrices de similitud de las accesiones clasificadas como *A muricata* generadas con las combinaciones F v M. En las cuatro imágenes el eje horizontal muestra la similitud entre las muestras detectadas por la combinación M, el eje vertical la similitud explicada por la F. La similitud entre las muestras que se ubican en la diagonal está siendo igualmente explicada por las dos combinaciones de cebadores. Las que se ubican por fuera están siendo mejor diferenciadas por el primer F (ver círculo en [A]). El grupo principal de guanábanos se ubica en el extremo superior de la diagonal, mostrando la alta similitud detectada por las dos combinaciones. En [B] la accesión 1920 (rombos verdes) es diferente de la mayoría del grupo y lo detectan igual las dos combinaciones. En [C] ASP GV34 tiene poca similitud con las demás y esto es mejor explicado con la combinación F. En [D] las dos combinaciones muestran que 1958-3 es la más diferente de todas.

Estos resultados muestran la conveniencia de utilizar los marcadores AFLP en el análisis de variabilidad genética de guanabanos y de especies de anonáceas relacionadas, principalmente por el alto número de marcadores polimórficos que ofrece cada combinación de cebadores. Igualmente los resultados justifican la utilización de solo dos combinaciones de cebadores para el análisis, no solo porque los utilizados estuvieron entre las tres combinaciones que más polimorfismo ofrecieron, sino porque presentaron similitudes altamente correlacionadas.

#### **4 9 5 Validez de la información obtenida con los marcadores AFLP para la Sistemática y la Filogenia**

*¿Cuáles son las ventajas de los AFLPs sobre otros marcadores moleculares?*

Los AFLP se obtienen de la amplificación selectiva por PCR de subgrupos de fragmentos de ADN de restricción. La técnica para generarlos incluye entonces la digestión del ADN total de la planta, con dos enzimas de restricción, la ligación de adaptadores que permiten la unión de cebadores para PCR, y la amplificación selectiva de fragmentos por PCR utilizando cebadores específicos. La amplificación es selectiva gracias a la presencia de dos o tres nucleótidos en el extremo 3' de los cebadores. Estos nucleótidos solo permiten la amplificación de los fragmentos de restricción que tengan nucleótidos complementarios en su extremo 5'. Los patrones de AFLP de las muestras se visualizan en geles desnaturizantes de poliacrilamida, obteniendo generalmente entre 50 y 100 bandas por muestra (Vos *et al*, 1995). Esta técnica es reproducible ya que los marcadores se amplifican a temperaturas entre 65 y 56°C, diferente a lo que ocurre con las amplificaciones en los RAPD. También puede ser automatizada, utilizando un secuenciador, colorantes fluorescentes y marcadores de peso estándar, lo que permite reducir el tiempo requerido en la toma de datos, que es quizás la etapa más extensa de la técnica (De Riek *et al*, 1999). Otra característica interesante de la técnica es que hace un muestreo de la variabilidad de todo el genoma. Los RFLP detectan la variabilidad de secuencias específicas conocidas y los microsatelites lo hacen de secuencias repetitivas ubicadas generalmente en la cercanía del centromero.

Powel *et al* en 1996 estudiaron la utilidad de cuatro tipos de marcadores moleculares, RFLP (polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción), RAPD (polimorfismos en fragmentos amplificados al azar), microsatelites (SSR) y AFLP en el análisis de germoplasma de dos especies de soya (*Glycine max* y *G soja*). Determinando índices de heterocigocidad esperada y de número de loci analizados por experimento (índice "multiplex") mostraron que los AFLP son los de mayor utilidad principalmente por su alto índice "multiplex". Esto puede hacer más eficiente la generación de marcadores, y contribuir a que el análisis estadístico sea más robusto ya que las bandas generadas representan un muestreo más grande de la variación.

genética que pueda estar presente. También mostraron que la similitud genética entre genotipos revelada por los AFLP es similar a la revelada por RAPD y RFLP y superior a la revelada por los microsatélites.

Los marcadores AFLP se heredan en forma mendeliana y por esto pueden ser utilizados en el mapeo de loci genéticos, en la identificación de genes y en la determinación de pedigrís.

Todas las características enumeradas hacen a la técnica de AFLP muy poderosa para la detección de polimorfismos y para analizar la relación genética entre individuos, sobre todo cuando no se conocen secuencias de ninguna porción del genoma de la especie bajo estudio, como es el caso de las especies que fueron analizadas en el presente proyecto. En el caso del guanabano, anteriormente no se habían identificado marcadores moleculares, ni se había estudiado la genética de características de importancia económica.

#### *¿Que información aportan los AFLPs?*

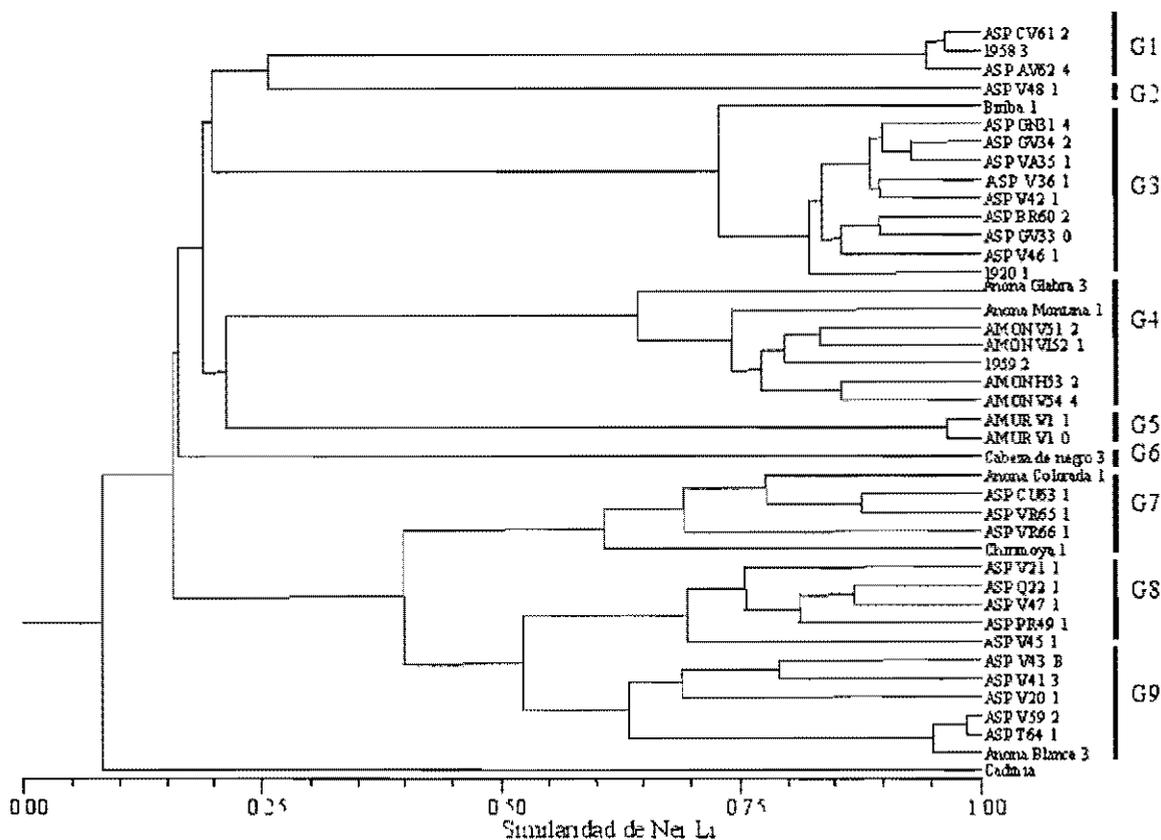
Cuando se comparan patrones de AFLP de muestras relacionadas se observan bandas comunes así como bandas diferentes entre ellas. Estas diferencias son las que se denominan polimorfismos. Los polimorfismos reflejan variaciones en los tamaños de los fragmentos de restricción y se originan por modificaciones del ADN, que pueden ser mutaciones que crean o eliminan sitios de restricción, e inserciones, deleciones e inversiones que ocurren entre dos sitios de restricción.

#### *¿Que información no aportan los AFLPs que sí aportan otros marcadores moleculares?*

En el estudio de Powel *et al* los marcadores AFLP junto con los RAPD presentaron los niveles de heterocigocidad (diversidad genética) más bajos. Esto se debe a que son marcadores dominantes o sea que no distinguen todos los alelos de un locus. En un análisis con AFLP, varios alelos que amplifican pero que presentan diferentes tamaños (por cambios en el sitio de restricción), se toman como loci (bandas) diferentes, también ocurre que algunos alelos no amplifican porque falta homología con los nucleótidos selectivos del cebador. El resultado es que no se están detectando los heterocigotos (aunque algunos autores proponen que se pueden distinguir homocigotos de heterocigotos por la intensidad de la banda, van Eck *et al*, 1995), y la diversidad genética presente se está subestimando (Powel *et al*, 1996). Cada estudio va a tener su distorsión específica con respecto a la variabilidad real que presente el organismo analizado. No se debe olvidar, sin embargo, que la falta de precisión en la evaluación de la diversidad genética es parcialmente compensada por la cantidad de marcadores producidos.

Las mediciones de diversidad con AFLP se realizan entonces con base en compartir bandas y no alelos, como es el caso con los microsatelites y los RFLP (Powel *et al* , 1996, Caicedo, 1996)

Figura 11 Dendrograma resultante del analisis de similaridad con el indice Nei-Li (1979) de muestras de anonaceas, a partir de sus patrones de AFLP (combinaciones de cebadores M y N) A la derecha se encuentran señalizados los diferentes agrupamientos detectados a un nivel de similaridad de 0.55



#### 496 Variabilidad Genética e Identificación Taxonómica de las Acciones de Especies de Anonaceas

El analisis del coeficiente de similaridad segun la ecuacion de Nei-Li (1979) arrojó el dendrograma que se presenta en la figura 11, el cual muestra, a nivel de 0.10 de similaridad dos grandes grupos, uno en el que se colocan todas las acciones pertenecientes a los generos neotropicales *Annona* y *Rollinia* objeto de este estudio, y el otro donde se encuentra la tambien anonacea *Cadmia* (*Cananga odorata*), de origen asiatico, utilizada como testigo (grupo de referencia externo al grupo) u "outgroup" (muestra 39 de la figura 7) Ya concentrandose solo

en las accesiones neotropicales a un nivel de similaridad de 0.16 es posible detectar dos grandes agrupamientos y a 0.55 se detecta un total de 7 agrupamientos y 2 accesiones que aparecen solas (Fig. 11 marcados con G1 al G9)

Después de un análisis más detallado de las accesiones que se localizan en cada agrupamiento, y en vista de que la afiliación taxonómica de varias de estas se conoce con certeza, es posible deducir que cada uno de los agrupamientos detectados a un nivel de similaridad de 0.55 corresponde a por lo menos una especie de los géneros *Annona* o *Rollinia*, tal como se representa en la Figura 12. Los grupos que presentan patrones de bandas de AFLP representativos (Figura 13), se explican a continuación

Figura 12 Agrupamientos detectados a un nivel de similaridad de 0.55 en el dendrograma de la Figura 11 para las anonáceas muestreadas. A la derecha de los agrupamientos se encuentra la especie a la que posiblemente pertenecen

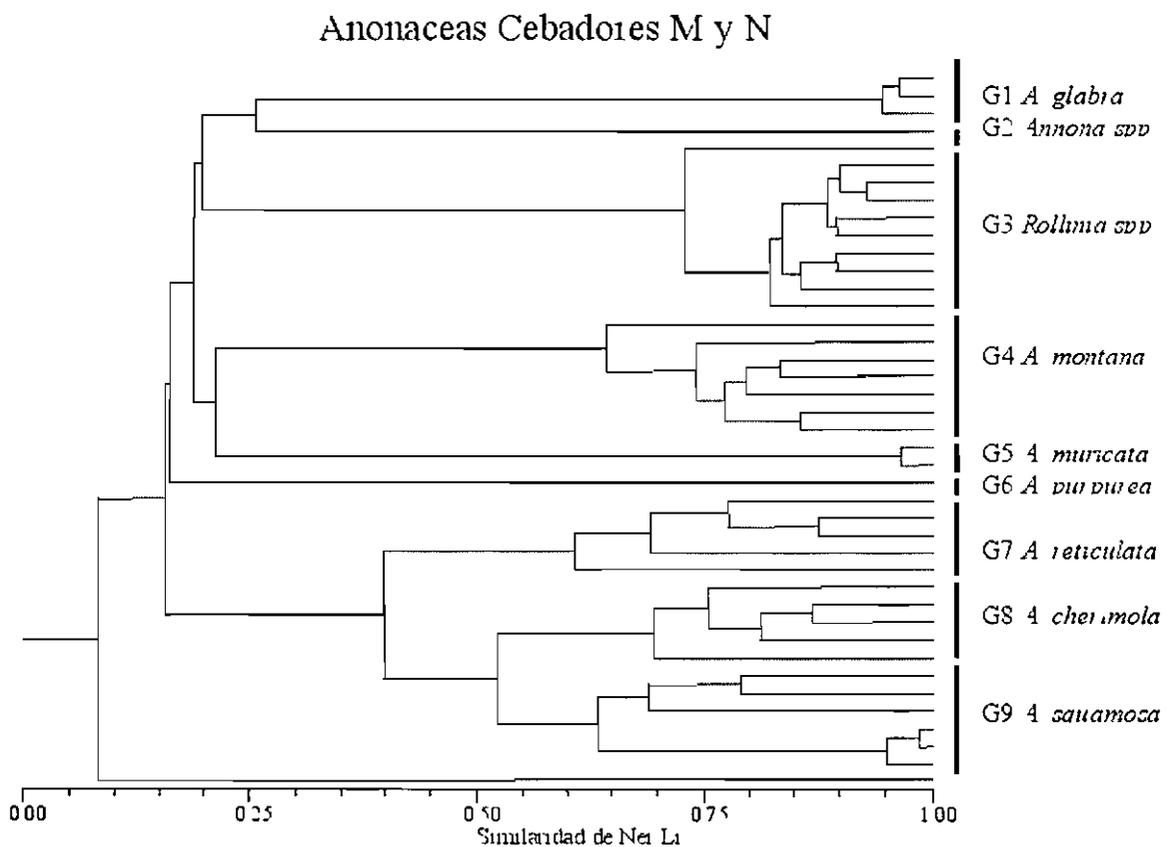
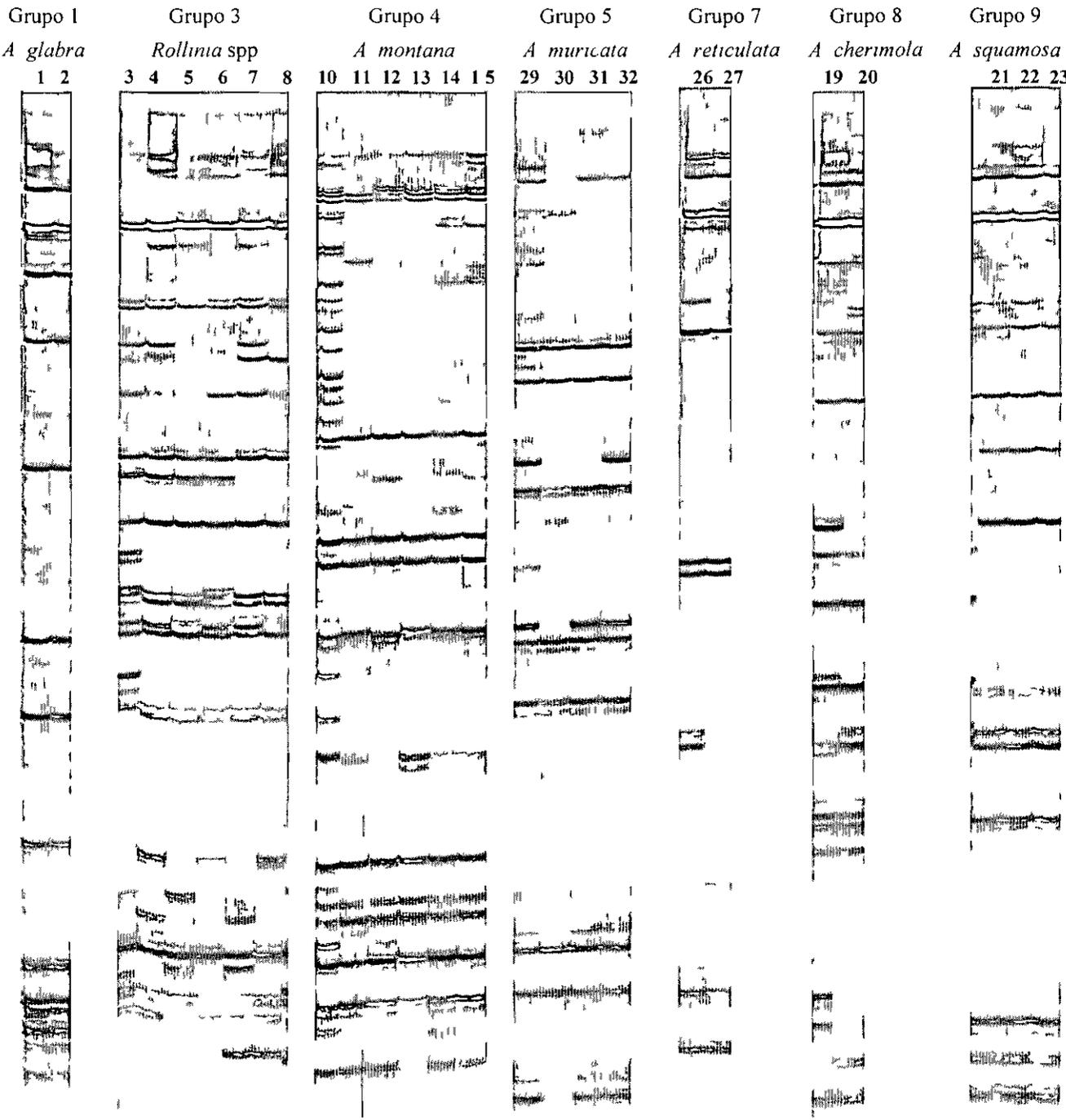
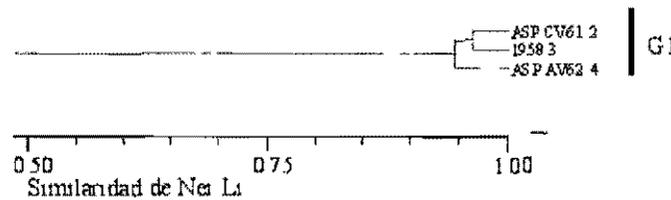


Figura 13 Patrones de bandas de AFLP representativos de los agrupamientos mas importantes, obtenidos con la combinacion de cebadores M (solo la mitad superior del gel es presentada)



## Grupo 1

Este agrupamiento corresponde con bastante seguridad a la guanabana de pozo, anona lisa, o guanabanilla (pond apple o alligator apple en ingles), especie *A. glabra*, la cual se encuentra distribuida en todo el Caribe hasta las costas de la Florida (Castañeda 1991). A pesar de que las accesiones muestreadas provienen de diferentes lugares de la region del Choco biogeografico colombiano la similaridad entre ellas es bastante alta (mayor a 0.90). El fruto de esta especie es algo insipido, y por lo tanto no tendria aceptacion en el mercado, sin embargo por su adaptacion a suelos humedos con mal drenaje podria ser un buen patron para los guanabanos. C. Biotec y CIAT lo han evaluado en la microinjertacion con clones de guanabano, injertos se han producido, pero estos son de muy lento crecimiento y presentan sintomas de incompatibilidad en la zona de injertacion. La accesion 1958-3 perteneciente a esta especie, no presento incidencia de antracnosis en la evaluacion realizada en el proyecto. Esta caracteristica seria de importancia en el mejoramiento genetico del guanabano, en general altamente susceptible a esta enfermedad, pero el diferente grado de ploidia de estas dos especies (Tabla 9), y la baja similaridad genetica entre ellas (0.16), podria dificultar la obtencion de hibridos fertiles.



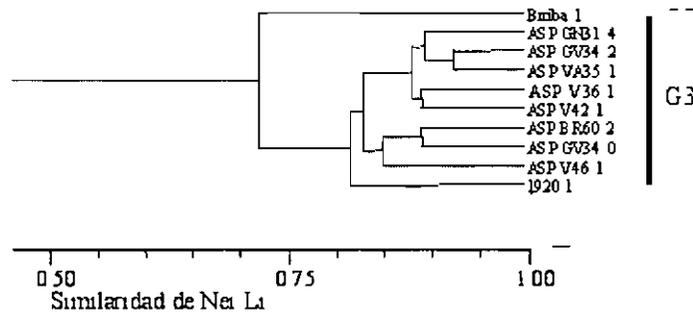
## Accesion clasificada como ASP-V48

Esta accesion solo se une con el Grupo 1 a un nivel de 0.25 de similaridad. Es de semillas, y hojas mas grandes que las de las otras anonaceas. Fue traída de los EEUU y su colector describe su fruto como de alrededor 2 kg de peso, de pulpa amarilla. Se desconoce a que especie pertenece y como la planta es aun muy pequeña, la clasificacion de esta con metodos clasicos se dificulta.

## Grupo 3

Aqui se agruparon accesiones con las caracteristicas tipicas de los anones amazonicos o biribas, que posiblemente pertenecen a la especie *Rollinia mucosa*. Esta es una especie hexaploide ( $2n = 42$ ) de amplia distribucion en la region amazonica. La accesion clasificada como biriba en el banco, mostro diferencias con las otras de este grupo (0.75 de similaridad) seria necesario aumentar la muestra para concluir sobre las diferencias entre estas accesiones.

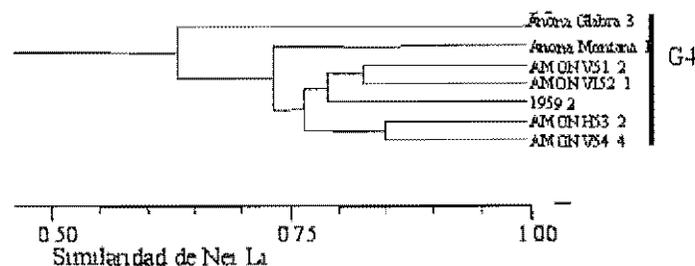
Varias de las accesiones analizadas producen frutos de exquisito sabor, los cuales sin embargo tienen el problema del oscurecimiento de la cascara ocasionado por el manejo, lo que les hace perder atractivo. La variabilidad encontrada en este grupo es bastante grande, y podría ser utilizada para mejorar esta característica. Por su grado de ploidía diferente al de la guanabana, difícilmente podrían producirse híbridos fértiles con esta especie. Las accesiones de este grupo no mostraron incidencia de antracnosis, razón por la cual valdría la pena evaluarlas como patrón del guanabano.



#### Grupo 4

La mayoría de las accesiones de este agrupamiento corresponden con bastante seguridad a la guanabana cimarrona o de monte (*A. montana*) de amplia distribución en la región del Chocó y la Amazonia. Se ha reportado hasta en Bolivia (Vasquez y Coimbra, 1996). Esta especie posee características típicas diferentes a las de las otras anonáceas, que la hacen inconfundible, como la producción de frutos redondos con escamas bastante pequeñas con pulpa y semillas de color amarillo. La accesión 1959-2 puede clasificarse sin lugar a dudas como perteneciente a esta especie. Con relación a la accesión identificada como "*Annona glabra*" es necesario verificar si está bien clasificada como tal o si más bien pertenece a la especie *A. montana*, ya que su morfología y ubicación en el grupo de esta especie lo sugiere.

El fruto de esta especie es algo insípido, pero su jugo es aromático, de color amarillo y de una consistencia viscosa diferente al de la guanabana. Su evaluación por parte de la industria procesadora y productora de jugos podría dar resultados interesantes. C. Biotec y CIAT han estado evaluando esta especie como patrón de microinjertos de guanabano. Los injertos han mostrado una buena compatibilidad y ya se cuenta con árboles de cerca de 2 años de edad sembrados en el campo para evaluación agronómica.



### Grupo 5

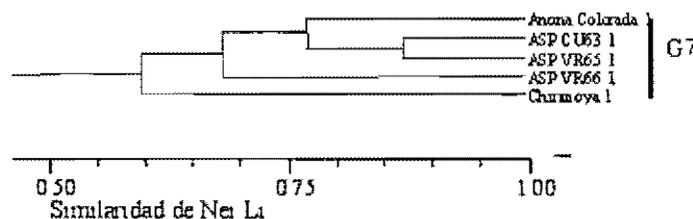
Este grupo corresponde a las accesiones claramente identificables como pertenecientes a la especie *A. muricata* y va a ser analizado en detalle mas adelante

#### Accesion Clasificada como *A. purpurea*

La accesion clasificada como “cabeza de negro” solo agrupo con otras a un nivel de 0,15 de similitud. Se trata posiblemente de la especie *A. purpurea*, tambien conocida como soncoya, guanabana tosete o manirote (Perez Arbelaez 1990). Segun Castañeda (1991) esta especie se distribuye desde el sur de Mexico hasta Colombia y Venezuela y produce un fruto aproximadamente de 20 cm de diametro con pulpa abundante, agradable al olfato, de olor particular que recuerda al del mango, de sabor algo insipido, de color anaranjado y contextura fibrosa. Es utilizado en Venezuela como patron de la guanabana (Guzman 1982) y valdria la pena evaluarlo en ese sentido en el pais.

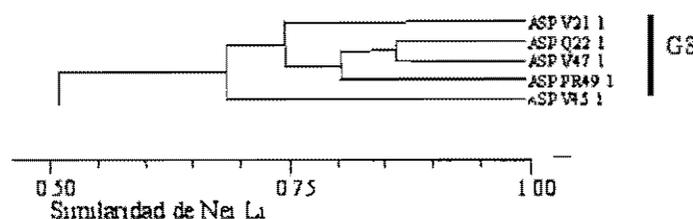
### Grupo 7

Con bastante seguridad este grupo incluye accesiones de la especie *A. reticulata* conocida con los nombres vulgares de anona colorada, mamon o corazon de buey. Este grupo se puede deducir una variabilidad intermedia ya que los niveles de similitud se encuentran entre 0.62 y 0.88. Dicha variabilidad podria ser utilizada en programas de mejoramiento ya que incluye accesiones con frutos bastante atractivos de colores amarillo rojizo (Fig. 18B) y otra altamente productivas (33% de polinizacion natural), identificada en el banco como chirimoya. Ya que como se discute abajo los chirimoyos, pertenecientes a la especie *A. cherimola* son de clima frio y dificilmente se adaptarian a las condiciones climaticas del Valle del Cauca, es necesario revisar con detenimiento la afiliacion taxonomica de esta accesion. La variabilidad presente en este grupo permitiria el planteamiento de programas de seleccion de variedades adaptadas a diferentes zonas agroecologicas y de cruzamientos para mejorar ciertas caracteristicas.



### Grupo 8

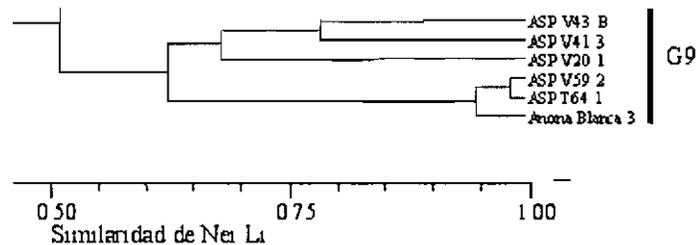
Las accesiones ASP-V21-1, ASP-Q22-1 y ASP-V47-1 fueron obtenidas de frutos con las características típicas de las chirimoyas que se cultivan en Colombia y otros países andinos por encima de los 1500 metros de altitud. Corresponden con bastante seguridad a la especie *A cherimola*. Sorpresivamente se localizó en este grupo una accesión importada por un agricultor del Valle del Cauca con el nombre de Atemoya (ASP-V45-1), mientras que las otras Atemoyas (ASP-V43 y -41) se agruparon con los anones (grupo 9), lo que se puede deber al carácter híbrido de la atemoya y a la segregación de los marcadores. Cabe anotar que el banco parece no contar con accesiones de la especie *A cherimola* (las accesiones de esta especie analizadas fueron cultivadas en invernaderos del CIAT), lo que se puede explicar por el requerimiento de esta especie de temperaturas por debajo de los 20°C para su crecimiento. Esto sugiere la necesidad de crear un banco genético satélite del localizado en C I Corpoica Palmira, en otro lugar con temperaturas más frescas, que albergue la variabilidad de chirimoyas y anonáceas de clima frío.



### Grupo 9

En este grupo se localizaron los típicos anones de tierra caliente producidos en el área de Girardot y el Espinal, Colombia, y que se consiguen en los supermercados colombianos. Sin lugar a duda estos corresponden a la especie *A squamosa* que se caracteriza por las escamas protuberantes de la cascara, las cuales se separan fácilmente. Igualmente se agruparon accesiones de Atemoyas importadas por agricultores y viveros del Valle del Cauca, de la

Florida (USA) Su caracter hibrido entre *A squamosa* y *A cherimola* se sugiere del analisis de agrupamiento La variabilidad presente en estos hibridos con respecto a las especies progenitoras, justificaria programas de seleccion de nuevas variedades de este frutal, adaptadas a diferentes zonas agroecologicas del pais



Las especies de anonaceas caracterizadas a nivel molecular se describen en la tabla 9

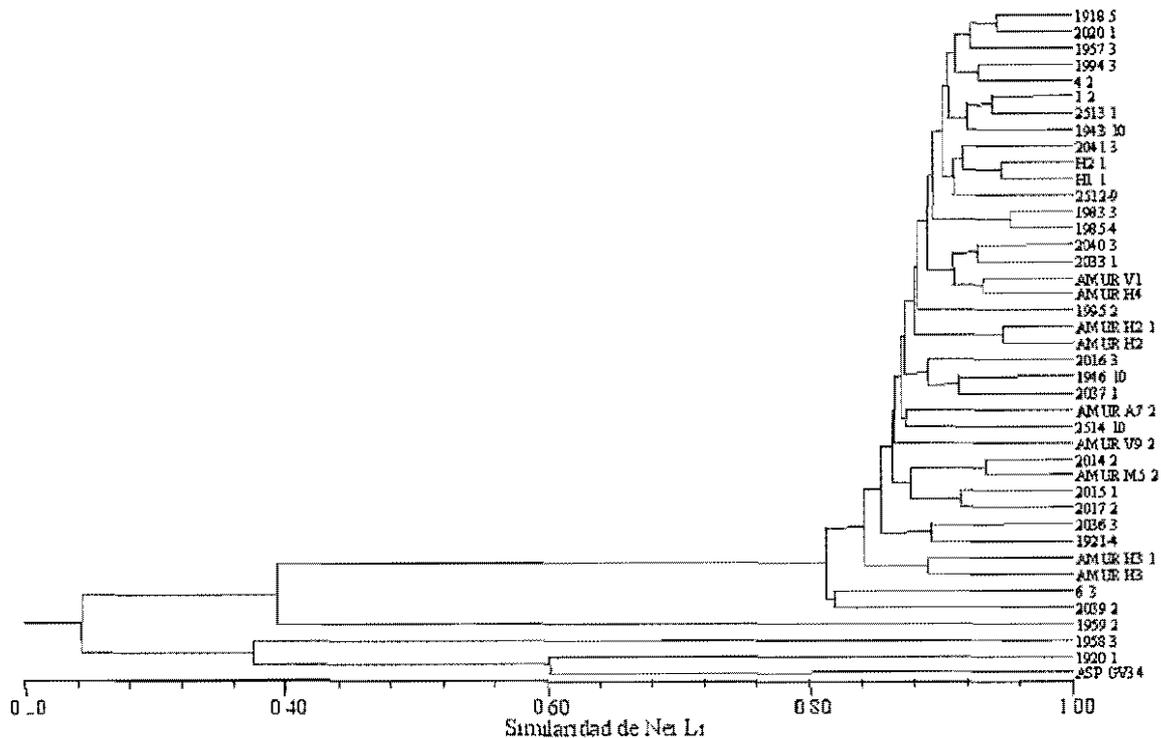
#### 4 9 7 Variabilidad Intraespecifica en Guanabano

Las accesiones del grupo de guanabanos presentaron similitudes entre 0 80 y 0 95 (Fig 14) A nivel de 0 83 de similitud se observan dos subgrupos, el Subgrupo 1 que incluye 2 accesiones, la 6-3 de Palmira-Valle y la 2039-2 de Sonso-Valle, y el Subgrupo 2 que incluye un total de 35 accesiones de diverso origen Se observan algunos subgrupos con similitudes superiores al 0 90, como son el de AMUR M5 y 2014 (0 93 de similitud), que son accesiones de fruto pequeño colectadas en Cienaga (Magdalena- Colombia) y Barinas (Venezuela), respectivamente, el de 1 y 2513 (0 93) que son dos accesiones colectadas en Palmira, y entre 2015 y 2017 (0 91), que fueron colectadas en Fusagasuga y Buga, respectivamente Sin embargo, en general, el grupo es bastante homogneo y muestra un alto nivel de similitud

Las relaciones geneticas establecidas a partir del analisis con las dos combinaciones de cebadores no permiten detectar grupos organizados por su origen geografico Por ejemplo, presentan alta similitud accesiones colectadas en diferentes regiones biogeograficas como 1983 y 1985 (0 96), colectadas en Palmira (region andina) y Bajo Calima (region del Choco biogeografico), respectivamente y AMUR A7 y 2045 (0 87) originarias de Turbo-Antioquia, y Palmira-Valle, respectivamente AMUR H2 y AMUR H4 provenientes del departamento del Huila y donde se cultivan comercialmente presentan una similitud de 0 86 Otro material que se cultiva comercialmente en el Huila es AMUR H3 Su semilla fue traída de Costa Rica por un agricultor en 1990 y se ha difundido rapidamente por la region de Yaguara- Huila, AMUR H3 se une al subgrupo de AMUR H4 a un nivel de similitud de 0 84

El hecho de que no sea detectable una relacion entre los agrupamientos y el origen geografico de las accesiones se puede deber a que semillas de esta especie hayan sido transportadas por el hombre continuamente de una region a otra

Figura 14 Dendrograma resultante del analisis UPGMA de estimados de la similaridad genetica segun Nei L1 basado en el analisis del patron de bandas de ADN (combinaciones de cebadores F y M), de las diferentes accesiones clasificadas como pertenecientes al guanabano. La accesion ASP-GV34 corresponde a un 'outgroup' del genero *Rollinia* mientras que las accesiones 1959-2, 1958-3 y 1920-1 resultaron pertenecer a especies diferentes al guanabano



A pesar de la alta similaridad encontrada entre las diferentes accesiones del guanabano, se detecto heterogeneidad entre las accesiones AMUR H3 y AMUR H2 y sus progenies resultantes de propagacion sexual AMUR H3-1 (similaridad de 0.89), AMUR H2-1 (similaridad de 0.95) respectivamente. Esto sugiere cierto grado de diferenciacion en estas accesiones, el cual puede explicarse por la ocurrencia de polinizacion cruzada en los cultivos de guanabano. La polinizacion cruzada en el guanabano es facilitada por escarabajos de la especie *Cyclocephala* (Villalta 1988). Estos se observan constantemente en las flores de los guanabanos de los lotes experimentales del CIAT. La polinizacion cruzada es favorecida en el guanabano igualmente por el mecanismo conocido como protoginia, que se presenta cuando la receptividad estigmatica comienza antes que se inicie la viabilidad del polen en la flor, impidiendo que los organos "masculino" y "femenino" maduren al mismo tiempo para la

reproduccion (Escobar, 1983) Valdría la pena profundizar mas sobre este aspecto, tan importante en la productividad de los cultivos comerciales del guanabano y realizar estudios de biología floral, combinados con analisis con marcadores moleculares de semillas resultantes de polinización natural

Es importante resaltar que aunque las accesiones de guanabanos hayan mostrado alta similaridad entre ellas, estas no presentaron patrones de AFLP iguales, lo que indica la no existencia de duplicados en la coleccion, es decir, de accesiones genéticamente iguales

La reducida variabilidad genética detectada en esta especie en comparación con otras especies de anonáceas analizadas en la presente investigación se puede explicar de diferentes maneras

- Las accesiones muestreadas, que corresponden en su mayoría al departamento del Valle del Cauca, representan solo una variabilidad genética reducida de la aun disponible en el trópico americano,
- La popularidad y el delicioso sabor de este frutal han hecho que el hombre haya participado activamente en la amplia difusión de una variabilidad genética estrecha,
- La mayoría de las accesiones de guanabana muestreadas no son representativas de toda el área de distribución del centro de la especie

La baja similaridad observada en la agrupación de las muestras de *A muricata* con las otras especies de anonáceas indica una distancia genética importante, la cual puede obstaculizar la transferencia de genes de interés de las especies relacionadas aquí evaluadas al guanabano, por medio de los métodos de mejoramiento tradicional. En este sentido Nakasone y Paull (1998), y Samuel *et al* (1991) reportan que ensayos de cruces de guanabano con chirimoya, ilama (*A diversifolia*), anona colorada (*A reticulata*) o anon no han sido exitosos. Igualmente Mohd-Kahlid (2002) reporta intentos de hibridizar las especies *Annona muricata*, *A squamosa*, *A glabra*, *A montana*, *Rollinia mucosa*, y *A reticulata* en todas las combinaciones posibles y reciprocos. La obtención de semillas viables solo fue posible en hibridaciones entre *A muricata* y *A montana* y *A muricata* y *Rollinia mucosa*. Sin embargo no se obtuvieron híbridos fértiles. Esto sugiere que cualquier esfuerzo de mejoramiento de clones o variedades de guanabano debe centrarse en el germoplasma disponible en la especie *muricata* o en otras especies diferentes de las evaluadas en este estudio.

Los resultados obtenidos en el presente análisis plantean la necesidad de realizar colectas que incluyan un mayor número de regiones agroecológicas de toda el área de distribución natural de la especie que se extiende desde las Antillas hasta el norte de Sudamérica (Morton 1987) para incrementar la variabilidad genética de la colección.

Tabla 9 Especies de *Annonaceae* caracterizadas a nivel molecular y su distribución en Colombia (por zonas biogeográficas)

ESPECIE	NOMBRE COMUN	DISTRIBUCION EN COLOMBIA <sup>1</sup>	ALTITUD <sup>1</sup>	COLECCIÓN DE REFERENCIA <sup>1</sup>	PLOIDIA (Referencia)	ACCESIONES DISPONIBLES
<i>Annona muricata</i>	Guanabana catuche graviola zapote agrio sorsaka, (“soursop en inglés)	and, amz ori, pac pu snt vc	100 2000	J Cuatrecasas 9695 [COL] <sup>2</sup>	2n = 2x = 14 NW Simmonds (1998)	AMUR V1 AMUR H2 AMUR H3 AMUR H4 AMUR M5 AMUR A7 AMUR V9 1 1918 1919 1921, 1943 1946 1957 1983 1985 1994 1995 2014, 2015, 2016 2017, 2020 2033 2036 2037 2039 2040 2041 2042 2045, 2511 2512, 2513 2514, 4 6, H-1, H-2
<i>A. cherimola</i>	Chirimoya chirimorrinon (custard apple en inglés)	and	1600 - 1900	S Diaz 3162 [COL]	2n = 2x = 14 NW Simmonds (1998)	ASP V21 ASP Q22 ASP V47 ASP PR49
<i>A. montana</i>	Guanabana cimarrona guanabana del Choco	pac	60 120	H Leon 332 [COL]	2n = 2x = 14 Samuel <i>et al</i> (1991)	AMON-V51 AMON V152 AMON H53, AMON V54 1959 <i>Annona montana</i> accesion clasificada como <i>Annona glabra</i>
<i>A. squamosa</i>	Anon ata, anona blanca (sweetsop, sugar apple custard apple, en inglés)	and	340 1300	J Duque 3571 [COL]	2n = 2x = 14 NW Simmonds (1998)	ASP-T64 ASP V59 anona blanca
<i>A. squamosa</i> x <i>A. cherimola</i> (híbrido)	Atemoya	Introducido de la Florida, USA			2n = 2x = 14 NW Simmonds (1998)	ASP V20 ASP V41 ASP V43 ASP V45
<i>A. glabra</i>	Anon liso	car pac	0 - 200	R Romero 10506 [COL]	2n = 4x = 28 NW Simmonds (1998)	ASP CV61 ASP-A62, 1958

<i>A reticulata</i>	Anona colorada mamon corazon de buey ( bullock s heart en inglés)	and car	500 1900	J Walker 259 [COL]	2n = 2x = 14 Nakasone y Pauli (1998)	ASP VR65 ASP-VR66 Anona Colorada ASP- CU63 Chirimoya <sup>1</sup>
<i>A purpurca</i>	Soncoya guanábana tosete cabeza de negro manirote	car	300	H Cuadros 4635 [COL]		Cabeza de Negro
<i>Rollinia mucosa</i>	Anón amazónico biriba condesa corosal	and amz pac	20 1000	G Lozano 420 [COL]	2n = 6x = 42 Samuel <i>et al</i> (1991)	ASP GN31 ASP VA32 ASP GV33 ASP GV34 ASP VA35 ASP V36 ASP-BR60 ASP V46 1920 ASP V42 Biriba

Murillo-A, 2001, La distribución corresponde a zonas biogeográficas nacionales Pacífico (Pac), Amazonia (Amz), Caribe (Car), Orinoquia (Ori), Andina (And) 2 [COL] es el Herbario Nacional Colombiano

**498      Implicaciones de los Resultados del Analisis Molecular para la Taxonomia de las Especies del Genero *Annona* y de los Generos *Annona* y *Rollinia***

La clasificacion taxonomica mas completa del genero *Annona* a la que se tuvo acceso es la de Safford, en ella se incluyen 60 especies divididas en 5 grupos y 14 secciones (1914, Tabla 10, solo se listan las especies estudiadas en la presente investigacion) Posteriormente Fries (1931) realizo una revision de las especies de algunos generos de *Annona* Para estas clasificaciones solo se tuvieron en cuenta marcadores de tipo morfologico El estudio mas reciente sobre el mismo tema, es el realizado por Samuel *et al* (1991) en el cual se utilizaron 11 loci de aloenzimas, y se incluyeron accesiones de las especies del genero *Annona* (*A muricata*, *A montana*, *A reticulata*, *A cherimola* y *A glabra*), del genero *Rollinia* (*Rollinia mucosa*), ademas de otras tres especies de otros generos de anonaceas Los resultados mas importantes de este estudio se presentan en las Figuras 15 y 16

TABLA 10 Clasificacion del genero *Annona* segun Safford (1914, tomado por Escobar y Sanchez, 1992, se incluyen en la tabla solo las especies objeto del presente estudio)

GRUPO	SECCION	ESPECIE
1 GUANABANI	1 Euannona	<i>A muricata</i> L <i>A montana</i> L
	2 Psammogentia	
	3 Ulocarpus	<i>A purpurea</i> Mac y Sesse
2 PILAEFLORAE	5 Pilannona	
	6 Gamopetalum	
3 ACUTIFLORAE	7 Phelloxylon	<i>A glabra</i> L
	8 Atractanthus	
	9 Chelonocarpus	
4 ATTAE	10 Atta	<i>A squamosa</i> L <i>A cherimola</i> Mill <i>A reticulata</i> L
	11 Ilama	
	12 Saxigena	
5 ANNONELLAE	13 Annonula	
	14 Annonella	

Figura 15 Dendrograma basado en las distancias genéticas entre 5 generos de la familia Annonaceae propuesto por Samuel *et al* , segun resultados obtenidos con 11 loci alloenzimaticos (Samuel *et al* 1991)

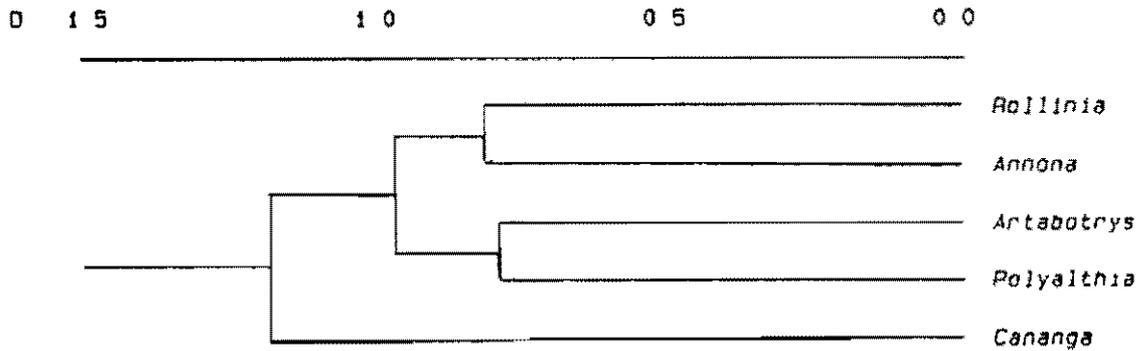
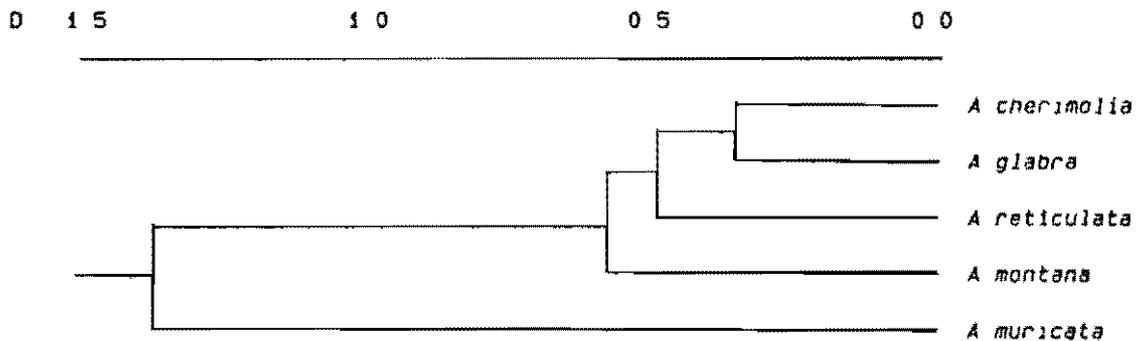


Figura 16 Dendrograma basado en las distancias genéticas entre 5 especies del genero Annona calculadas con base en los resultados obtenidos con 11 loci alloenzimaticos (Samuel *et al* 1991)



En varios aspectos los resultados del presente estudio confirman la clasificacion taxonomica realizada por Safford y se alejan bastante de los resultados obtenidos por Samuel *et al* Safford clasifica a las especies *A. cherimolia*, *A. squamosa* y *A. reticulata* dentro del grupo Attae seccion Atta las cuales estan representadas en el presente estudio por los grupos 7, 8 y 9, presentando los grupos 8 y 9 mas similitud entre si que con el Grupo 7 (lo cual explica la capacidad de las especies *A. squamosa* y *A. cherimolia* de producir hibridos fertiles cuando se cruzan) Al contrario en el estudio de Samuel aparece la especie *A. glabra* mas cercana geneticamente a *A. cherimolia* que la propia *A. reticulata*, lo que segun el presente estudio es incorrecto La especie *A. glabra*

aparece en el análisis molecular como perteneciente a un linaje completamente diferente dentro del género *Annona* y comparte menos del 0.2 de similitud con las especies del Grupo Attae, justificando su clasificación en un grupo diferente, el Acutiflorae, como lo propone Safford. Igualmente en concordancia con Safford aparecen la especie *A. montana* como la más cercana de *A. muricata* dentro de las *Annona*. Sin embargo a nivel de marcadores moleculares estas dos especies presentan apenas un 0.22 de similitud, lo que las hace aparecer bastante distanciadas genéticamente.

Lo que es bastante sorprendente es el agrupamiento de las accesiones clasificadas dentro del género *Rollinia* no como un género aparte por fuera del agrupamiento que contiene las especies del género *Annona*, sino como un agrupamiento más dentro de los obtenidos del género *Annona*. Este resultado debe ser revisado con cuidado si es posible con marcadores moleculares de otro tipo, por ejemplo mediante la secuenciación de fragmentos de ADN de cloroplasto o mitocondrias, pues estaría sugiriendo que la clasificación taxonómica de *Annona* y del género afín *Rollinia*, ampliamente aceptada en la literatura, debería ser revisada y corregida. Una reclasificación del género *Raimondia*, el que de la misma manera incluye especies que producen frutos sincarpicos comestibles, sugiere Rainer en una reciente publicación (2001) quien lo incluye como un subgrupo del género *Annona*.

#### **4.9.9      Objetivo No. 3. Inventario Preliminar de la Variabilidad Genética de Guanabanos y Anonáceas Afines Existentes en Herbarios y Colecciones Nacionales**

Para cumplir con este objetivo se visitaron los tres principales herbarios del país: Herbario Nacional Colombiano (COL) del Instituto de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, Herbario Amazónico (COAH) del Instituto de Estudios Amazónicos "Sínchi", Herbario del Instituto Alexander von Humboldt (HavH). Igualmente se recibió una capacitación sobre taxonomía de anonáceas por parte del Instituto Nacional de Ciencias.

Annonaceae es una familia de árboles de sotobosque principalmente, que se caracteriza porque su corteza externa se desprende en tiras, por esto son utilizados como cargueros y porque su corteza interna es areolada. No presentan exudado, ni tienen estipulas. Sus hojas son simples, disticas (en un solo plano), y generalmente aromáticas. Sus flores son solitarias o reunidas en racimos (cimas helicoides con ramas en un mismo plano). Casi siempre tienen seis pétalos en dos grupos de tres. Los estambres son numerosos y de forma aplanada, los carpelos numerosos y libres, y los frutos generalmente apocarpicos por lo que la familia es considerada poco evolucionada (o primitiva Murillo-A, 2001 – comunicación personal).

Annonaceae es pantropical y se encuentra principalmente a menos de 2000 m de altura. A ella pertenecen aproximadamente 2500 especies de 130 géneros a nivel mundial (Maas et al., 1994).

Para Colombia se reportan 240 especies pertenecientes a 30 generos, sin embargo el numero puede aumentar porque se estan describiendo nuevos taxones de los generos *Annona*, *Crematosperma*, *Guatteria*, *Pseudoxandra*, y *Unonopsis* (Murillo-A, 2001) Los generos mas diversos en el pais son *Guatteria* (74 spp), *Duguetia* (27 spp) *Annona* (26 spp) y *Xylopia* (22 spp), el genero *Cananga*, originario de la India, solo tiene una especie en el pais, *C odorata* la cual se cultiva como ornamental (Lotero, 1976) Otros generos presentes en Colombia son *Anaxagorea* (11 spp), *Rollinia* (11), *Oxandra* (10), *Cymbopetalum* (6), *Desmopsis* (1), *Ephedranthus* (2), *Klarobelia* (2), *Mosanona* (3), *Porcelia* (3), *Malmea* (1), *Tetrameranthus* (3), *Stenanona* (1), *Bocageopsis* (2), *Raimondia* (2), *Fusaea* (2), *Pseudomalmea* (2), *Trigynaea* (1), *Guatterlopsis* (1), *Diclinanona* (2), *Froesiodendron* (2), *Guatterrella* (1), *Ruizodendron* (1) (Murillo-A, 2001)

Los generos de importancia horticola por producir frutos comestibles son *Annona*, *Rollinia* y *Raimondia* Las especies de estos generos se caracterizan por producir frutos sincarpicos Sobre ellos tres se realizo el inventario, recopilando informacion sobre especie, colector y sitio de colecta

Durante el desarrollo del proyecto se publico el primer inventario de las Annonaceae de Colombia por parte del experto Jose A Murillo (2001), investigador del Instituto Nacional de Ciencias Por esta razon los resultados obtenidos en el proyecto se relacionan con esta publicacion El articulo se puede acceder en la pagina WEB del Instituto von Humboldt [www.humboldt.org.co/download/annonaceae.pdf](http://www.humboldt.org.co/download/annonaceae.pdf)

#### **4 9 10      Objetivo No 4 Incrementar la variabilidad genetica del banco de germoplasma vivo de guanabano y anonaceas afines de C I Corpoica con materiales que se encuentran en fincas de agricultores y colecciones de universidades**

Durante la realizacion del proyecto el banco de germoplasma de guanabano y especies de anonaceas relacionadas se incremento en 23 accesiones de guanabano traídas del C I Corpoica Nataima Igualmente se incremento en 7 accesiones de 4 especies de las evaluadas molecularmente

AMON-VI52, AMON-VI51 (*A montana*), ASP-T64 (*A squamosa*) ASP-GV34 (*Rollinia spp*), ASP-CV61, ASP-A62 (*A glabra*) AMUR-V1 (*A muricata*) (Vease carta de entrega en el anexo) Otras de las accesiones evaluadas molecularmente y que no se encuentran en el banco, estan siendo propagadas para ser entregadas al C I Corpoica Palmira

#### **4 9 11      Objetivo No 5 Diseñar estrategias de utilizacion sostenible de la variabilidad caracterizada, en la produccion de material de siembra para el establecimiento de cultivos tecnificados**

Vease impactos

#### **4 9 12      Estrategias de comunicacion**

Los avances de esta investigacion fueron consignados en un informe de avance presentado a Colciencias en Enero de 2002, y en los informes anuales internos del CIAT de los años 2001 y 2002 (ver copia del informe anual 2002 en el anexo 5)

Tambien se presentaron resultados parciales en el Primer Congreso Nacional de Biotecnologia (2002), organizado por el Instituto de Biotecnologia de la Universidad Nacional de Colombia (ver resumen de la ponencia en el anexo 5) y en el Encuentro Regional (Suroccidente colombiano) de Ciencia y Tecnologia organizado por Colciencias (Octubre de 2002, ver resumen de la presentacion en el anexo 5)

El presente informe sera la base para la realizacion de dos publicaciones, una sobre el analisis de variabilidad genetica con marcadores moleculares de las anonaceas estudiadas, y una sobre el estudio de las características agromorfológicas de la colección del banco genético nacional. Estas publicaciones se prepararan y presentaran a revistas internacionales indexadas durante los proximos seis meses

## **5            IMPACTOS**

En este estudio se caracterizaron molecularmente por lo menos 5 especies que podrian contribuir a diversificar la oferta colombiana de frutas en el mercado interno: el guanabano (*A muricata*), la chirimoya (*A cherimola*), la anona colorada (*A reticulata*), el anon (*A squamosa*) y el anon amazonico (*Rollinia spp*). Además, Colombia por poseer una gran diversidad de climas y por contar en su fauna nativa con los polinizadores naturales que son necesarios para alcanzar una alta producción de varias de estas especies sin recurrir a la polinización artificial, podría ser competitiva a nivel mundial, en la exportación de una o varias de estas especies de anonáceas.

De cada una de las especies estudiadas, que son de importancia económica actual o potencial, se detectaron accesiones que podrían ser utilizadas de manera inmediata para establecer cultivos comerciales, previa multiplicación vegetativa de estas accesiones por injertación o microinjertación.

La variabilidad encontrada en estas especies, que en algunos casos es considerable, podría ser utilizada a mediano y largo plazo, para el desarrollo de cultivares adaptados a diferentes pisos térmicos. Esto se puede lograr mediante la realización de cruzamientos entre accesiones diversas con características deseables, propagación sexual de la progenie, evaluación de poblaciones, selección de árboles con características específicas, seguido por la propagación vegetativa de los árboles seleccionados.

Del guanabano especie de la cual Colombia importa fruta de Venezuela y Ecuador, no se detectaron clones que mostraran una alta producción y que a la vez no presentaran incidencia de antracnosis. Esta es la enfermedad más importante del guanabano y ha sido la causa del fracaso de varios agricultores que han intentado establecer cultivos comerciales por encima de los 1200 msnm (zona baja cafetera). La ausencia de materiales altamente productivos que toleren la enfermedad implica que esta especie debe continuar siendo cultivada por debajo de los 1000 msnm en regiones donde el manejo de la enfermedad no presente mayores inconvenientes. Sin embargo es necesario evaluar en estudios futuros, cual es el comportamiento agronómico de las accesiones que presentaron una baja incidencia de la enfermedad y que fueron alta o medianamente productivas.

El tamaño del fruto es igualmente una característica bien importante en el guanabano. Mientras los frutos de tamaño grande son aptos principalmente para la producción de pulpa, el mercado de la fruta en fresco requiere de frutos pequeños de entre 1 y 2 kg. De peso, que se ajusten más a las necesidades de las amas de casa y familias pequeñas actuales (comunicación personal del Ing Larrota, Agronilo-Grajales). Ya que además del clon "Elita" (Vivero Profrutales S A) existen varios otros clones seleccionados por C Biotec y CIAT que producen frutos de 3 kg de peso o más y que están en proceso de evaluación, se requieren con mayor urgencia materiales que produzcan frutos pequeños. En este rango se encontraron 6 accesiones en el banco, que deberían ser evaluadas entre los 500 y los 1100 msnm en colaboración con los agricultores y comercializadores.

La alta frecuencia de polinización natural encontrada (17%) en ciertas accesiones es un aspecto interesante en el cual se debería profundizar, pues esta había sido reportada para el Valle del Cauca de ser bastante baja. Es necesario estudiar a que se debe este incremento en la polinización natural de estas accesiones, lo mismo que evaluar el comportamiento agronómico de clones de estas en diferentes regiones del país.

Los cultivares de Atemoya que se evaluaron de los cuales existen unos pocos árboles en dos fincas del Valle del Cauca merecen especial atención por la calidad de sus frutos y por no presentar mayores requerimientos para alcanzar una buena producción. Estos deberían gozar de mayor difusión en climas similares a los del Valle del Cauca pues su producción tendría una

demanda interna asegurada y podría llegar hasta a exportarse. Se han desarrollado más de diez variedades de Atemoya en los Estados Unidos, Australia e Israel, las que podrían importarse al país.

Igualmente merecen atención los anonos amazónicos que por su sabor podrían gozar de gran aceptación en el mercado. Sin embargo aún es necesario buscar y encontrar variedades a las que no se les oscurezca la cascara con el manejo, lo que les hace perder su atractiva apariencia. Seguramente existen muchas más variedades de esta y de otras especies relacionadas en la Amazonia colombiana que podrían servir para el mejoramiento de esta característica.

Por otro lado varias de las especies y accesiones evaluadas en esta investigación, aunque no presenten ningún atractivo para el consumo de la fruta, pueden servir como portainjerto de la guanabana u otras de las especies analizadas para ampliar el rango de adaptabilidad de clones seleccionados a suelos con diferentes características, o para obtener plantas con mayor tolerancia a enfermedades. Es necesario realizar programas de investigación encaminados a la evaluación de patrones o portainjertos para las especies de anonáceas de importancia económica. La C Biotec y el CIAT vienen evaluando desde el año 2000 la compatibilidad entre clones seleccionados de guanabano y portainjertos de las especies *A. montana*, *A. glabra* y *Rollinia spp.*, con resultados prometedores principalmente en injertos con accesiones con *A. montana*.

El presente es el primer estudio que se realiza sobre la variabilidad genética del guanabano a nivel morfoagronómico y molecular. En lo que se refiere a las anonáceas de importancia hortícola de los géneros *Annona* y *Rollinia*, es el primer estudio que se realiza con marcadores moleculares tipo AFLPs, los cuales poseen un alto poder de resolución para detectar diferencias genéticas entre individuos. En este sentido el estudio presenta una clara imagen de la variabilidad genética a nivel intra- e interespecífico y la relación filogenética de las especies disponibles en el banco genético conservado en el C I Corpoica – Palmira y por fuera de este, y sienta las bases para una clasificación taxonómica molecular correcta y definitiva de estas especies.

La variabilidad genética de los guanabanos detectada en el banco genético nacional, y su relación genética con otras especies afines soportan la necesidad de conservar los recursos genéticos de esta especie y la urgencia de iniciar esfuerzos nacionales e internacionales en colecta, caracterización y evaluación agronómica.

Los árboles caracterizados como productivos de óptima calidad organoléptica de fruta y con baja incidencia de antracnosis (2513-1, 2513-4, 1983-2, 1983-3, 2014-2, 2015-2, 2042-4 y H-2-1) pueden convertirse en clones y variedades de importancia comercial. Dos de estos materiales (1983-3 y 2513-1) pueden propagarse clonalmente para establecer cultivos tecnificados de aproximadamente 20 ton/ha/año de producción. La producción de los materiales sobresalientes aquí caracterizados permitiría cumplir las proyecciones realizadas para el cultivo en los próximos

10 años (Corporacion BIOTEC – CIAT, 2002), relacionadas con la sustitucion de importaciones, la consolidacion de exportaciones de pulpa y la generacion de ingresos para el pais

En el caso de que algunos de los materiales caracterizados ameriten ser comercializados, el ‘fingerprinting’ de ADN producido con los marcadores AFLP podria complementar su registro como variedades ante las autoridades competentes

Sin embargo el mayor impacto que se espera obtener con la presente investigacion es el de llamar la atencion del pais sobre la importancia de conservar y utilizar sosteniblemente un recurso genetico olvidado que podria contribuir al desarrollo de la industria fruticola nacional

## 6 CITAS BIBLIOGRAFICAS

- Bettencourt E, Hazekamp T, Perry M (1992) Directory of Germplasm Collections 6 I Tropical and Subtropical Fruits and Tree Nuts IBPGR
- Corporacion BIOTEC Centro Internacional de Agricultura Tropical (2002) Taller de Guanabana para Colombia y el Mundo Optimizacion de la cadena productiva Memorias ISBN 694 044 6
- Calderon G R (1992) Cultivo de la guanábana (*Annona muricata*) problemas fitosanitarios En Fruticultura Tropical Palmira Federacion Nacional de Cafeteros 3ª Edicion pp 227 231
- Caicedo A L (1996) Caracterizacion molecular de especies silvestres suramericanas de *Phascolus* por medio de AFLPs Tesis de pregrado Universidad de los Andes Facultad de Ciencias Depto De Ciencias Biológicas Bogotá
- Corporación Colombia Internacional Universidad de los Andes (1996) Analisis Internacional del Sector Hortofruticola para Colombia Tomo II Produccion pp 315
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JR (1983) A plant DNA minipreparation versión II Plant Mol Biol Rep 1 19
- Escobar W (1985) Estudio de la biología floral y polinización artificial del guanabano (*Annona muricata* L.) en condiciones del Valle del Cauca (Tesis Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Agropecuarias Palmira
- Escobar W, Sánchez I (1992) Manual de Asistencia Técnica ICA #57 Fruticultura Colombiana Guanábana pp 100 PM Ediciones
- Fries R E (1931) Revision der Arten eingier Anonaceen Gattungen - Acta Hort Berg 10 129 341, pl 1 27
- Gallo Perez F (1997) Manual de Fisiología Post Cosecha y control de Calidad de frutas y hortalizas Convenio SENA Reino Unido Editor SENA Regional Quindio Convenio SENA-Reino Unido Editorial KINESIS Armenia Quindio Colombia 406 p II
- George A P, Nissen R J, Brown B I (1987) The custard apple Queensland Agricultural Journal 113 (5) 287 297
- Guzman, A F (1999) Algunos aspectos agronomicos del manejo del guanábano En Memorias Curso Nacional de Frutas Tropicales Universidad Nacional de Colombia sede Palmira pp 152 170
- Guzman Fredy (1992) La Guanábana Revisión Bibliográfica En Fruticultura Tropical Palmira Federación Nacional de Cafeteros 3ª Edicion pp 232 253
- De Riek J, Dendauw J, Mertens M, De Loose M, Heursel J, Van Blockstaele E (1999) Validation of criteria for the selection of AFLP markers to assess the genetic variation of a breeders' collection of evergreen azaleas Theor Appl Genet 99 1155-1165
- Leon, J (1968) Anonaceas En Fundamentos Botánicos de los Cultivos Tropicales IICA OEA (Costa Rica) pp 467 473
- Mahbubur R, Takehiko S, Toshiya Y, John Y, Masao Y (1998) Genetical diversity of cherimoya cultivars revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis Breeding Science 48 (1) 5 10
- McLaughlin, J L, L Zeng N H, Oberlies D, Alfonso H A, Johnson and B A Cummings Annonaceous acetogenins as new natural pesticides recent progress Phytochemicals for pest control / Washington, DC American Chemical Society (1997) 117 133
- Mohd Khalid, M Z (2002) Hybridizations between selected *Annonaceae* species Acta Hort (ISHS) 575 367 369 [http://www.actahort.org/books/575/575\\_41.htm](http://www.actahort.org/books/575/575_41.htm)
- Morales C A (1996) Evaluación de la actividad insecticida de extractos de *Annona muricata* L. (*Annonaceae*) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Dip. Culidae) Tesis Facultad de Ciencias Universidad del Valle
- Murillo A Jose (2001) *Annonaceae* of Colombia Biota Colombiana 2 (1) [www.humboldt.org.co/download/annonaceae.pdf](http://www.humboldt.org.co/download/annonaceae.pdf)
- Nakasone H, Paull R (1998) Annonas Tropical Fruits pp 45-75 CAB International
- Nei M, Li W (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases Proc Natl Acad Sci USA 76 5269 5273

- Peña, J, Nadel, H Barbosa Pereira M, Smith D (2002) Pollinators and Pests of *Annona* species. In Tropical Fruits Pest and Pollinators Biology Economic Importance Natural Enemies and Control ISBN 0851994342
- Perez Arbeláez E (1990) Plantas Útiles de Colombia Editorial Victor Hugo Medellín pp 180 185
- Perfectti F, Pascual L (1998) Genetic linkage of isozyme loci in *Annona cherimola* Hereditas (Lund) 128 (1) 87 90
- Powell W Morgante M Andre C Hanafey M Vogel J Tingey S Rafalski A (1996) The comparison of RFLP RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis Molecular Breeding 2 225 238
- Rainer H Maas P J M Steyemark J A (1997) Research information MOBOT Missouri USA
- Rainer H (2001) Nomenclatural and taxonomic notes on *Annona* (Annonaceae) Ann Naturhist Mus Wien 103 B 513 524
- Rios Castaño D Barona P Reyes C E (1996) Guanabano Elita Agricultura Tropical 33 (3) 97 101
- Rivillas J B Ibarra, C A 1975 Estudio detallado de suelos y clasificación para riego y drenaje del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Palmira (Departamento del Valle) Instituto Geográfico Agustín Codazzi 106 p
- Roa A C Maya M M, Duque M C Tohme J Allem A C Bonierbale M W (1997) AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species Theor Appl Genet 95 741-750
- Rohlf FJ (1994) NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate System, version 1.80 Exeter software Setauket New York
- Romero Castañeda R (1991) Frutos silvestres de Colombia
- Safford, W E (1914) Classification of the genus *Annona* with descriptions of new and imperfectly known species – Contr U S Natl Herb 18 (1) 1 68
- Samuel R Pinsky, W Balasubramaniam, S, Morawetz W (1991) Allozyme diversity and systematics in *Annonaceae* – A pilot project Pl Syst Evol 178 125 134
- Sneath PHA Sokal RR (1973) Numerical Taxonomy Freeman San Francisco California
- Sytsma K Givnish T J Smith J F, Hahn W J (1993) Collection and Storage of land plant samples for macromolecular comparisons Methods in enzymology, vol 224 23 38
- Toxopeus (1987) Cacao *Theobroma cacao* L. In Genotecnia de cultivos tropicales perennes Ferwerda F P y Wit F (Editores) A G T Editor Mexico pp 53 83
- Van Eck H J Van der Voort J Draaistra J Van Zandvoort P, Van Enckervort E, Segers B, Peleman J Jacobsen E Helder J Bakker J (1995) The inheritance and chromosomal location of AFLP markers in a non inbred potato offspring Molecular Breeding 1 397 410
- Vásquez R Coimbra G (1996) Annonaceae In Frutas silvestres comestibles de Santa Cruz p 40 49
- Vos P R Hogers et al (1995) AFLP a new technique for DNA fingerprinting Nucleic Acids Res 23(21) 4407 14
- Zarate, R D 2000 Las enfermedades de la guanabana *Annona muricata* L, en Colombia Diagnostico y control En Memorias Curso Nacional de Frutas Tropicales Universidad Nacional de Colombia sede Palmira pp 317 339

## **7 INFORME FINANCIERO**

Ver archivo anexo

## 8 ANEXOS

### Anexo 1 Metodos Utilizados para la Medicion de los Grados brix y la Acidez (Gallo Perez, 1997)

#### Grados Brix

- 1 Tomar 1 fruta madura pelarla y separar las motas
- 2 Extraer las semillas de las motas y exprimir las sobre un colador
- 3 Medir la temperatura del jugo (temperatura ambiental)
- 4 Colocar de 3-4 gotas del jugo de guanabana sobre el prisma del refractometro
- 5 Ubicar el aparato frente a una fuente de luz
- 6 Realizar la lectura sobre la escala del ocular en el punto de interseccion de las Zonas clara y oscura
- 7 Despues de cada medida el prisma se debe limpiar con algodón y agua destilada
- 8 Ajustar la temperatura utilizando la tabla de correccion para determinar el valor real de los grados Brix del jugo

#### Acidez

- 1 Llenar la bureta con soda (NaOH 0.1 N) hasta llegar a cero
- 2 Tomar 25 ml de jugo y adicionarle y 6 gotas de fenolftaleina
- 3 Colocar el jugo en un erlenmeyer de 50 ml
- 4 Colocar el erlenmeyer debajo de la bureta
- 5 Verter la solución de soda gota a gota hasta observar el cambio Rosado contabilizar el volumen de soda gastado en la titulación
- 6 Calcular el contenido de acidez expresado en % de acidos predominante en el producto mediante la siguiente ecuacion

$$\text{Acidez (\%)} = \frac{V \cdot N \cdot E}{W} \cdot 100 \%$$

V ml de NaOH

N Normalidad de NaOH

E Peso equivalente del acido

W Peso muestra en mg o ml

**Anexo 2 Evaluacion de las Propiedades Organolepticas de los Frutos de Accesiones de Guanabana (*Annona muricata*) Corpoica C1 Palmira Agosto 2002**

Accesión	Arbol	Rep	Peso / Fruto (g)	Longitud Fruto (cm)	Diámetro Basal Fruto (cm)	Diámetro Medio Fruto (cm)	Diámetro Apical Fruto (cm)	Peso Corteza (g)	Peso Pulpa (g)	Sabor y Aroma	Longitud Columnella (cm)	Diámetro Columnella (cm)	Peso Columnella (g)	Numero Semillas	Peso Semillas (g)	Sólido Solubles	Acidez
1918	3	1	3000.0	26.0	11.8	16.8	14.2	288.9	2026.9	4.5	17.5	4.5	88.2	167.0	96.4	13.2	0.8
1918	9	2	3626.6	26.2	17.8	17.1	9.4	341.1	2833.7	4.0	21.5	4.8	99.5	380.0	150.2	13.8	1.1
1919	2	1	877.8	12.0	11.0	12.3	7.0	132.6	653.5	3.5	2.3	6.0	8.0	47.0	34.4	10.8	1.4
1919	7	2	1390.2	13.0	13.5	13.0	7.5	157.0	1055.9	3.5	3.5	13.0	15.3	193.0	106.0	10.6	1.4
1921	4	1	3099.0	23.5	17.2	15.0	10.4	319.5	2490.0	4.5	19.5	4.3	91.8	289.0	113.4	14.6	0.9
1921	6	2	4655.4	28.5	19.1	19.3	11.5	345.4	3895.4	5.0	20.5	4.5	76.7	263.0	130.9	15.3	0.7
1921	9	3	5300.0	29.3	19.6	19.5	11.3	650.0	4275.0	5.0	20.3	4.8	125.0	275.5	185.0	16.4	1.0
1943	1	1	2846.7	26.0	14.7	14.7	8.4	255.0	2252.6	4.0	24.3	4.3	92.5	413.3	136.6	13.3	1.1
1943	3	2	2875.0	24.0	14.8	15.0	9.8	312.5	2237.5	3.9	21.9	4.0	87.5	252.8	125.0	12.1	1.0
1943	10	3	4550.0	32.5	18.3	18.2	7.3	350.0	3650.0	3.5	27.5	6.5	250.0	485.0	250.0	9.0	1.1
1946	8	1	4050.0	31.5	14.6	15.3	9.2	450.0	2550.0	4.0	25.5	4.5	130.0	272.0	120.0	13.1	1.2
1957	3	1	2400.0	21.0	18.2	19.1	8.0	330.0	1850.0	5.0	16.5	4.0	62.0	85.0	54.0	13.3	0.6
1983	1	1	3350.0	23.5	15.6	16.3	8.1	324.9	2338.4	4.5	9.8	1.6	31.0	201.0	111.6	13.4	1.1
1983	2	2	1800.0	21.0	15.8	13.3	8.7	300.0	1250.0	4.5	15.0	3.0	100.0	78.0	50.0	12.5	0.8
1983	3	3	1114.8	13.0	13.7	13.5	9.3	160.5	826.0	5.0	12.0	3.0	16.4	55.0	30.8	16.8	0.9
1994	1	1	3818.0	25.6	15.9	16.7	9.2	395.9	2974.1	4.3	20.5	4.4	124.4	157.4	107.8	12.7	1.1
1994	3	2	4102.4	25.0	17.1	17.1	10.5	372.3	3373.1	4.3	20.8	5.2	203.7	208.0	123.3	11.7	0.9
1994	5	3	2800.0	23.0	15.9	16.7	7.4	285.0	2300.0	4.3	16.0	4.8	90.0	159.5	85.0	13.3	1.1
1995	1	1	4278.7	28.5	18.1	17.2	9.7	348.5	3402.8	4.8	21.9	4.5	100.5	238.5	178.2	15.2	0.9
1995	2	2	4904.9	32.2	18.2	18.2	9.5	454.9	4030.5	4.3	26.7	5.3	125.5	317.3	223.1	13.1	0.9
1995	4	3	3575.0	25.8	16.6	16.5	7.9	600.0	2200.0	4.8	21.0	3.3	75.0	200.5	125.0	16.2	1.1
2014	1	1	1433.3	20.7	12.2	12.1	7.1	199.6	1098.8	4.5	16.1	3.2	36.5	79.0	47.8	15.1	1.0
2014	2	2	2901.4	26.7	15.0	15.4	8.9	271.6	2262.8	4.9	22.0	4.1	100.5	259.4	156.2	16.4	1.3
2015	1	1	1107.6	16.1	10.2	10.4	7.0	159.3	818.3	4.8	12.8	3.4	43.1	93.8	46.7	16.1	0.9
2015	2	2	1476.7	19.0	11.1	12.8	7.1	126.1	1078.3	4.7	14.7	4.1	65.6	155.0	79.2	15.9	1.1
2016	1	1	2788.5	17.4	15.4	15.9	9.6	361.2	1949.8	4.3	19.0	9.3	86.6	241.3	126.1	13.6	1.1

Accesión	Árbol	Rep	Peso / Fruto (g)	Longitud Fruto (cm)	Diámetro Basal Fruto (cm)	Diámetro Medio Fruto (cm)	Diámetro Apical Fruto (cm)	Peso Corteza (g)	Peso Pulpa (g)	Sabor y Aroma	Longitud Columnella (cm)	Diámetro Columnella (cm)	Peso Columnella (g)	Numero Semillas	Peso Semillas (g)	Sólido Solubles	Acidez
2016	3	2	2606.2	23.0	15.0	13.2	8.7	248.2	2111.7	4.8	19.4	4.3	83.7	211.0	114.1	12.9	1.1
2016	4	3	3800.0	27.0	18.8	19.0	10.7	400.0	3025.0	5.0	25.5	5.0	120.8	225.0	140.6	14.2	0.8
2017	1	1	5096.9	30.8	17.8	18.0	10.4	469.5	4246.8	4.5	24.5	5.0	114.7	265.0	184.1	12.5	0.9
2017	2	2	3050.0	24.0	16.0	16.5	7.0	350.0	2200.0	4.0	18.0	4.5	70.0	313.0	200.0	12.7	1.2
2017	5	3	4001.0	30.3	17.4	16.9	8.8	412.4	3124.6	4.3	23.5	4.3	126.2	333.0	212.6	12.8	1.0
2020	2	1	5222.5	28.8	19.3	18.9	10.4	449.6	4408.3	4.8	21.8	5.0	133.8	340.5	166.4	14.5	1.1
2020	5	2	6100.0	30.5	19.7	19.6	9.8	450.0	4600.0	4.8	25.8	4.5	140.0	248.5	240.0	15.2	1.0
2033	1	1	3390.0	24.9	16.7	16.8	10.9	468.8	2182.7	4.5	16.3	4.5	75.4	186.0	95.4	13.9	1.0
2033	4	2	6300.0	31.5	20.8	20.0	12.5	650.0	5200.0	5.0	26.0	5.0	200.0	252.0	200.0	16.4	1.1
2036	1	1	750.0	13.0	12.3	12.8	7.5	200.0	500.0	5.0	6.0	3.0	30.0	12.0	10.0	17.6	1.1
2037	1	1	4250.0	32.0	19.3	17.0	9.8	450.0	3355.0	4.0	25.5	5.5	170.0	295.0	157.9	12.0	0.9
2037	4	2	5439.1	33.4	18.7	18.2	8.7	488.3	4204.3	4.8	25.5	6.0	190.5	203.0	137.0	13.8	1.0
2039	2	1	2607.0	23.5	17.0	15.0	10.0	333.9	1972.5	4.0	17.0	4.0	65.7	187.0	117.3	10.8	1.1
2039	3	2	5194.8	30.0	20.9	18.8	8.5	637.4	4084.4	5.0	22.0	5.5	180.0	218.0	147.0	18.4	0.9
2040	1	1	4465.3	31.6	17.3	17.4	9.2	503.6	3552.1	4.0	25.2	4.9	147.6	293.8	187.0	13.1	0.9
2040	2	2	5180.0	34.0	18.5	20.5	10.0	737.3	3177.9	5.0	28.0	6.0	235.0	231.0	158.3	19.6	1.3
2040	3	3	4001.3	29.5	17.3	17.0	10.1	363.8	3239.2	5.0	19.5	4.5	81.9	175.0	121.6	19.2	1.1
2042	2	1	6194.0	28.7	19.8	19.9	10.2	727.0	4680.7	4.8	24.5	5.3	187.8	244.0	208.9	17.1	0.8
2042	4	2	4805.3	30.0	19.0	17.8	12.1	617.5	3561.4	5.0	22.0	5.5	127.8	255.0	187.2	15.4	0.9
2045	1	1	2900.0	22.0	15.0	15.2	7.0	400.0	2000.0	4.5	18.0	4.0	100.0	198.0	120.0	12.3	1.1
2045	4	2	3841.1	26.7	18.1	17.8	10.3	376.5	3116.7	4.3	20.2	4.3	118.2	260.3	137.9	12.2	1.2
2511	1	1	3294.0	26.0	17.0	15.7	10.0	377.5	2662.6	4.0	21.0	4.0	76.1	128.0	100.7	13.3	1.1
2511	3	2	3136.3	23.7	14.6	14.4	8.1	336.7	2168.0	4.3	21.7	3.8	69.3	230.0	141.9	14.0	1.2
2512	7	1	5500.0	28.0	22.1	21.2	13.0	430.6	4640.8	4.5	22.0	5.5	143.9	259.0	194.4	13.5	1.0
2512	9	2	2270.0	21.0	15.6	15.1	11.4	257.6	1530.4	4.3	15.0	3.5	69.2	191.5	109.0	12.4	1.1
2512	10	3	4000.0	22.0	18.5	18.8	11.2	450.0	3050.0	5.0	15.0	4.5	120.0	268.0	200.0	14.6	1.0
2513	1	1	5014.1	29.9	17.7	17.8	10.4	476.0	4135.0	4.6	24.1	4.6	143.3	231.5	172.9	15.0	1.2
2513	4	2	6182.4	33.3	19.8	17.9	10.7	544.9	5018.3	4.5	24.4	5.4	150.6	437.0	235.4	14.7	1.0
2514	10	1	4150.0	27.0	18.8	16.8	11.3	450.0	2900.0	5.0	19.0	4.5	100.0	222.0	150.0	14.6	1.1
2514	11	2	4300.0	29.5	19.8	17.8	8.0	632.7	3284.8	5.0	24.5	5.5	118.6	216.0	150.4	15.6	1.1

Accesión	Árbol	Rep	Peso / Fruto (g)	Longitud Fruto (cm)	Diámetro Basal Fruto (cm)	Diámetro Medio Fruto (cm)	Diámetro Apical Fruto (cm)	Peso Corteza (g)	Peso Pulpa (g)	Sabor y Aroma	Longitud Columnella (cm)	Diámetro Columnella (cm)	Peso Columnella (g)	Numero Semillas	Peso Semillas (g)	Sólido Solubles	Acidez
2514	12	3	1256.3	20.0	14.0	14.3	11.3	281.8	906.2	5.0	12.0	3.5	30.3	22.0	13.9	16.2	1.0
Accesión 1	1	1	3738.2	28.1	18.0	16.4	9.8	481.4	3004.0	4.8	20.8	4.3	93.9	150.8	92.8	15.2	1.1
Accesión 1	2	2	5226.1	30.5	19.6	17.6	11.7	456.6	4329.8	5.0	22.8	4.4	106.3	228.5	164.7	16.5	1.3
Accesión 4	1	1	4100.0	33.5	16.7	16.2	8.3	600.0	3200.0	5.0	27.0	5.0	200.0	214.0	150.0	14.9	1.0
Accesión 4	2	2	2800.0	25.5	14.2	13.9	7.4	450.0	1085.5	4.8	20.7	3.8	65.0	200.7	146.7	16.2	1.2
Accesión 6	1	1	1795.0	24.0	13.3	14.8	5.9	452.8	1004.3	4.5	13.0	3.4	35.5	33.0	21.7	15.7	1.0
Accesión 6	2	2	2800.0	26.5	14.2	16.8	8.0	320.0	2250.0	4.5	25.5	3.5	85.2	105.0	56.4	14.3	0.8
Accesión 6	3	3	5076.2	32.5	20.0	18.7	8.0	568.0	3997.4	4.0	26.0	5.0	141.8	442.0	243.9	12.3	1.0
H 1	3	1	4225.0	26.5	20.2	19.3	11.8	420.5	2404.0	4.0	19.2	4.5	79.2	270.0	141.6	12.8	0.9
H 1	4	2	2995.3	25.5	15.0	15.3	9.3	451.6	2023.7	4.5	22.0	3.8	54.4	238.0	153.2	13.5	0.8
H 2	1	1	3762.5	25.0	17.0	17.3	9.4	400.0	2975.0	4.9	20.4	5.0	165.0	216.0	125.0	14.9	1.0

## **Anexo 3 Protocolos para el Analisis con Marcadores Moleculares**

### **Metodo De Extraccion de ADN de Especies de Anonaceas en Tubos Eppendorf (1.5ml)**

(Dellaporta *et al* , 1983, McCouch *et al* , 1988)

- 1 Colectar 3-5 g de tejido foliar joven y rapidamente guardarlo en nitrógeno liquido (o en hielo o en silica gel), envuelto en papel aluminio (o en bolsas de plástico con cierre hermetico) marcado con la accesion
- 2 Macerar el tejido con nitrógeno liquido hasta obtener un polvo fino y seco y servirlo en tubos eppendorf hasta el nivel de los 0.5 ml
- 3 A cada macerado agregarle 1 ml de buffer de extraccion Dellaporta modificado, precalentado a 65 °C
- 4 Mezclar bien agitando el tubo vigorosamente
- 5 Incubar a 65 °C en baño maria durante 60 min , agitando los tubos cada 5 min
- 6 Agregar 0.4 ml de acetato de potasio 5 M (pH 7.5) y mezclar vigorosamente
- 7 Incubar en baño de hielo durante 30 min con agitacion
- 8 Centrifugar a 4000 rpm (Centrifuga Eppendorf) durante 10 min
- 9 Repetir los pasos 6 al 8 dos veces
- 10 Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo y centrifugar a 6000 rpm por 4 min
- 11 Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo y añadir un volumen de cloroformo alcohol isoamilico (24 : 1) y mezclar suavemente
- 12 Centrifugar a 12000 rpm durante 10 min y transferir la fase acuosa a un nuevo tubo
- 13 Repetir los pasos 11 y 12
- 14 Adicionar 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 1 volumen de isopropanol a -20 °C Incubar a -20 °C durante 90 min (o durante toda la noche)
- 15 Centrifugar a 12000 rpm durante 5 min a 4 °C Descartar el sobrenadante
- 16 Lavar el pellet con 400 µl de etanol al 70 % a -20 °C Centrifugar a 12000 rpm por 10 min a 4 °C Descartar el sobrenadante y secar bien el pellet a temperatura ambiente
- 17 Resuspender en 100 µl de tampon TE (10 mM Tris HCl pH8, 0.1 mM EDTA)
- 18 Añadir ARNasa a una concentracion final de 20 mg / l (1 µl de ARNasa 10 mg / ml) Incubar a 37 °C durante 30 min Guardar a 4 °C
- 19 Observar el ADN en un gel de agarosa al 0.8 % Medir la concentracion de la muestra de ADN en fluorómetro
- 20 Almacenar la solucion de ADN a -20 °C

## Buffer de extracción Dellaporta *et al* (1983) modificado

Reactivo (sin Stock)	Concentracion final	Vol = 500 ml	Vol = 200 ml	Vol = 100 ml
Tris HCl 1 M pH 8	100 mM	50 ml	20 ml	10 ml
EDTA 1 M pH 8	50 mM	20 ml	20 ml	10 ml
NaCl 5 M	500 mM	50 ml	20 ml	10 ml
H <sub>2</sub> O		319 ml	127.6 ml	63.75
SDS 20 %	1.25 % (v/v)	31 ml	12.4 ml	6.25 ml
Bisulfito de sodio	0.38 g / 100 ml	1.9 g	0.76 g	0.38 g
Polivinilpirrolidone PVP	1 % (w/v)	5 g	2 g	1 g

Las soluciones stock se usan autoclavadas. El bisulfito de sodio y el PVP se agregan al buffer justo antes de utilizarlo.

## Digestion del ADN total con EcoR I y Mse I

Reactivo	Concentración final	Volumen	Muestras x 7
DNA (25 ng/μl)	125 ng	5 μl	
Buffer de reacción 5X	1X	2.5 μl	17.5 μl
EcoR I/Mse I	1.25 unds	1 μl	7 μl
Agua destilada		4 μl	28 μl
Total		12.5 μl	

## Obtencion de Marcadores AFLP de Anonaceas

Metodologia de Vos et al 1995 (Protocolo del Kit AFLP Analysis System I InVitrogen)

- 1 Obtener ADN limpio de óptima calidad
- 2 Preparar una dilucion de ADN en buffer TE a una concentración final de 25 ng/ $\mu$ l
- 3 Digerir 125 ng de ADN con una mezcla de las enzimas EcoR I/Mse I en un volumen final de 12.5  $\mu$ l, siguiendo la reacción de digestion descrita arriba. Mezclar suavemente, concentrar la reaccion con una breve centrifugacion e incubarla a 37 °C durante 2 horas (**RESTRICCION DEL ADN TOTAL**)
- 4 Incubar la reacción a 70 °C durante 15 min para inactivar las enzimas de restricción, transferirla a hielo y concentrarla con una breve centrifugacion
- 5 Adicionar 12  $\mu$ l de solución de ligacion de adaptadores y 0.5  $\mu$ l de T4 ADN ligasa. Mezclar suavemente, concentrar la reaccion e incubarla a 20 °C durante 2 horas (**LIGACION DE ADAPTADORES**)
- 6 Hacer una dilución de la reaccion 1/10 con TE (dil 1) en un volumen final de 100  $\mu$ l. Guardar el resto de la reacción (no diluida) a 20 °C
- 7 Agregar a 2.5  $\mu$ l de dil 1 en un tubo para PCR de 0.5  $\mu$ l una mezcla de 20  $\mu$ l de pre amp primer mix, 2.5  $\mu$ l de buffer para PCR 10X + Mg y 0.15  $\mu$ l de Taq ADN polimerasa. Agitar suavemente y correr 20 ciclos de PCR a 94 °C por 30 s, 56 °C por 60 s y 72 °C por 60 s (**PREAMPLIFICACION** programa NELSON1 termociclador 4)
- 8 Hacer una dilución 1/50 con TE de la amplificación en un volumen final de 150  $\mu$ l (dil 2). Guardar la amplificacion y la dil 2 a -20 °C
- 9 Preparar un Mix 1 para cada par de primers selectivos mezclando 0.5  $\mu$ l de primer EcoRI/ y 4.5  $\mu$ l de primer MseI/ + dNTPs
- 10 Preparar un Mix 2 (para todas las reacciones a realizar) mezclando por muestra 7.9  $\mu$ l de agua bidestilada, 2  $\mu$ l de 'buffer' para PCR 10X + Mg y 0.1  $\mu$ l de Taq ADN polimerasa
- 11 Mezclar suavemente por cada muestra en una placa de 96 pozos para PCR: 5  $\mu$ l de dil 2, 5  $\mu$ l de Mix 1 y 10  $\mu$ l de Mix 2. Amplificar con un programa de PCR compuesto de un ciclo a 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s y 72 °C por 60 s, 13 ciclos similares bajando en cada uno 0.7 °C en el annealing y 23 ciclos a 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s y 72 °C por 60 s (**AMPLIFICACION SELECTIVA** programa AFLP +3 termociclador 4)
- 12 Visualizar el patrón de marcadores AFLP de la muestra en un gel desnaturante de poliacrilamida al 6% + urea 6M aplicando tincion con nitrato de plata. Servir en el gel 4  $\mu$ l de muestra (la muestra es 20  $\mu$ l amplificacion selectiva + 8  $\mu$ l de colorante de formamida)

## Preparacion y Corrida de Geles de Poliacrilamida

- 1 Preparar la poliacrilamida (acrilamida / bis acrilamida - 19 / 1) al 6 % + urea 6 M en cámara extractora utilizando mascarilla. Filtrar la solución al vacío con filtro de 0.8 µm (todo hacerlo con guantes). Guardarla a 4 °C en la oscuridad.
- 2 Limpiar la cámara de electroforesis y el vidrio soporte, cada uno por aparte, mediante dos lavados con solución de detergente y dos lavados con etanol al 96 % (en mesas diferentes con guantes diferentes).
- 3 Aplicar homogéneamente al vidrio 1000 µl de 'bind xylene' (1000 µl de etanol al 96% + ácido acético + 3 µl de 'bind xylene') con papel Kimwipes. Quitar el excedente rozando rápidamente un kimwipes humedecido con etanol al 96%.
- 4 Aplicar homogéneamente a la cámara 350 µl de Repel con papel Kimwipes.
- 5 Unir las superficies limpias de cámara y vidrio dejando entre ellos solo el espacio determinado por los separadores de la cámara.
- 6 Sellar la unión en los bordes externos con cinta adhesiva sin dejar burbujas de aire.
- 7 Colocar los brazos de la cámara a lo largo del gel aplicando presión.
- 8 Llenar el espacio con una mezcla de 120 ml de solución de poliacrilamida 6% + urea 6M, 600 µl de persulfato de amonio (APS) y 120 µl de Temed.
- 9 Introducir el peine al revés en la parte superior del espacio de manera que el lomo del peine forme el frente de corrida del gel (completamente horizontal). Hacer presión en esta parte superior con pinzas.
- 10 Dejar solidificar el gel (por lo menos una hora). Si se deja de un día para otro cubrir el gel en el extremo superior con una toalla de papel húmeda y vinilpel sin que toque la poliacrilamida no solidificada.
- 11 Montar el armazón de la cámara de electroforesis con el gel solidificado para la corrida, después de eliminar la cinta del extremo inferior (extremo que estará en contacto con el buffer de corrida).
- 12 Llenar la cubeta inferior con buffer TBE 0.5X (buffer de corrida) precalentado a 60 °C hasta entrar en contacto con el gel. Llenar toda la cámara con el mismo buffer hasta que el gel quede cubierto.
- 13 Retirar el peine y colocarlo nuevamente con los dientes sobre el gel con un poco de presión para formar los pozos.
- 14 Conectar la cámara a la fuente de poder y hacer correr la energía a 130 W hasta que el gel alcance una temperatura de 50 °C (**PRECORRIDA**).
- 15 Eliminar restos de urea de los pozos inyectando 'buffer' en la parte superior del gel con presión. Evaluar si los pozos quedaron bien formados sirviendo 4 µl de buffer carga de formamida en ellos.
- 16 Desnaturalizar las muestras amplificadas (20 µl) + 'buffer' de formamida (8 µl) calentándolas a 94 °C durante 3 min (programa "Denature" en termociclador) e inmediatamente incubándolas en hielo con agua.
- 17 Servir 4 µl por muestra desnaturalizada en cada pozo con pipeta de 10 µl. Introducir las muestras al gel corriendolas a 130 W.
- 18 Retirar el peine y continuar la corrida a 110 W corrida a 50 °C hasta que el colorante xylene cianole del buffer de corrida recorra las 3/4 partes del gel (**CORRIDA**).
- 19 Cuidar de que el nivel del buffer no descienda durante la precorrida y corrida.
- 20 Desconectar la fuente, desmontar la cámara, reciclar el buffer de corrida (TBE 0.5X), eliminar las cintas adhesivas y levantar con mucho cuidado la cámara del gel.
- 21 Teñir el gel adherido al vidrio con nitrato de plata.

## Tincion de Geles con Nitrato de Plata

- 1 Correr los patrones de AFLP de las diferentes muestras en un gel de poliacrilamida (acrilamida / bis acrilamida 19 / 1) al 6 % + urea 6 M
- 2 Una vez corrida la electroforesis, fijar el gel al vidrio de soporte mediante un lavado con acido acetico al 10 % durante 20 min (FIJACION)
- 3 Lavar el gel con agua deionizada para eliminar completamente la solucion fijadora cuatro lavados de 2 min cada uno
- 4 Teñir el gel con una solucion de Nitrato de Plata (1 g/L) durante 30 min , en la oscuridad (TINCION)
- 5 Eliminar la solucion de tincion con un lavado de agua deionizada de 10 s – paso critico
- 6 Revelar los patrones de AFLP de las muestras con un lavado de 2 – 5 min de revelador (solucion de carbonato de sodio 105 g + 3 7 ml de formaldehido + 650 µl de tiosulfato de sodio para 3 5 L de agua) en la mayor oscuridad posible (REVELADO)
- 7 Detener la reaccion de revelado lavando el gel durante 5 min con una solucion de acido acetico al 10 % (PARADA)
- 8 Eliminar la solucion de parada con un lavado de agua deionizada
- 9 Dejar secar bien el gel teñido antes de leer los patrones de AFLP de las diferentes muestras

**Anexo 4** Inventario de muestras de las especies de anonáceas pertenecientes a los generos *Annona*, *Rollinia* y *Raimondia* depositadas en el Herbario Nacional Colombiano (COL)

ESPECIE	COLECTOR	SITIO DE COLECTA	GPS
<i>Annona acuminata</i> Saff	Silvio Zuluaga determinado Paul Maas 97	Alto del I imon Paque natural Los Katios Choco	
<i>Annona acuminata</i> Saff	Jorge Brand et al	Carretera el Tigre B/quillita, Chigorodo	
<i>Annona acuminata</i> Saff	A Gentry et al	Rio Tigre base serranía del Darien Choco	
<i>Annona aff amazonica</i> R E Fries	L D Gómez et al determinado Schatz 92	Quebrada Sandiguera estación Corralito Parqu Nat Braulio Carrillo Costa Rica?	
<i>Annona aff amazonica</i> R L Fries	Gerardo Herrera determinado Schatz 92	Puntorenis canton de osa Aguabuena cuenca media de quebrada El Campo Rincon Costa Rica	
<i>A. ambotay</i> Aubl	Jose Schunke	Rio Sion sud oeste del caserio de Sion Departamento Campanilla, Peru	
<i>A. ambotay</i> Aubl	H Garcia Barriga determinado Paul Maas 88	Cachinera de Yurupari rio Vaupes Vaupes	
<i>A. ambotay</i> Aubl	Jose Schunke determinado D R S 71	Camono al caserio de Santa Rosa de Mishallo 4 km Puerto Pizona	
<i>A. ambotay</i> Aubl	A Rudas et al determinado D Johnson 93	Municipio de Leticia corregimiento Irapaca, Paque Natural Amacayaca, Cabana Lorena	
<i>A. ambotay</i> Aubl	J Schunke determinado D Simpson 74	Arriba de Puerto Inca oeste rio Pachitea Dpto Huáncico Peru	
<i>A. ambotay</i> Aubl	J M Pirce et al determinado S Non Reodin 79	Territorio Amapa rio Araguari Basil	
<i>A. ambotay</i> Aubl	J Schunke determinado D R Simpson 71	Rio Sion sud oeste del caserio de Sion San Martin	
<i>A. ambotay</i> Aubl	R L Fróes	Rio Guapaná regiao de planalto de Santorem Estado de Para, Brazil	
<i>A. cherimola</i> Miller	J L Fernandez et al determinado J Murillo 01	Dpto C/morca poblado Nariño Colombia	
<i>A. cherimola</i> Miller	W Devir et al determinado O Rangel 80	C/morca mpip Arbelaez Vereda Sta Barbara sector Saragoza Hda Paramullo	
<i>A. cherimola</i> Miller	Santiago Diaz determinado Santiago Diaz 82	C/morca Municipio San Bernardo rio Uchua	
<i>A. cherimola</i> Miller	J M Duque determinado Dugond	Valle Pichinde	
<i>A. cherimola</i> Miller		Prov de Occia	
<i>A. cherimola</i> Miller	J M Duque determinado J Murillo 01	C/morca Apulo (460m)	
<i>A. cherimola</i> Miller	J M Duque	Valle rio Cali Pichinde (1090m)	
<i>A. cherimola</i> Miller	J M Duque	Caldas Chinchina	
<i>A. cherimola</i> Miller	F P A determinado J Murillo 01	Guataqui C/marca	
<i>A. cherimola</i> Miller	L P Arbelaez determinado F P A	Tocaima	
<i>A. cordifolia</i> Poepp (Szyzyl) R E Fr	J Schumker determinado D R Simpson 71	Camino a Shahuinto a 4 km del campamento Miel de Abeja	
<i>A. cordifolia</i> Poepp (Szyzyl)	Paul Maas et al	Depto San Martin Prov Lamas via Tarapoto	

ESPECIE	COLECTOR	SITIO DE COLECTA	GPS
R E Fr	determinado I Van Heusden	Yurimaguas	
<i>A dolichophylla</i>	L Varon et determinado J Murillo 01	Caqueta Solano Araraucora via el Yari por la chagra de Don Oscar Roman	7 34 N 76 39 W
<i>A duckei</i> Diels	Julio Betancur et al determinado H Rainer 00	Putumayo Mocoa corregimiento de San Antonio camino entre el acto Campuciná y a finca la Mariposa Vertiente amazonica	
<i>A dumetorum</i> R L Fries	Paul Maas y M Mejia	Arroyo de Guachopito N Porte de San Jose de Ocoe Republica Dominicana	
<i>A excellens</i> R L Fries	J Schumker determinado D R Simpson 71	Depto de Loreto Prov Maynas Trocha a Sta Rosa a 3 km de Sta Maria de Nanay dto Alto Nanay	8 42 35 N 83 31 50 W
<i>A glabiflora</i> Schlecht	R Hernandez et al determinado R Hernandez	Loe Matzacintla, 29 km al Noreste Jalpan mpio de Itonde de Matamoros Mexico	
<i>A glabra</i> Linn	A Dugond	depto Atlantico zona manglarcs entre las flores y la playa	
<i>A glabra</i> Linn	R Romero Castaneda determinado A Beatriz Ruiz 75	Cauca phya candelaria	
<i>A glabra</i> Linn	H R Fuchs et al determinado Jorge H Torres	Choco Región del rio Bandó	3 02 S 70 00 W
<i>A glabra</i> Linn	A Sugden	Arroyo Kijoruhu serrania de Macuira Guajira	
<i>A hypoglauca</i> Martius	J M Idrobo determinado Paul Maas 97	Caquetá entre el rio Peneyay la Tregua	
<i>A hypoglauca</i> Martius	J Cuatrecasas determinado I P Killip	Comision de Putumayo margenes afluente izquierda La concepción	
<i>A hypoglauca</i> Martius	D Cohelo et al determinado Paul Maas 97	Amazonas mpio Manaus grupo de palhal Igapo	
<i>A hypoglauca</i> Martius	E Little et al determinado A Beatriz de Ruiz 75	Solano 8 km S F de Tres Esquinas rio Caquetá Comisaria de Caquetá	
<i>A hypoglauca</i> Martius	Donald Simpson et al determinado Paul Maas 86	Peru depto de Loreta prov Maynas alto Alto Nanay	
<i>A jahnu</i> safford	L Cabrera determinado Paul Maas 90	Meta alrededores de la laguna y palmares afluentes del Rio Muco	
<i>A jahnu</i> safford	Francisco Ortiz determinado O Rangel 84	Casanare Mochuelo y Tsamani	
<i>A jahnu</i> safford	J Fernandez Alonso determinado H Rainer 98	Casanare municipio Borrani de Upiá carretera a Villamera	
<i>A jahnu</i> safford	J Blydentem determinado J Blydentem	Boyacá sur de Yopal	
<i>A macrocalyx</i> R L Fries	Paul Maas et al det E Van Heusden 85	Peru prov Coronel Portillo canal de Panaillo	
<i>A macrocalyx</i> R L Fries	J Schunke determinado D R Simpson 71	Peru Neshuya departamento de Ircoto	
<i>A montana</i> Mac Gadyen	J Schunke	Peru depto San Martín prov Mariscal Caceres dto Tocachuc Nuevo	
<i>A montana</i> Mac Gadyen	B Hoffman et al determinado H Rainer 93	buvana región Potaxo Siparum 4 10 N 59 03 W	
<i>A montana</i> Mac Gadyen	D Simpson et al determinado D R Simpson 71	Peru depto Iumber prov Zarumilla, alto Matapalo	76 38 N 1 12 W
<i>A montana</i> Mac Gadyen	D Sucre det A Lúne Peixoto and V Peruzzo	Brazil I tdo Rio de Janeiro reduto de I ormaçao secundaria do morro Macedo Sobrinho	

ESPECIE	COLECTOR	SITIO DE COLECTA	GPS
<i>A. montana</i> Mac Fadyen	H Leon	Choco municipio de Rio Suelo Parque los Katyos	
<i>A. montana</i> Mac Fadyen	Paul Maas et al det F Van Heusden	Peru mpio Paucartambo cerca de Pilcopeta	
<i>A. muricata</i> Linn	R Jaramillo et al determinado A Fernandez	Meta alrededores de Villavicencio en Peralariso	
<i>A. muricata</i> Linn	H Garcia Barriga determinado E P Killip	Cundinamarca La Vega Camino a Nocaima	
<i>A. muricata</i> Linn	L Perez Arbelaz et al determinado E P Killip	entre Girardot y Melgar Cundinamarca, Ll Paso margen del rio Sumapaz	
<i>A. muricata</i> Linn	determinado S Sanchez	Galindez	
<i>A. muricata</i> Linn	D D Soejorto determinado D D Soejorto 72	Antioquia mpio Anori corregimiento Providencia	
<i>A. muricata</i> Linn	A S Barclay et al	Santander en la via entre Los Curos y San Gil	
<i>A. muricata</i> Linn	C Sastre et al	Amazonas Lago el Radio 2 km al N de Leticia	
<i>A. muricata</i> Linn	J M Idrobo et al determinado J M Idrobo	Cauca El Tambo hoya del Patia correg Mosquera	
<i>A. muricata</i> Linn	Carlos Saravia et al determinado J Hernandez	Santander carretera Piedecuesta Pescadero	
<i>A. muricata</i> Linn	H V Pin Klev determinado J Nalke	Ecuador Dureno en rio Aguarico Nepo	
<i>A. muricata</i> Linn	M de Romero determinado R Romero Castañeda	Cienaga Magdalena	
<i>A. muricata</i> Linn	C Sastre et al determinado D Sanchez	Boyacá	
<i>A. muricata</i> Linn	C La Rotta determinado C La Rotta	Chocó Alto rio Baudó R I Emberá ( Planta introducida)	
<i>A. muricata</i> Linn	A Escobar	Hacienda La Isla, Suisama Cundinamarca	
<i>A. muricata</i> Linn	Carlos Saravia	Valle entre Dagua y Loboguerrero	
<i>A. muricata</i> Linn	L Gienboski	Amazonas Puerto Narino Rio Loreto Yacu	
<i>A. muricata</i> Linn	J Cuatrecasas determinado E P Killip	Boyacá entre Guateque y Guayatá rio Sunuba	
<i>A. muricata</i> Linn	H Mason determinado R Jaramillo	Huila Norte de Villavieja	
<i>A. muricata</i> Linn	H Garcia Barriga determinado D Sanchez	Valle entre Cerrito y Palmira	
<i>A. muricata</i> Linn	Puello Amaury et al determinado J Murillo 97	Cordoba San Bernardo del Viento Finca el Molino	
<i>A. muricata</i> Linn	Giraldo v Pinto	Putumayo Puerto Asis resguardo Buenavista	0 25 N 76 18 0
<i>A. muricata</i> Linn	G Lozano et al determinado D Sanchez 83	Magdalena Sta Marta Parque Tavróna Cerro El Cielo	
<i>A. muricata</i> Linn	Puello Amaury et al determinado J Murillo 97	Cordoba Tierra alta l a apartada de Valencia	
<i>A. muricata</i> Linn	Puello Amaury et al	Cordoba Cerete	
<i>A. nutans</i> R F Fries	E Zardini et al det R Spichiger 92	Paraguay Tabati y bytu Silla	
<i>A. paludosa</i> Aubl	J Pires	Brazil estado de Pará	

ESPECIE	COLECTOR	SITIO DE COLECTA	GPS
<i>A. punctifolia</i> Gr y Pl	M Ramirez determinado G I ozano 84	Bolivar Mompos Inspeccion Rinconada, Ciénaga Poyuelo	
<i>A. purpurea</i> Mef y Sesse ex Dun	Puello Amaury et al determinado J Murillo 97	Cordoba San Bernardo del Vicinto Barrio La Balsa	
<i>A. purpurea</i> Mef y Sesse ex Dun	J M Idrobo determinado Paul Maas et al	Costa Rica	
<i>A. purpurea</i> Mef y Sesse ex Dun	E Tyson	Panamá zona canal (anticancerígeno)	
<i>A. purpurea</i> Mef y Sesse ex Dun	W Stinson	Panamá prov de los Santos	
<i>A. reticulata</i> L	J A Perez et al	Antioquia Finca Cotave	06 34 N 75 50 O
<i>A. reticulata</i> L	E Forero et al determinado J Murillo 01	Chocó Acondi Ungua	
<i>A. reticulata</i> L	M De Romero det R Romero Castañeda	Magdalena Orihueca	
<i>A. reticulata</i> L	J Walker	Tolima y Cundinamarca El Boqueron ruta a Melgar	
<i>A. saffordiana</i> R E Fries	J Coelho	Brazil estado de Paraíba (arbusto trepador)	
<i>A. scandens</i> Diels	Paul Maas et al determinado E Van Heusden	Peru prov San Martin	
<i>A. scandens</i> Diels	Paul Maas et al determinado E Van Heusden	Peru prov Lamas	
<i>A. scandens</i> Diels	Paul Maas et al determinado E Van Heusden	Peru Ucayali	
<i>A. sericea</i> Dun	C Allen et al	Brazil Manaus Cachocira affé Iaruma	
<i>A. sericea</i> Dun	K Kramer et al J C Lindemon	Surinam Republick	
<i>A. sericea</i> Dun	J M Pires	Brazil Ltdo de Para Vila Neve rio Tapajos	
<i>A. spraguei</i> safford	J Brand	Antioquia Turbo carretera Tapon del Darien	
<i>A. spraguei</i> safford	E Forero determinado Gentry 78	Chocó Rio Sucio Parque los Katios rio Filupo	
<i>A. spraguei</i> safford	I Leguizamo	Cordoba Uré hacia Montchibono	
<i>A. spraguei</i> safford	W Meyes determinado I Leguizamo	Panamá zona Canal	
<i>A. spraguei</i> safford	Puello Amaury determinado J Murillo 98	Cordoba Ayapel vivero las Flores	
<i>A. spraguei</i> safford	S Zuluaga	Choco Parque los Katios sector Sautará	
<i>A. squamosa</i> L	D Sanchez et al determinado J Murillo 01	Antioquia Frontino correg Nutivara Rio Cuevas	
<i>A. symphyocarpa</i> Sandw	P Mutchnick det Paul Maas et al	Guyana region Potaro Siparuni	4 42 N 59 50 W
<i>A. tenuiflora</i> Mart	determinado R I Fries 52	Ecuador prov Chimborazo cañon rio Chanchan	5 20 N 58 40 W
<i>Asimina triloba</i> ( L) Dunal		West Virginia Wirt County above Palestine	
<i>Raimondia cherimoloides</i> ( tr Y pl ) R E Fries	W Derri determinado Paul Maas et al 97	Ville Restrepo Rio Bravo La Cristalina	
<i>Raimondia cherimoloides</i>	C Barbosa determinado L Westra 88	Ville bosque Yotoco	
<i>Raimondia cherimoloides</i>	M Velez et al	Quindio Circacia Los Pinos Finca Villa Ligia	

ESPECIE	COLECTOR	SITIO DE COLECTA	GPS
	determinado Paul Maas et al 97		
<i>Raimondia cherimolioides</i>	J Betancur et al determinado Paul Maas et al 97	Antioquia caramonta Hojasanchas	75 40 69 W 5 31 8 N
<i>Raimondia cherimolioides</i>	P Franco et al determinado Paul Maas et al 97	C/marca I a Magola	
<i>Raimondia cherimolioides</i>	J Duque Jaramillo determinado L Westra 88	Caldas Chinchina (fruto no comestible)	
<i>R quinduensis</i> (kunth) safford	S Diaz et al determinado L Westra 88	Nariño la Florida	
<i>R quinduensis</i> (kunth) safford	S Diaz et al determinado Paul Maas et al 97	Risaralda Pereira Parque Ucumarí	
<i>R quinduensis</i> (kunth) safford	S Diaz et al	Quindío Genova El Cedral	
<i>R quinduensis</i> (kunth) safford	Clara de Rincon determinado L Westra 88	C/marca, San Juan de Rio Seco	
<i>R quinduensis</i> (kunth) safford	O Rangel determinado Paul Maas et al 97	Risaralda El Cedral	
<i>R quinduensis</i> (kunth) safford	B Sten determinado Paul Maas et al 97	Quindío I a Cabaña Calarca a Ibagué	
<i>R quinduensis</i> (kunth) safford	M Velez et al determinado M Velez et al	Quindío Ilandia I a Meza alta	
<i>R quinduensis</i> (kunth) safford	G Galeano et al determinado G Galeano et al	C/marca Bogotá I aguna Pedro Polo	
<i>R quinduensis</i> (kunth) safford	A Fernandez	Cauca Popayan Cojete	
<i>R quinduensis</i> (kunth) safford	W Devia determinado Paul Maas et al 97	Valle Tulua Mateguadua	
<i>R quinduensis</i> (kunth) safford	C Ceroh et al	Ecuador Zimora Chinchipe	
<i>R quinduensis</i> (kunth) safford	A Cogollo et al	Antioquia San Luis Las Confusas	63 N 74 47 W
<i>R quinduensis</i> (kunth) safford	J G Ramirez et al	Antioquia San Luis La Cristalina	
<i>R quinduensis</i> (kunth) safford	D Cardenas et al	Antioquia Puerto Trunfo Dorada	
<i>R quinduensis</i> (kunth) safford	Jorge Torres	Risaralda Apia I a Cumbre	
<i>R quinduensis</i> (kunth) safford	M De Fraume determinado Paul Maas et al 97	Caldas Manizalez Monteleon	
<i>R quinduensis</i> (kunth) safford	E Perez Arbelaz et al determinado L Westra 88	Quindío entre La Gabriela y la línea	
<i>R quinduensis</i> (kunth) safford	W Devia determinado Paul Maas et al 97	Valle Riofrio El Crucero	
<i>Rollinia Amazonica</i> R E Fries	J Duque det P Maas y Wistra 88	Amazonas desembocadura Lorcotvacu	
<i>Rollinia Amazonica</i> R E Fries	J Duque det P Maas y Wistra 88	Trapezio Am izonico	
<i>R cardantha</i> Diels			
<i>R chocoensis</i> R E Fries	J M Idrobo	Choco entre Condoto y Andajoya	
<i>R curvipetala</i> R E Fries			

ESPECIE	COLECTOR	SITIO DE COLECTA	GPS
<i>R. cuspidata</i> Martius	A Rudas et al	Amazonas I eticia Parque Amacayacu	3 42 S 70 15 W
<i>R. cuspidata</i> Martius	D Simpson et al det P Maas y Wastra 88	Peru depto Loreto M iynas Iquitos	
<i>R. cuspidata</i> Martius	R Visquez determinado Paul Maas 90	Peru Loreto Requena	
<i>R. cuspidata</i> Martius	E Little det P Maas y Wastra 88	Amazonas Solano 8 km S E Ire Esquinas	
<i>R. cuspidata</i> Martius	J M Idrobo determinado J M Idrobo	Amazonas Trapecio Amazonico	
<i>Rollinia danforthi</i> Standley	J M Idrobo determinado J M Idrobo	Choco Condoto	
<i>R. danforthi</i> Standley	E Forero et al determinado E Forero et al	Choco Rio San Juan cerro de la Mojarra	
<i>Rollinia dolichopetala</i> R E fries	E Little et al determinado E Little et al	Ecuador Morona Santiago	
<i>R. edulis</i> triana y planchon	J M Idrobo determinado J M Idrobo	Amazonas rio Caquetá Araracunara	
<i>R. edulis</i> triana y planchon	J Duque Jaramillo determinado J Duque Jaramillo	Trapecio Amazonico	
<i>R. edulis</i> triana y planchon	R Jaramillo et al determinado R Jaramillo et al	Meta Villavicencio	
<i>R. edulis</i> triana y planchon	L Uribe determinado L Uribe	Meta San Martin v Acacias	
<i>R. edulis</i> triana y planchon	D D Soejarto determinado D D Soejarto	Putumavo sobre confluencia del rio con rio Moco	
<i>R. edulis</i> triana y planchon	E Little et al determinado E Little et al	Meta Puerto Lopez	
<i>R. edulis</i> triana y planchon	A Rodriguez et al	Vaupes Estacion Caparu	
<i>R. edulis</i> triana y planchon	H Garcia Barriga determinado H Garcia Barriga	Meta entre Cumaral y Restrepo	
<i>R. edulis</i> triana y planchon	J Cuatrecasas determinado J Cuatrecasas	Comisaria Vaupes San Jose del Guaviare	
<i>R. edulis</i> triana y planchon	C Gamboa det P Maas y Wastra - 88	Meta, Meta Coruy alto	
<i>R. edulis</i> triana y planchon	J M Idrobo determinado J M Idrobo	Meta alrededor La Macarena, hda Los Micos	
<i>R. edulis</i> triana y planchon	I Acero Duarte determinado F Mahecha 97	Casanare Orocué	
<i>R. edulis</i> triana y planchon	H Bernal determinado H Bernal	Caqueta alrededor San Jose de la ragua	
<i>Rollinia elliptica</i> R E fries			
<i>R. Emerginata</i> Schldt	M Rossato et al	Brazil Sao I rancisco de Paula Cerapina	
<i>R. exsucca</i> (Dum) A DC	R L Groes det P Maas y Wastra 88	Brazil Estado Para rio Vermelho Tocantins	
<i>R. exsucca</i> (Dum) A DC	M Janson Jacobs et al det P Maas y Ven Setten 88	Guyana. Kanuku	
<i>R. exsucca</i> (Dum) A DC	M P Córdoba	Vichada, Puerto Carreño 5 12 188 N 69 5 407 W	
<i>R. exsucca</i> (Dum) A DC	L Scop et al	Guyana, Francesa región St Lorent	

ESPECIE	COLECTOR	SITIO DE COLECTA	GPS
	determinado Paul Maas 87		
<i>R. exsucca</i> (Dum) A DC	Coll B det P Maas y Wastra 88	Surinam Kaboerie	
<i>R. exsucca</i> (Dum) A DC	B Boom et al	Venezuela Bolivar Cedeño	
<i>R. hispida</i> Maas y Westra	Jose Schunke determinado Jose Schunke	Peru Huanuco Pechitea, Honoria	
<i>R. insignis</i> R E Fries	A Rudas et al determinado A Rudas 93	Amazonas Leticia, Parque Amacayacu	
<i>R. insignis</i> R E Fries	E Forero et al determinado E Forero	Brazil Amazonas Manaus Estrada de Aleixo	
<i>R. jimenezii</i> Safford			
<i>R. baurifolia</i> Schlechtendel	E Forero et al determinado E Forero	Brazil Sao Paulo Ilha do Cardoso	
<i>Rollinia membranacea</i> Triana y Planchon	E Little det P Maas y Wastra 88	Huila 20 km N O de Palermo (4000 pies)	
<i>Rollinia membranacea</i> Triana y Planchón	J Triana determinado J Triana	Prov De Antioquia	
<i>Rollinia membranacea</i> Triana y Planchon	D Cardenas et al	Antioquia San Luis prodigio Las Grifusas	
<i>Rollinia membranacea</i> Triana y Planchon	H Cuadros determinado H Cuadros	Valle Sevilla La Estelia	
<i>Rollinia membranacea</i> Triana y Planchon	M Velcz et al	Quindio Quimbaya Palermo Finca la cascada	
<i>Rollinia membranacea</i> Triana y Planchón	A Fernandez determinado A Fernandez	Cundinamarca La Mesa Guavabal cerro Macute	
<i>Rollinia membranacea</i> Triana y Planchon	J Betancur determinado Maas et al 97	Caldas Filadelfia	
<i>Rollinia membranacea</i> Triana y Planchon	D Cardenas et al determinado A Cogollo	Antioquia Puerto Nore Guaimaro	
<i>R. mucosa</i> (jacquin) baillon	E Forero det P Maas y Wastra 88		
<i>R. mucosa</i> (jacquin) baillon	D Cardenas et al determinado D Cardenas 00	Putumayo Mocoa, San Carlos serrania de churumbelo	
<i>R. mucosa</i> (jacquin) baillon	G Lozano det P Maas y Wastra 88	Amazonas Leticia camino hacia Tarapaca	
<i>R. mucosa</i> (jacquin) baillon	J M Idrobo determinado J M Idrobo	Amazonas Trapecio Amazonico rio Atacuari	
<i>R. mucosa</i> (jacquin) baillon	P Allen determinado P Allen	Vaupes rio Papuni mision Menfort	
<i>R. mucosa</i> (jacquin) baillon	H Garcia Barriga determinado H Garcia Barriga	Santander Norte La Motilona hoya rio oro	
<i>R. mucosa</i> (jacquin) baillon	E Renteria determinado E Renteria	Cesar San Alberto Valledupar ( a pueblo Bello)	
<i>R. mucosa</i> (jacquin) baillon	C Sastre determinado C Sastre	Amazonas rio Amacayacu	
<i>R. mucosa</i> (jacquin) baillon	R Romero Castañeda det R Romero Castañeda	Santander S E Barrancabermeja	
<i>R. mucosa</i> (jacquin) baillon	Harriet G Bareley determinado Harriet G Bareley	Putumayo Puerto Asis	
<i>R. mucosa</i> (jacquin) baillon	R Callejas et al	Antioquia Carepa reserva Forestal Tuknapa	

ESPECIE	COLECTOR	SITIO DE COLECTA	GPS
	determinado Paul Maas et al 97		
<i>R mucosa</i> (jacquin) baillon	R Romero Castañeda det P Maas y Wastra 88	Choco Acondi río Cuti	
<i>R mucosa</i> (jacquin) baillon	D Saejorto determinado D Saejorto	Vaupes Mitu	
<i>R mucosa</i> (jacquin) baillon	H Florez	Guaviare San Jose del Guaviare	
<i>R mucosa</i> (jacquin) baillon	R Schultes determinado R Schultes	Putumayo Santa Rosa y alrededores	
<i>R mucosa</i> (jacquin) baillon	S Espinal det P Maas y Wastra 88	Antioquia La Pintada	
<i>R mucosa</i> (jacquin) baillon	D Saejorto determinado D Saejorto	Putumayo Puerto Asis	
<i>R mucosa</i> (jacquin) baillon	C La Rotta	Amazonas Santa Isabel reserva Mirafía	
<i>R mucosa</i> (jacquin) baillon	H Makee determinado H Makee	Valle Palmira	
<i>R mucosa</i> (jacquin) baillon	N Arevalo et al	Peru Iquitos Maynas Loreto	
<i>R mucosa</i> (jacquin) baillon	C Torres et al	Amazonas Leticia Finca Ieresa Nuñez	
<i>R mucosa</i> (jacquin) baillon	L Gomez	Costa Rica Esperza Macacaria	

## **Anexo 5**

Informe anual Proyecto de Agrobiodiversidad y Biotecnología-SB02 CIAT

Presentación en encuentro regional de ciencia y biotecnología

Presentación en el primer Congreso Nacional de Biotecnología

## TABLA DE CONTENIDO

1	IDENTIFICACION DEL PROYECTO	2
2	SINOPSIS	2
3	RESUMEN	5
4	INFORME DE RESULTADOS	10
4 1	DESCRIPCION DEL PROYECTO	10
4 2	Materiales y metodos	15
4 2 1	Lugar de ejecucion del proyecto	15
4 3	Localizacion y Registro de Condiciones Agroecologicas del Banco de germoplasma	15
4 4	Composicion del Banco de Germoplasma	16
4 4 1	Accesiones utilizadas para la caracterizacion molecular	18
4 5	Mantenimiento del Banco de Germoplasma	20
4 6	Metodologia utilizada para la caracterizacion agromorfologica	23
4 6 1	Evaluacion de Parametros	23
4 7	Metodologia Utilizada para la Caracterizacion molecular	26
4 7 1	Obtencion de Marcadores AFLP de las Accesiones	26
4 7 2	Recoleccion de Tejido Foliar	27
4 7 3	Extraccion de ADN	27
4 7 4	Produccion de los AFLPs	28
4 7 5	Analisis Comparativo de los Marcadores AFLP entre las Diferentes Accesiones	28
4 8	Resultados y Discusion	29
4 8 1	Caracterizacion Agromorfologica	29

4 9	Caracterizacion Molecular de la Variabilidad Genetica del Guanabano y Especies de Anonaceas Relacionadas	49
4 9 1	Colecta de Tejidos y Extraccion de ADN	49
4 9 2	Extraccion de ADN del Guanabano y de Especies de Anonaceas Relacionadas	49
4 9 3	Marcadores AFLP de las Acciones de Guanabano y Especies de Anonaceas relacionadas	50
4 9 4	Correlacion de las matrices de similitud	55
4 9 5	Validez de la informacion obtenida con los marcadores AFLP para la Sistemática y la Filogenia	57
4 9 6	Variabilidad Genetica e Identificacion Taxonomica de las Acciones de Especies de Anonaceas	59
4 9 7	Variabilidad Intraespecifica en Guanabano	66
4 9 8	Implicaciones de los Resultados del Analisis Molecular para la Taxonomia de las Especies del Genero <i>Annona</i> y de los Generos <i>Annona</i> y <i>Rollinia</i>	71
4 9 9	Objetivo No 3 Inventario Preliminar de la Variabilidad Genetica de Guanabanos y Anonaceas Afines Existentes en Herbarios y Colecciones Nacionales	73
4 9 10	Objetivo No 4 Incrementar la variabilidad genetica del banco de germoplasma vivo de guanabano y anonaceas afines de C I Corpoica con materiales que se encuentran en fincas de agricultores y colecciones de universidades	74
4 9 11	Objetivo No 5 Diseñar estrategias de utilizacion sostenible de la variabilidad caracterizada, en la produccion de material de siembra para el establecimiento de cultivos tecnificados	75
4 9 12	Estrategias de comunicacion	75
5	IMPACTOS	75
6	CITAS BIBLIOGRAFICAS	79
7	INFORME FINANCIERO	81

