

Evaluación *in vitro* de antagonistas contra patógenos de fruto de guanábana (*Annona muricata* L.) en Nayarit, México

Carlos Bryan Cambero Ayón¹, Gregorio Luna Esquivel², Claudio Rios Velasco³, Orlando Estrada Virgen², Antonio Betancourt Arangur¹ y Octavio Jhonathan Cambero Campos²

Resumen - En Nayarit, México, la producción de guanábana es afectada por los patógenos de fruto *Pestalotiopsis* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides* que provocan pudrición seca y *Lasiodiplodia pseudotheobromae* pudrición blanda. En el presente estudio, se evaluó el antagonismo *in vitro* de tres especies de *Streptomyces*, tres de *Trichoderma* y tres de *Bacillus*. Las cepas de *Trichoderma* mostraron diferente inhibición en los patógenos evaluados, *Trichoderma longibrachiatum* mostró el mayor PIRG, que fueron de 60.45, 59.33 y 57.9 al confrontarse contra *C. gloeosporioides*, *Pestalotiopsis* sp., y *L. pseudotheobromae*, respectivamente. En el caso de las bacterias, el mayor PIRG fue de 58.22 % con *B. methylotrophicus* contra *Pestalotiopsis* sp. Las cepas de *Streptomyces* fueron las más eficaces y podrían estudiarse en futuras investigaciones sobre el control biológico de patógenos de fruto, ya que ejercieron el 100 % de inhibición excepto *S. viridochromogenes* que presentó un porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PIRG) de 88.3 % contra *Lasiodiplodia pseudotheobromae*.

Términos para Indexación: Control biológico, antagonismo, fitopatígeno, confrontación.

In vitro evaluation of antagonists against soursop fruit pathogens (*Annona muricata* L.) in Nayarit, Mexico

Abstract - In Nayarit, Mexico, soursop production is affected by the pathogens of *Pestalotiopsis* sp. and *Colletotrichum gloeosporioides* that cause dry rot and *Lasiodiplodia pseudotheobromae* soft rot. In the present study, the *in vitro* antagonism of three species of *Streptomyces*, three of *Trichoderma* and three of *Bacillus* were evaluated. The *Trichoderma* strains showed different inhibition in the pathogens evaluated, *Trichoderma longibrachiatum* showed the highest PIRG *in vitro*, which was 60.45, 59.33 and 57.9 when confronted against *C. gloeosporioides*, *Pestalotiopsis* sp., and *L. pseudotheobromae*, respectively. The bacteria showed lower PIRG than the fungi. *B. methylotrophicus* exhibited the highest capacity of inhibition of the experiment with 58.22 % of PIRG against *Pestalotiopsis* sp. The *Streptomyces* strains were the most effective and could be studied in future researches on the biological control of fruit pathogens, since they exerted 100 % inhibition except *S. viridochromogenes* that presented a percentage of inhibition of radial growth (PIRG) of 88.3 % against *Lasiodiplodia pseudotheobromae*.

Index Terms: Biological control, antagonism, phytopathogen, confrontation.

Corresponding author:
camberoayon1@gmail.com

Received: September 22, 2019
Accepted: January 20, 2020

Copyright: All the contents of this journal, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution License.



¹Maestro en Ciencias. Programa de Doctorado en Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit, Xalisco, Nayarit, México. Carretera Tepic-Compostela. E-mails: camberoayon1@gmail.com (ORCID 0000-0002-4696-8362); luzbeltz@gmail.com (ORCID 0000-0002-8367-8735).

²Doctor en Ciencias. Universidad Autónoma de Nayarit, Xalisco, Nayarit, México. Carretera Tepic-Compostela. E-mails: gollole@hotmail.com (ORCID 0000-0003-4716-0805); estra0288@gmail.com (ORCID 0000-0002-9182-2864); jhony695@gmail.com (ORCID 0000-0001-5197-9907)

³Doctor en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Campus Cuauhtémoc, Chihuahua. Cuauhtémoc, Chihuahua, México. E-mail: claudio.rios@ciad.mx (ORCID 0000-0002-3820-2156)

La guanábana (*Annona muricata* L.) se produce en diez Estados de México, principalmente en Nayarit (2 529 ha y 21 810 t) (SIAP, 2017). Sin embargo, su producción es afectada por enfermedades fúngicas, las cuales perjudican su fisiología y por ende su rendimiento (JIMÉNEZ, 2017). La calidad del fruto en otros países se puede afectar por *Fusarium chlamydosporum* Wollenweber y Reinking, *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmond, *C. gloeosporioides* (Penz) Penz. y Sacc. (ALBERTO; OTANES, 2016), *Penicillium* sp., *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. y *Aspergillus niger* P.E.L. van Tieghem (OKIGBO; OBIRE, 2009). Para Nayarit, México se ha reportado a *Pestalotiopsis* sp. y *C. gloeosporioides* como causantes de la pudrición seca y *Lasiodiplodia pseudotheobromae* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous como el agente causal de la pudrición blanda de fruto de *A. muricata* (CAMBERO et al. 2019). Como una alternativa para el manejo de enfermedades, se encuentran los microorganismos como *Trichoderma* (PADDER; SHARMA, 2011; LANDERO et al. 2015), *Bacillus* y *Streptomyces*, que han mostrado capacidad antifúngica *in vitro* contra diversos hongos patógenos (UTKHEDE; SHOLBERG, 1986; DÁVILA et al. 2013; KAMIL et al. 2018). Además, no contaminan el ambiente, lo cual permite un manejo sustentable de la problemática fitosanitaria de *A. muricata* en Nayarit. Por lo anterior, el objetivo del trabajo fue, evaluar el efecto antifúngico *in vitro* de cepas de *Streptomyces*, *Trichoderma* y *Bacillus* contra *L. pseudotheobromae*, *C. gloeosporioides* y *Pestalotiopsis* sp., agentes causales de pudriciones en frutos de guanábana en Nayarit, México. Los hongos fitopatógenos se obtuvieron del cepario del Laboratorio de Parasitología Agrícola del CEMIC 03 de la Universidad Autónoma de Nayarit (UAN). Mientras que las cepas antagonistas: *Streptomyces* sp. SLe5, *S. viridochromogenes* TDI-4, *S. tubericidicus* 14241, *Trichoderma harzianum* Rifai, *T. asperellum* Samuels, Lieckfeld y Nirenberg, *T. longibrachiatum* Rifai, *Bacillus subtilis*, *B. methylophilus* y *B. amyloliquefaciens*, fueron proporcionadas por el cepario del CIAD, sede Chihuahua, campus Cuauhtémoc. Para las confrontaciones con *Streptomyces* spp., se colocaron cuatro explantes con el antagonista de 6 mm de diámetro en cajas de Petri (90 x 15 mm) en los puntos cardinales previamente crecidos en medio Czapek-Dox-Agar (CDA) y se incubaron a 28 °C por 10 d. Posteriormente, se situó un explante de Agar Papa Dextrosa (PDA) de 6 mm de diámetro con micelio del patógeno (7 d de crecimiento) en el centro de la caja de Petri (CASTILLO et al. 2001; PÉREZ et al. 2015). Después de las mediciones correspondientes a esta confrontación, el explante de los patógenos que no mostraron crecimiento (100 % de inhibición) al estar en confrontación contra las cepas de *Streptomyces*, se transfirieron a una nueva caja con PDA sin presencia del antagonista, para observar si tenían acción fungistática

o fungicida. Para los bioensayos con *Trichoderma*, se realizaron confrontaciones duales en cajas de Petri (90 × 15 mm) con PDA, con discos de 6 mm de diámetro de PDA con crecimiento micelial (sin conteo de conidios) del antagonista y el patógeno correspondiente con 7 d de crecimiento (BELL et al. 1982). Por otra parte, en las confrontaciones con *Bacillus*, se colocaron cuatro explantes de 6 mm de diámetro en los puntos cardinales crecidos previamente en medio PDA, posteriormente, en el centro de la caja se colocó el explante de 6 mm de diámetro con micelio del patógeno con 7 d de crecimiento. Todas las confrontaciones fueron incubadas a 28° C en una incubadora Precision Scientific (Modelo 31534) en ausencia de luz y se midió el crecimiento radial del patógeno cada 24 h con un vernier digital KNOVA® hasta que los patógenos testigos llenaron por completo la caja de Petri (RIOS et al. 2016). A cada uno de los antagonistas se evaluó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), con la fórmula, $PICR = (R1 - R2) / R1 \times 100$, (R1= radio del patógeno testigo, R2= radio del patógeno en confrontación) (EZZIYYANI et al. 2004). A los datos de PICR se les aplicó un análisis de varianza (ANVA) con el Statistical Analysis System versión 9.0 (SAS, 2002), y la separación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey ($p = 0.05$). Las pruebas se realizaron por triplicado, cada repetición constó de tres unidades experimentales y como testigo se consideraron 10 cajas del patógeno sin presencia de antagonista. De las cepas evaluadas de *Streptomyces* (Fig. 1), las tres inhibieron el 100 % el crecimiento micelial de *L. pseudotheobromae*, *C. gloeosporioides* y *Pestalotiopsis* sp., excepto *S. viridochromogenes* que presentó un PICR de 88.3 % contra este *L. pseudotheobromae*.

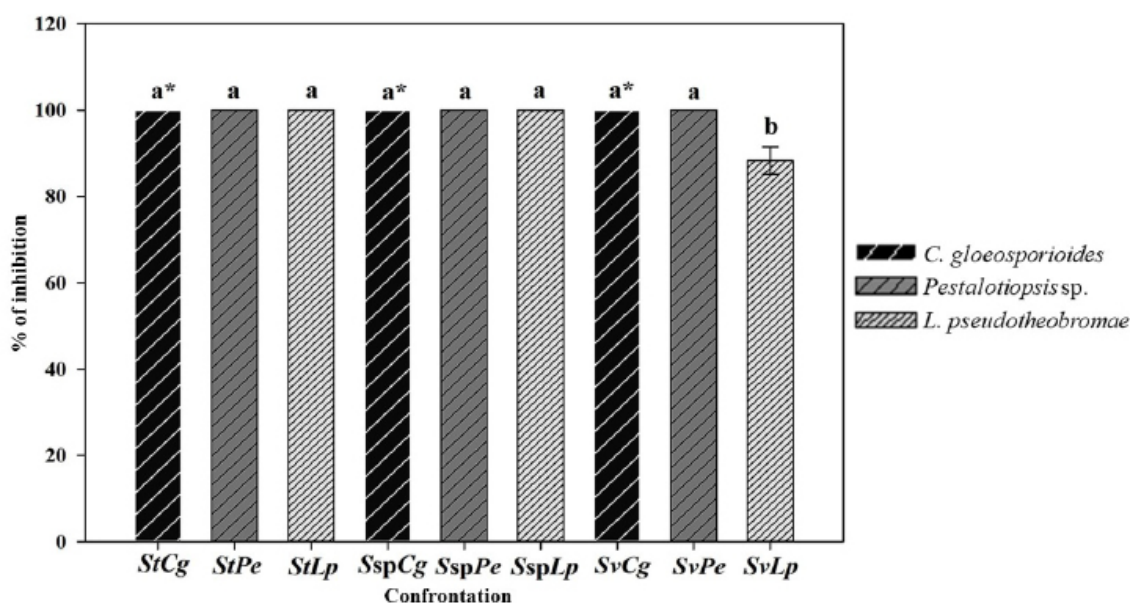


Figura 1. Antagonismo *in vitro* de *Streptomyces* spp. contra patógenos de fruto de guanábana. (St: *S. tubercidicus*, Sv: *S. viridochromogenes*, Ssp: *Streptomyces* sp., Cg: *C. gloeosporioides*, Pe: *Pestalotiopsis* sp., Lp: *L. pseudotheobromae*). Barras con la misma literal son estadísticamente iguales ($p=0.05$). * Presencia de efecto fungicida de *Streptomyces* vs *C. gloeosporioides*.

Esto difiere con Palaniyandi et al. (2011), al obtener un PICR de 57.5% al confrontar *Streptomyces* sp. MJM5763 contra *Pestalotia* sp. Las tres cepas de *Streptomyces* tuvieron un efecto fungistático contra *Pestalotiopsis* sp. y *L. pseudotheobromae*, mientras que contra *C. gloeosporioides* presentaron un efecto fungicida *in vitro*. Esto posiblemente se deba a que estos microorganismos producen diferentes enzimas (amilasa, asparaginasa, catalasa) y antibióticos (tetraciclina, eritromicina, rifampicina, neomicina, cloranfenicol) (KAVITHA et al. 2010; REYES et al. 2015) o compuestos antifúngicos como nistanina, anfotericina, natamicina, que contaminan el medio y al mismo tiempo inhiben el crecimiento de los fitopatógenos (KOONTZ; MARCY, 2003). De las cepas de *Trichoderma* evaluadas (Fig. 2), *T. longibrachiatum* fue el más efectivo contra *C. gloeosporioides*, *Pestalotiopsis* sp. y *L. pseudotheobromae*, con inhibiciones de 60.45, 59.33 y 57.9 %, respectivamente. Mientras que *T. harzianum* vs *C. gloeosporioides*, *T. asperellum* vs *Pestalotiopsis* y *C. gloeosporioides* mostraron valores menores al 45.07 %. Resultados similares obtuvieron Landero et al. (2015) al confrontar cepas de *T. longibrachiatum*, *T. harzianum* y *T. asperellum* contra *C. gloeosporioides* aislado de papaya (*Carica papaya*), donde reportaron PICR de 53.26 a 55.82 %. El género *Trichoderma* ha sido el más evaluado para el control de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos como *C. gloeosporioides* por su facilidad para ser aislado, cultivado y crecido en diversos sustratos, entre otros atributos (PEREIRA et al. 2010; SANMARTÍN et al. 2012; BHADRA et al. 2014). Las especies de *Bacillus* demostraron diferente inhibición en los patógenos (Fig. 3), el PICR (58.22 %) más alto se observó en la confrontación de *B. methylotrophicus* vs

Pestalotiopsis sp. Sin embargo, al confrontarse contra *C. gloeosporioides* su inhibición fue menor (23.16 %). Por otra parte, *B. methylotrophicus* vs *L. pseudotheobromae* y *B. amyloliquefaciens* vs *C. gloeosporioides*, ejercieron un PICR de 54.57 y 53.02 %, respectivamente. Porcentajes similares obtuvieron Ruiz et al. (2017), al evaluar a *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens* contra *Phytophthora cactorum* y *Pythium* spp. con 91.6 y 18.8 %, respectivamente. Los bajos porcentajes inhibición de *B. subtilis* contrastan con lo obtenido por Ruiz et al. (2014), al evaluar una cepa de la misma especie contra *C. gloeosporioides* obtuvieron un PICR de 77.9 %. Cabe mencionar que *Streptomyces* es el género menos utilizado comercialmente como agente de control biológico de patógenos a comparación con *Trichoderma* y *Bacillus*, por lo que se deberían de realizar futuros estudios para el control de fitopatógenos y de esta manera disminuir el uso de fungicidas químicos.

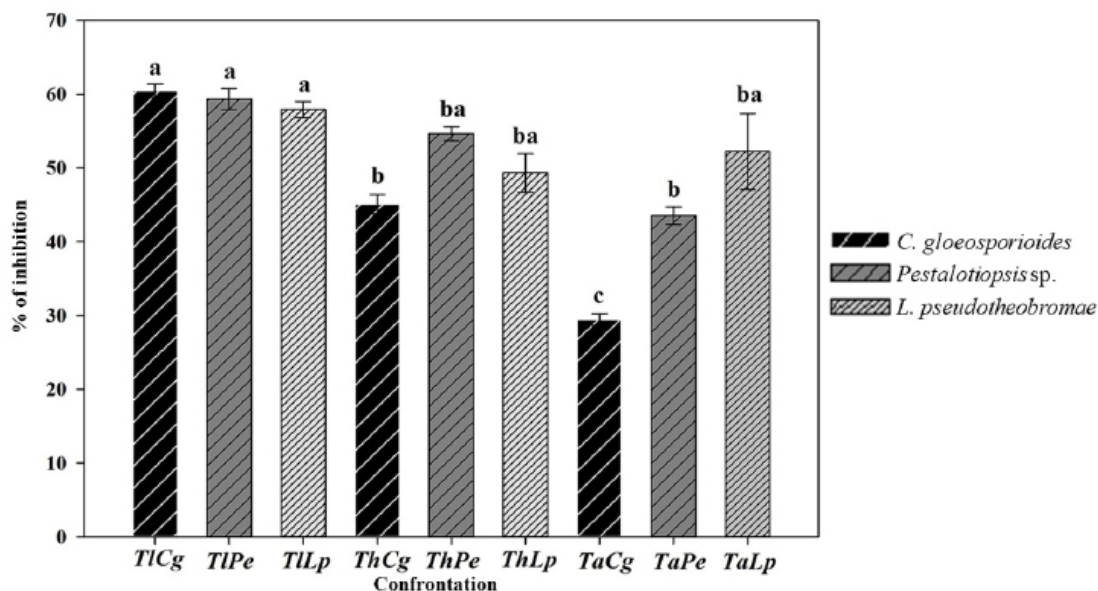


Figura 2. Antagonismo *in vitro* de tres especies de *Trichoderma* vs agentes causales de las pudriciones de fruto de guanábana. (Ti: *T. longibrachiatum*, Th: *T. harzianum*, Ta: *T. asperellum*, Cg: *C. gloeosporioides*, Pe: *Pestalotiopsis* sp., Lp: *L. pseudotheobromae*). Barras con la misma literal son estadísticamente iguales ($p=0.05$).

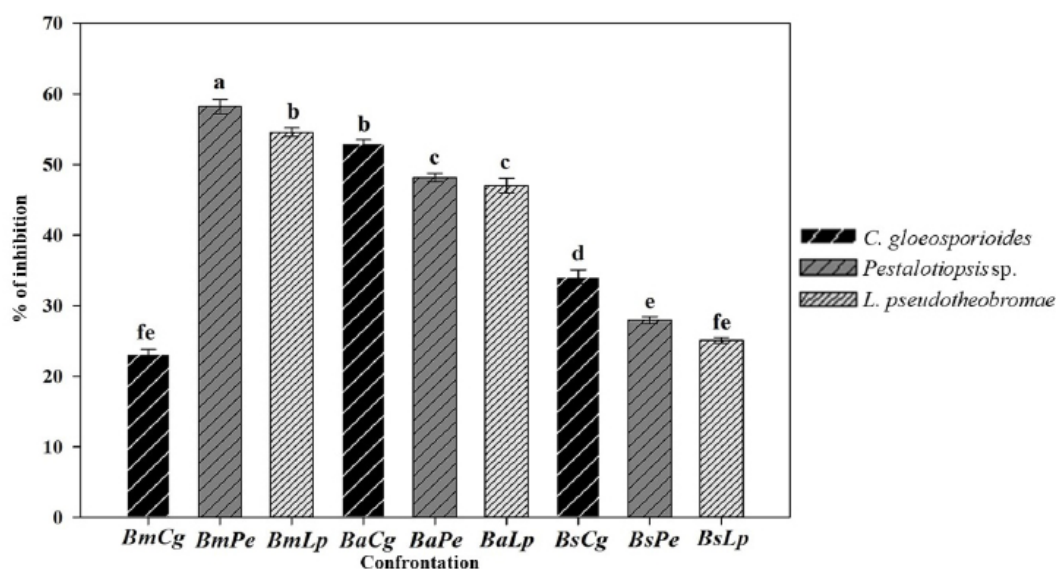


Figura 3. Confrontación *in vitro* de *Bacillus* spp. contra patógenos causantes de pudriciones de fruto de guanábana. (Bm: *B. methylotrophicus*, Ba: *B. amyloliquefaciens*, Bs: *B. subtilis*, Cg: *C. gloeosporioides*, Pe: *Pestalotiopsis* sp., Lp: *L. pseudotheobromae*). Barras con la misma literal son estadísticamente iguales ($p=0.05$).

Agradecimientos

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

References

ALBERTO, R. T.; OTANES A. T. Morphological and molecular identification and fungicide sensitivity assay of pathogens attacking guayabano (*Annona muricata*) in Philippines. **Plant Pathology & Quarantine**, Chiangi Rai, v.6, n.1, p.60-79, 2016.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, St Paul, v.72, p.379-382, 1982.

- BHADRA, M.; KHAIR, A.; HOSSAINS, A.; SIKDER, M. Efficacy of *Trichoderma* spp. and fungicides against *Lasiodiplodia theobromae*. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**, Dhaka, v.49, n.2, p.125-130, 2014.
- CAMBERO, A. C.; LUNA, E. G.; RIOS, V. C.; DIAZ, H.; RODRÍGUEZ, P. M.; BETANCOURT, A. A.; CAMBERO, C. J. Causal agents of the rot of fruit soursop (*Annona muricata* L.) in Nayarit, Mexico. **Revista Bio Ciencias**, Tepic, v.6, p.1-13, 2019.
- CASTILLO, F. E.; GALLEGOS, M. G.; HERNÁNDEZ, C. F.; CEPEDA, S. M.; ZAMORA, V. V. Efectividad de actinomicetos aislados de la rizosfera de papa sobre *Rhizoctonia solani* kühn *in vitro*. **Revista Mexicana de Fitopatología**, Chapingo, v.19, n.2, p.203-207, 2001.
- DÁVILA, M. M.; GALLEGOS, M. G.; HERNÁNDEZ, C. F.; OCHOA, F. Y.; FLORES, O. A. Actinomicetos antagonísticos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, Chapingo, v.4, n.8, p.1187-1196, 2013.
- EZZIYYANI, M.; PÉREZ, S. C.; REQUENA, M. E.; RUBIO, L.; CANDELA, C. M. Biocontrol por *Streptomyces rochei* -Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. **Anales de Biología**, Murcia, v.26, p.69-78, 2004.
- JIMÉNEZ, D. R. Las enfermedades de las plantas: Impactos, amenazas y control. **Boletín de la Real Academia de Córdoba**, Córdoba, v.166, p.111-130, 2017.
- KAMIL, F.; SAEED, E.; EL-TARABILY, K.; ABUQAMAR, S. Biological control of mango dieback disease caused by *Lasiodiplodia theobromae* using Streptomyces and non-streptomyces actinobacteria in the United Arab Emirates. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v.9, n.829, p. 1-19, 2018.
- KAVITHA, A.; VIJAYALAKSHMI, M.; SUDHAKAR, P.; NARASIMHA, G. Screening of Actinomycete strains for the production of antifungal metabolites. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v.4, n.1, p.27-32, 2010.
- KOONTZ, J.; MARCY, J. Formation of natamycin: cyclodextrin inclusion complexes and their characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.51, p.7106-7110, 2003.
- LANDERO, V. N.; LARA, V. F.; ANDRADE, H. P.; AGUILAR, P. L.; AGUADO, R. G. Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, Chapingo, v.7, n.5, p.1189-1198, 2016.
- LANDERO, V. N.; NIETO, A. D.; TÉLIZ, O. D.; ALATORRE, R. R.; ORTÍZ, G. C.; OROZCO, S. M. Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol papaya fruit. **Biological Control**, Dordrecht, v.91, p.88-93, 2015.
- OKIGBO, R.; OBIRE, O. Mycoflora and production of wine from fruits of soursop (*Annona muricata* L.). **International Journal of Wine Research**, Auckland, v.1, p.1-9, 2009.
- PADDER, B. A.; SHARMA, P. N. *In vitro* and *in vivo* antagonism of biocontrol agents against *Colletotrichum lindemuthianum* causing bean anthracnose. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Berlin, v.44, n.10, p.961-969, 2011.
- PALANIYANDI, S. A.; YANG, S. H.; CHENG, J. H.; MENG, L.; SUH, J. W. Biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in yam by *Streptomyces* sp. MJM5763. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.111, p.443-455, 2011.
- PEREIRA, B. M.; SÃO, J. A.; HOJO, R. T.; SOUSA, S.; BOAS, S. V.; OLVEIRA, D. N. Avaliação antagonística *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* en maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.36, n.1, p.61-67, 2010.
- PÉREZ, C. D.; GARCÍA, G. N.; GALLEGOS, M. G.; RUIZ, C. M.; BERLANGA, R. D.; RIOS, V. C. Aislamiento de actinomicetos asociados a rizosfera de árboles de manzano antagonísticos a *Fusarium equiseti*. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, Chapingo, v.6, n.7, p.1629-1638, 2015.
- REYES, T. A.; RINCÓN, E. G.; EVANGELISTA, M. Z.; QUIÑONES, A. E.; LÓPEZ, P. L. Lucha entre microbios: una herramienta para el control de enfermedades de plantas. **Revista Digital Universitaria**, Coyoacán, v.16, n.11, p.1-15, 2015.
- RIOS, V. C.; CARO, C. J.; BERLANGA, R. D.; RUIZ, C. M.; ORNELAS, P. J.; SALAS, M. M.; VILLALOBOS, P. E.; GUERRERO, P. V. Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. **Revista Mexicana de Fitopatología**, Chapingo, v.34, n.1, p.84-99, 2016.

- RUIZ, C. M.; RIOS, V. C.; BERLANGA, R. D.; ORNELAS, P. J.; ACOSTA, M. C.; ROMO, C. A.; ZAMUDIO, F. P.; PÉREZ, C. D. Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, Mexico. **Revista Mexicana de Fitopatología**, Chapingo, v.35, n.3, p.437-462, 2017.
- RUIZ, S. E.; MEJÍA, B. M.; CRISTÓBAL, A. J.; VALENCIA, B. A.; REYES, R. A. Actividad antagónica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, Chapingo, v.5, n.7, p.1325-1332, 2014.
- SANMARTÍN, N. P.; LÓPEZ, X.; PEMBERTHY, M. P.; GRANADA, D.; RUEDA, E. A. Análisis del modo de acción y de la capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium* sp. **Revista Tumbaga**, Ibagué. v.2, n.7, p.29-49, 2012.
- SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**. Version 9.0. Cary, 2002.
- SIAP - Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. **Anuario estadístico de la producción agrícola**. Disponible em: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. Acceso em: 02. jun. 2017.
- UTKHEDE, R. S.; SHOLBERG, P. L. *In vitro* inhibition of plant pathogens by *Bacillus subtilis* and *Enterobacter aerogenes* and *in vivo* control of two postharvest cherry diseases. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.32, p.963-967, 1986.