

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS



AGENTES CAUSALES DE LA PUDRICIÓN DE FRUTO DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) EN NAYARIT, MÉXICO Y SU CONTROL BIOLÓGICO *IN VITRO*

CARLOS BRYAN CAMBERO AYÓN

Tesis presentada como requisito parcial para la obtención del grado de:
Maestría en Ciencias en el Área de Ciencias Agrícolas

Xalisco, Nayarit; Diciembre 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

CBAP/258/18.

Xalisco, Nayarit; 06 de diciembre de 2018.

ING. JOSÉ ERNESTO VILLANUEVA TREJO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Con base al oficio de fecha 05 de diciembre del presente, enviado por los **CC. Dr. Octavio Jhonathan Cambero Campos, Dr. Gregorio Luna Esquivel, Dr. Claudio Rios Velasco y M.C. Miguel Diaz Heredia**, donde se indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha finalizado con los demás requisitos que establece nuestra institución, se autoriza al **Ing. Carlos Bryan Cambero Ayón**, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias en el Área de Ciencias Agrícolas.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"Por lo Nuestro y lo Universal"

Dr. J. Diego García Paredes
Coordinador del Posgrado



C.c.p.- Expediente
&mefm

Unidad Académica de Agricultura. Carretera Tepic-Compostela Km. 9. C.P. 63780. Xalisco, Nayarit. Tels. (311)2-11-01-28 y 2-11-11-63 Posgrado (CBAP) 2-11-24 78.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT

Carretera Tepic-Compostela Km. 9
C.P. 63780, Xalisco, Nayarit
Tel: 211-01-28 y 211-11-63

Xalisco, Nayarit; 05 de diciembre de 2018.

Dr. Juan Diego García Paredes
Coordinador del Posgrado CBAP
PRESENTE:

Los que suscribimos, integrantes del Comité Tutorial del **Ing. Carlos Bryan Cambero Ayón**, declaramos que hemos revisado la tesis titulada: **“AGENTES CAUSALES DE LA PUDRICIÓN DE FRUTO DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) EN NAYARIT, MÉXICO Y SU CONTROL BIOLÓGICO *IN VITRO*”** y determinamos que la tesis puede ser presentada por el estudiante de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias, con opción terminal en Ciencias Agrícolas.

A T E N T A M E N T E:

COMITÉ TUTORIAL

Director de Tesis: Dr. Octavio Jhonathan Cambero Campos

JHONATHAN CAMBERO C.

Co- Director de Tesis: Dr. Gregorio Luna Esquivel



Asesor de Tesis: Dr. Claudio Rios Velasco



Asesor de Tesis: M.C Miguel Diaz Heredia



DEDICATORIAS

A mis padres: Carlos Cambero Campos y María Antonia Ayón Pérez por siempre creer en mí y apoyarme incondicionalmente a lo largo de mi vida.

A mi hermano: Milton Gibran Cambero Ayón por todo el apoyo brindado en mi carrera.

A mi compañera: Mónica Giselle Verdín Sánchez por apoyarme y siempre motivarme a salir adelante.

A mi familia: Por apoyarme de alguna u otra manera y creer en mi para lograr este objetivo.

A mis compañeros de equipo: Por su amistad y brindarme su apoyo a lo largo de mi estancia de maestría.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a la Universidad Autónoma de Nayarit y al Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias por el apoyo brindado a lo largo de este proyecto.

Al Proyecto apoyado por el “Fondo Sectorial de Investigación en Materia Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agrobiotecnología y Recursos Filogenéticos” Núm. 266891, por el financiamiento del proyecto para poder realizar la investigación.

A mi Comité Tutorial:

Por aceptar formar parte de este gran equipo, por todos los consejos que me ayudaron a lograr esto, por la amistad, confianza y la paciencia que tuvieron al dedicarme el tiempo necesario.

Dr. Octavio Jhonathan Cambero Campos

Dr. Gregorio Luna Esquivel

Dr. Claudio Rios Velasco

M. C. Miguel Diaz Heredia

Al Dr. Claudio Rios Velasco, a la M. C. María Fernanda Ruiz Cisneros y al gran equipo del Laboratorio de Fisiología de Poscosecha, Patología Vegetal y Control Biológico, del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Sede Chihuahua, campus Cuauhtémoc, por aceptarme, apoyarme y brindarme su amistad en todo momento para realizar mi estancia de investigación.

Al personal del Laboratorio de Parasitología Agrícola del Centro Multidisciplinario de Investigación Científica 03 (CEMIC 03) de la Universidad Autónoma de Nayarit.

A mis compañeros, ese gran equipo que se ha formado durante este tiempo, a la M. C. Marcia Rodríguez Palomera por esos consejos y gran apoyo que siempre me ha brindado, a Kevin G. Cambero Nava, por su apoyo, y a los que de alguna u otra manera me apoyaron en la construcción de este gran resultado.

¡Muchas Gracias!

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIAS	iv
AGRADECIMIENTOS	v
INDICE GENERAL	vi
RESUMEN	viii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	2
1.2 Hipótesis	3
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Importancia de la guanábana	4
2.2 Cultivo de guanábana en Nayarit	4
2.3 Problemática fitosanitaria de la familia Annonaceae en México	5
2.4 Problemática fitosanitaria de la guanábana en el mundo	5
2.5 Problemática fitosanitaria de <i>A. muricata</i> en Nayarit	6
2.6 Tipos de pudriciones en los cultivos	7
2.7 Métodos de control de enfermedades en frutales	7
2.7.1 Control cultural	8
2.7.2 Control químico	8
2.7.3 Control biológico	9
2.8 Generalidades de los Actinomicetos	9
2.9 Generalidades del género <i>Trichoderma</i>	10
2.10 Generalidades del género <i>Bacillus</i>	10
CAPÍTULO III. AGENTES CAUSALES DE LA PUDRICIÓN DE FRUTO DE GUANÁBANA (<i>Annona muricata</i> L.) EN NAYARIT, MÉXICO	11

CAPÍTULO IV. EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE ANTAGONISTAS CONTRA PATÓGENOS DE FRUTO DE GUANÁBANA (<i>Annona muricata</i> L.) EN NAYARIT, MÉXICO	29
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES	41
CAPÍTULO VI. LITERATURA CITADA	42
CAPÍTULO VII. APÉNDICE	48

RESUMEN

AGENTES CAUSALES DE LA PUDRICIÓN DE FRUTO DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) EN NAYARIT, MÉXICO Y SU CONTROL BIOLÓGICO *IN VITRO*

Carlos Bryan Cambero Ayón

El cultivo de guanábana puede verse afectado por diversas enfermedades, donde las de fruto, son las más importantes; sin embargo, en México, son pocos los estudios realizados para su diagnóstico en este frutal. Para el estado de Nayarit, se han registrado los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Lasiodiplodia theobromae* asociados a pudriciones secas y blandas de fruto, respectivamente, sin que hasta el momento se haya determinado el agente causal de cada pudrición. Con respecto al manejo de estas enfermedades, a la fecha no existen fungicidas registrados y/o autorizados por COFEPRIS para su uso en el cultivo de guanábana. Debido a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue identificar los patógenos causantes de la pudrición del fruto de guanábana en Nayarit, México y su control *in vitro* con aislados de *Streptomyces* spp., *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. Se realizaron muestreos durante el periodo de enero a noviembre de 2017 en los municipios de San Blas y Compostela. Se aislaron e identificaron a cinco género de hongos asociados a las pudriciones secas y cinco géneros de hongos a las pudriciones blandas, de los cuales se determinó mediante pruebas de patogenicidad en frutos de guanábana e identificación mediante sus caracteres moleculares que *Colletotrichum gloeosporioides* (clave de acceso KX960784.1) y *Pestalotiopsis* sp. (clave de acceso KX960814.1) son los causantes de las pudriciones secas, mientras que *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (clave de acceso MH062942.1) es responsable de las pudriciones blandas de fruto de guanábana en Nayarit, México. Por otra parte, en cajas de Petri con medio de cultivo Papa Destroxa Agar (PDA), se realizaron confrontaciones *in vitro* con los patógenos de fruto de *A. muricata*; se evaluaron tres cepas de *Streptomyces* (*S. viridochromogenes*, *S. tubercidicus*, *Streptomyces* sp.) tres de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum*) y tres de *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. methylotrophicus*, *B. amyloliquefaciens*) y se midieron diariamente con ayuda de un vernier digital, para posteriormente determinar el porcentaje de inhibición de

crecimiento radial (PICR). Las especies de *Streptomyces* presentaron un mayor PICR de los patógenos con hasta 100 %, sólo *S. viridochromogenes* presentó un 88.3 % de inhibición contra *L. pseudotheobromae*. Mientras que las cepas de *Trichoderma* mostraron diferente inhibición en los patógenos evaluados, *Trichoderma longibrachiatum* mostró el mayor PICR, 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 PICR más alto fue de 58.22 % con *B. methylotrophicus* contra *Pestalotiopsis* sp.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La guanábana (*Annona muricata* L.) (Magnoliales: Annonaceae) es un cultivo promisorio para su producción (Vidal *et al.*, 2014), ya que es popular como fuente de alimento, uso maderable para crear mangos de herramientas, así como antioxidante y medicina natural contra enfermedades oncológicas (Alonso *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2013). En México se cultiva en 10 estados, donde la mayor superficie se concentra en los estados de Nayarit (2,529 ha), Colima (380 ha), Michoacán (241 ha) y Guerrero (179 ha). Nayarit es el principal productor, donde destaca el municipio de Compostela con una superficie sembrada de 2,445 ha y volumen de producción de 21,157 t lo que representa el 97 % de la producción del estado (SIAP, 2017). Por otra parte, la familia Annonaceae es perjudicada por diversos insectos plaga (Vidal *et al.*, 2014a, b), sin embargo, las enfermedades son unas de las causas que generan gran pérdida en producción de cultivos al ser afectadas por enfermedades como: antracnosis por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., pudrición blanda por *Rhizopus stolonifer* (Ehreb.) Vuill., mancha negra de la hoja *Phyllosticta* sp., mancha del ápice de la hoja *Pestalotia* sp. y por los patógenos *Fusarium* sp. y *Phytophthora* sp. (Vidal *et al.*, 2014b). En el caso de la guanábana, se ve afectada por distintos patógenos como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. y Sacc., *C. acutatum* J. H. Simmond, *Fusarium chlamydosporum* Wollenweber y Reinking (Álvarez *et al.*, 2004; Alberto y Otones, 2016), *Rhizopus stolonifer* (Ehreb.) Vuill., *Aspergillus niger* P.E.L. van Tieghem y *Penicillium* sp. (Okigbo y Obire, 2009).

No obstante, una enfermedad se presenta en una planta cuando sus funciones se ven alteradas por organismos patógenos, y las características de estas alteraciones pueden ser muy diferentes según el patógeno y en ocasiones según el hospedero, en el caso de los frutos, se pueden presentar diferentes tipos de pudrición como, pudriciones blandas por *R. stolonifer* (Bautista y Bravo, 2004), pudriciones secas generadas por *Colletotrichum* spp. (Farrera *et al.*, 2007), así como pudriciones del pedúnculo atribuidas a los géneros *Lasiodiplodia*, *Neofusicocum* (Sandoval *et al.*, 2013) y *Colletotrichum* (Grisales *et al.*, 2016). Para el estado de Nayarit, Hernández *et al.* (2013) asociaron a *C. gloeosporioides* con pudriciones secas de fruto y *Lasiodiplodia theobromae* (Patouillard) Griffon y Maublanc con pudriciones blandas,

pero no se registraron como agentes causales de dichas pudriciones. En México, no existen fungicidas autorizados para su uso en el cultivo de guanábana por la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgo Sanitarios (COFEPRIS, 2018), por lo que los productores de este frutal, se ven en la necesidad de utilizar fungicidas registrados para otros cultivos. En la actualidad, las investigaciones se enfocan en la búsqueda de alternativas para el manejo de enfermedades fungosas de diferentes cultivos, donde se han realizado estudios *in vitro* con diferentes grupos de antagonistas, principalmente hongos del género *Trichoderma* (Bell *et al.*, 1982; Papavizas, 1982; Pereira *et al.*, 2010), bacterias del género *Bacillus* (Xiaohong *et al.*, 2011) y actinomicetos del género *Streptomyces* (Dávila *et al.*, 2013) con porcentajes de inhibición de crecimiento radial favorables. Debido a lo anterior y en la búsqueda de estrategias de manejo sustentables en el control de patógenos causantes de pudriciones en frutos de guanábana del estado de Nayarit, los objetivos del presente trabajo fueron:

1.1 Objetivos

General:

Identificar los patógenos causantes de la pudrición del fruto de guanábana en Nayarit y su posible control *in vitro* con aislados de *Streptomyces* spp., *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp.

Específicos:

1. Determinar la patogenicidad y virulencia de los agentes causales de la pudrición de frutos de guanábana.
2. Identificar morfológica y molecularmente a los agentes causales de las pudriciones del fruto de guanábana de los municipios de San Blas y Compostela, Nayarit.
3. Evaluar el efecto antagonista *in vitro* de *S. viridochromogenes*, *S. tubercidicus* y *Streptomyces* sp., *Trichoderma asperellum*, *T. longibrachiatum*, *T. harzianum*, *Bacillus*

subtilis, *B. methylotrophicus*, *B. amyloliquefaciens* contra los patógenos causantes de la pudrición de frutos de guanábana.

1.2 Hipótesis

Al menos dos especies de hongos son los responsables de la pudrición de frutos de la guanábana en los municipios de San Blas y Compostela, Nayarit con diferente grado de virulencia.

Las especies de los géneros *Streptomyces*, *Trichoderma* y *Bacillus* causan inhibición *in vitro* sobre los agentes causantes de la pudrición de frutos de guanábana.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia de la guanábana

El centro de origen de la guanábana se ha considerado desde la región del Caribe, Guatemala y el sur de México, y se ha distribuido a países de Asia, África, así como a zonas de Venezuela, Brasil y Colombia (Jiménez *et al.*, 2016); sin embargo, en el Continente Americano, México es un importante productor de este frutal, ya que cuenta con una superficie plantada de 3,527.43 ha, de las cuales, se obtiene una producción de 28,853.66 t (SIAP, 2017).

Su importancia económica radica en la amplia variedad de usos que se le puede dar a este frutal, como una fuente de alimento (pulpa, jugos, helados, gelatinas, paletas, mermeladas), para cercos vivos, leña, utilización de madera para elaborar herramientas de trabajo (Hernández *et al.*, 2013), como insecticida biológico con resultados favorables (Hincapié *et al.*, 2008; González *et al.*, 2013) como antioxidante, y como medicina natural; este último es el de mayor importancia ya que se utiliza para contrarrestar enfermedades oncológicas (Alonso *et al.*, 2011).

2.2 Cultivo de guanábana en Nayarit

La guanábana es uno de los frutales de mayor importancia económica para Nayarit después del aguacate (*Persea americana* Mill.) y del mango (*Mangifera indica* L.), ya que acuerdo con los datos obtenidos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), Nayarit es el principal productor de *A. muricata* en México, con una superficie establecida de 2,529.24 ha, lo que representa el 71.7 % de la superficie nacional, así mismo una producción de 21,810 t; mientras que el resto de la superficie y producción se encuentra en el estado de Colima (380.67 ha y 2,986 t), Michoacán (241 ha y 1,395 t), Guerrero (179 ha y 1,062 t), Veracruz (83.5 ha y 954 t), Puebla (49 ha y 198 t) Tabasco (42 ha y 309 t), Jalisco (12 ha y 65 t), Campeche (8 ha y 44 t) y Morelos (2.3 ha y 2.30 t).

En Nayarit se produce guanábana de manera comercial en cuatro municipios, de las 2,529 ha establecidas, el 96.64 % corresponde a Compostela con 2,445 ha y 21,157 t producidas,

mientras que San Blas es el segundo municipio de mayor importancia al aportar una producción de 443 t en 52 ha, lo sigue Bahía de Banderas con 14 ha y 61 t, Tepic con 12 ha y 97 t y Xalisco con 6 ha y 51 t (SIAP, 2017).

2.3 Problemática fitosanitaria de la familia Annonaceae en México

Las plagas y enfermedades son unas de las causas de pérdida de producción más importantes en la agricultura. La producción de las anonáceas se ve limitada por diversos problemas fitosanitarios, donde destacan los insectos plaga, tales como: *Cerconota anonella* (Sepp) (Lepidoptera: Oecophoridae), *Talponia batesi* Henrich (Lepidoptera: Tortricidae), *Acanthocephala femorata* (F.) (Hemiptera: Coreidae), *Thecla ortygnus* Cramer (Lepidoptera: Lycaenidae), *Membracis mexicana* (Guerin) (Hemiptera: Cercopidae), *Saissetia* sp. (Hemiptera: Coccidae), *Optatus palmaris* Pascoe (Coleoptera: Curculionidae), Pyralidae (Lepidoptera) así como por *Bephratelloides cubensis* Ashmead (Hymenoptera: Eurytomidae) considerada esta última una de las plagas de mayor importancia por su alta incidencia en estos frutales (Vidal *et al.*, 2014a, b). Sin embargo, también son afectadas por enfermedades especialmente fúngicas, como la antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, pudrición blanda por *Rhizopus stolonifer*, mancha negra de la hoja por *Phyllosticta* sp., mancha del ápice de la hoja causada por *Pestalotia* sp., y afectados también por los hongos *Fusarium* sp. y *Phytophthora* sp. (Vidal *et al.*, 2014b).

2.4 Problemática fitosanitaria de la guanábana en el mundo

La guanábana se ve perjudicada por una amplia diversidad de insectos plaga como el áfido negro de los cítricos *Toxoptera aurantii* Fonscolombe (Hemiptera: Aphididae), escama blanca de la guanábana *Pinnaspis strachani* (Cooley) (Hemiptera: Diaspididae), cochinilla harinosa de los cítricos *Planococcus citri* (Risso) (Hemiptera: Pseudococcidae), *Cratosomus* sp. (Coleoptera: Curculionidae) (Coto y Saunders, 2001), el descortezador del tallo del guanábano *Chrysobothris* spp. (Coleoptera: Buprestidae), chinche de encaje *Corythucha gossypii* (Fabricius) (Hemiptera: Tingidae), pulgones, hormigas (Vidal *et al.*, 2014b), el barrenador de la semilla *Bephratelloides cubensis* (Hernández *et al.*, 2014), palomilla barrenadora de frutos

Cerconota anonella, picudo de las anonáceas *Optatus palmaris*, barrenador de frutos *Oenomaus ortygnus* (Cramer) (Lepidoptera: Lycaenidae), cochinilla rosada del hibisco *Maconellicoccus hirsutus* (Green) (Hemiptera: Pseudococcidae), gusano rayado *Gonodonta pyrgo* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) (Hernández *et al.*, 2013), *Acantocephala femorata* Fab. (Hemiptera: Coreidae), *Pseudococcus citri* Rossi. (Hemiptera: Pseudococcidae), *Thecla ortygnus* Cramer (Lepidoptera: Lycaenidae), *Membracis mexicana* Guerin. (Hemiptera: Membracidae), *Saissetia* sp. (Hemiptera: Coccidae), (Illescas, 2009; Vidal *et al.*, 2014b) y *Euphoria leucographa* (Gory y Percheron) (Coleoptera: Melolonthidae) (Cambero *et al.*, 2017).

Por otra parte, son pocos los estudios realizados para el diagnóstico de enfermedades en este frutal, a pesar del gran impacto económico debido a las pérdidas que ocasionan en la producción, investigaciones realizadas asocian a *Rossellinia* sp. y *Phytophthora* sp. con pudrición radicular (Baraona y Sancho, 1992), al hongo *C. gloeosporioides* como agente causal de la antracnosis en tallo, hojas e inflorescencias (Álvarez *et al.*, 2004), y en lo correspondiente a pudriciones de fruto, asocian a *Phytophthora* sp. con las manchas en fruto (Baraona y Sancho, 1992), así como a *R. stolonifer*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *Fusarium chlamydosporum*, a pudriciones de fruto (Okigbo y Obire, 2009; Alberto y Otones, 2016).

2.5 Problemática fitosanitaria de *A. muricata* en Nayarit

En estudios realizados en las zonas productoras de guanábana de los municipios de San Blas y Compostela Nayarit, Cham *et al.* (2018) registraron un gran número de especies de insectos con hábitos fitófagos que incluye a *O. palmaris*, *E. leucographa*, *Aphis spiraecola* (Patch) (Hemiptera: Aphididae), *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonscolombe) (Hemiptera: Aphididae), *Saissetia hemisphaerica* (Targioni-Tozzetti) (Hemiptera: Coccidae), *Aulacaspis* sp., *Pinnaspis* sp. (Hemiptera: Diaspididae), *Guayaquila* sp. (Hemiptera: Membracidae), *Leioscyta spiralis* (Haviland) (Hemiptera: Membracidae), *Membracis dorsata* (Fabricius) (Hemiptera: Membracidae), *M. mexicana* (Guérin-Méneville) (Hemiptera: Membracidae), *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) (Hemiptera: Pseudococcidae), *Ferrisia virgata* (Cockerell) (Hemiptera: Pseudococcidae), *M. hirsutus*, *Planococcus citri* (Risso) (Hemiptera:

Pseudococcidae), *Planococcus* sp. (Hemiptera: Pseudococcidae), *Corythucha gossypii*, *Corythucha* sp., *B. cubensis*, *Thecla ortygnus*, *G. pyrgo* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) y *Cerconota anonella*.

En Nayarit, a pesar de ser el principal productor de guanábana en México, los estudios realizados no se han centrado en diagnósticos puntuales de enfermedades, sin embargo, Hernández *et al.* (2013) asocian a la especie *C. gloeosporioides* con la antracnosis de flores, hojas y frutos, y a *L. theobromae* con la muerte descendente de árboles, así como a daño en ramas, tallos y pudrición blanda del fruto.

2.6 Tipos de pudriciones en los cultivos

Una enfermedad se presenta en una planta cuando sus funciones se ven alteradas por organismos patógenos (hongos, virus, bacterias, entre otros), las características de las enfermedades pueden ser diferentes según el agente causal y en ocasiones según la planta hospedera. En los frutos, pueden presentarse sintomatologías diferentes, como pudriciones o manchas dependiendo del agente causal. Las enfermedades generan importantes pérdidas económicas, ya que al estar presente una de ellas, el productor se ve obligado a realizar gastos en aplicaciones para controlar la enfermedad para evitar pérdidas (Agrios, 1998), el monto de las pérdidas generadas por las enfermedades varía desde porcentajes bajos hasta pérdidas del 100 % (Hernández *et al.*, 2013). Existen diferentes tipos de pudriciones en los cultivos, como las pudriciones blandas bacterianas ocasionadas por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* y *E. chrysanthemi* (Franco, 2008), pudriciones blandas causadas por hongos como *R. stolonifer* (Bautista y Bravo, 2004), pudriciones secas generadas por *Colletotrichum* spp. (Farrera *et al.*, 2007), así como pudriciones del pedúnculo atribuidas a los hongos de los géneros *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum* (Sandoval *et al.*, 2013) y *Colletotrichum* (Grisales *et al.*, 2016).

2.7 Métodos de control de enfermedades en frutales

A pesar de que el estado de Nayarit es el principal productor de *A. muricata* en México, el cultivo es considerado emergente, motivo por el cual, no existe información detallada y

documentada sobre el manejo de enfermedades. Sin embargo, los productores de este frutal, utilizan métodos de control que han adoptado de otros frutales de la zona, como el mango (*M. indica*), el aguacate (*P. americana*) yaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) limón (*Citrus latifolia* Tan.), entre otros. Ante esta situación, actualmente está en desarrollo un proyecto denominado “Aprovechamiento del Germoplasma, Desarrollo Tecnológico e Innovación en Cadenas de Valor de Anonáceas en México”, el cual está financiado por el “Fondo Sectorial de Investigación en Materia Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agrobiotecnología y Recursos Filogenéticos” Núm. 266891. El cual busca generar esta información y transferirla a los productores.

2.7.1 Control cultural

Este método de control consiste en la aplicación de prácticas agrícolas comunes, para la prevención de daños por plagas y enfermedades, o hacer el ambiente menos favorable para la proliferación de estos; un claro ejemplo de control cultural contra enfermedades, es la eliminación de frutos u otro órgano dañado de la planta para que no sirvan como fuente de inóculo (Becerra y Rosas, 2015).

2.7.2 Control químico

Actualmente, es el método más utilizado para el manejo de plagas y enfermedades de los cultivos, sin embargo, la utilización de plaguicidas contamina el medio ambiente al transportarse por las corrientes de aire y viento, ya que la mayoría son volátiles, pero a pesar de que las plagas y enfermedades no necesitan un alto consumo o contacto del plaguicida y/o fungicida, el humano usa cantidades superiores a lo requerido sin considerar el daño al ambiente que se está generando (Pimentel, 1995). El cultivo de guanábana no es la excepción, donde el uso de moléculas químicas es el método más utilizado para combatir las plagas y enfermedades, sin embargo, en México no existen fungicidas autorizados para su uso en este frutal por la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) (COFEPRIS, 2018).

2.7.3 Control biológico

Este método de control consiste en el uso de organismos vivos como controladores de plagas; varios tipos de microorganismos han sido utilizados en el control biológico, como las bacterias, virus, hongos, nemátodos y protozoarios (Barrera, 2016). El control microbial mediante la utilización de microorganismos, es una alternativa para el manejo de fitopatógenos, siendo una práctica más eficiente e inocua en el desarrollo de una agricultura sostenible (Pérez *et al.*, 2015). La búsqueda de agentes de control biológico se ha centrado principalmente en los géneros *Trichoderma*, *Bacillus* y *Streptomyces* con excelente potencial de biocontrol (Chavarría *et al.*, 2005; Zavaleta *et al.*, 2015).

2.8 Generalidades de los Actinomicetos

La mayoría de los actinomicetos, particularmente *Streptomyces*, son microorganismos saprófitos, que viven en el suelo y que pasan la mayoría de su vida como esporas semidormantes, aún si los nutrientes del suelo llegarán a ser deficientes (Mayfield *et al.*, 1972; Alt *et al.*, 2016). Este amplio grupo cuenta con un olor característico a tierra mojada, esto se debe a su actividad metabólica y a la producción de terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares con las que son capaces de degradar materia orgánica de origen vegetal y animal (Ezziyyani *et al.*, 2004). También son microorganismos prometedores para su uso en biofertilización, ya que no afectan a los otros microorganismos que se encuentran situados en la rizosfera, lo que mantiene un equilibrio (Franco, 2009). Este grupo de microorganismos en su mayoría son formadores de compuestos antifúngicos y capaces de hacer tóxico al medio para los patógenos en donde se encuentran, lo que puede ocasionar una muerte local o vuelve incultivable las hifas de los hongos fitopatógenos en otro medio de cultivo libre de estos metabolitos (Yuan y Crawford, 1995). Se han realizado estudios *in vitro* de actinomicetos contra hongos fitopatógenos de importancia económica como *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp. y *Rhizoctonia* sp. (Dávila *et al.*, 2013), así como *Streptomyces* spp. con resultados favorables en contra de hongos aislados de raíces como *Fusarium equiseti* (Pérez *et al.*, 2015).

2.9 Generalidades del género *Trichoderma*

Trichoderma es uno de los géneros de hongos antagonistas más estudiados en el control biológico de enfermedades. Estos hongos tienen diversas cualidades que lo hacen atractivos como microorganismos benéficos para el control de fitopatógenos, ya que producen enzimas (quitinasas, celulasas y glucanasas) degradadoras de la pared celular de hifas de otros hongos y antibióticos, presentan una esporulación abundante y rápida colonización de su hábitat; además, de ser cosmopolita, de fácil aislamiento e incremento en diversos sustratos, plasticidad ecológica, efecto estimulante sobre los cultivos e inductores de resistencia sistémica en la planta a diferentes patógenos (Rey *et al.*, 2000; Harman, 2004; Zavaleta *et al.*, 2015). Su gran potencial como agentes de control biológico ha sido demostrado contra diversos fitopatógenos tales como *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizopus*, *Sclerotium*, *Phytophthora*, *Colletotrichum*, entre otros, debido a su amplio espectro de antagonismo (Michel *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2010; Sanmartín *et al.*, 2012; Estrada *et al.*, 2016).

2.10 Generalidades del género *Bacillus*

Las bacterias del género *Bacillus* son ampliamente utilizadas para el control de fitopatógenos presentes en suelo y raíces (Ruiz *et al.*, 2014b). Son cosmopolitas, las podemos encontrar en aguas dulce y marina, suelo, y asociadas a plantas. Su potencial como agente de control biológico de fitopatógenos se ha demostrado ampliamente, dado su producción de antibióticos (fengicina, zwitermicina A) y enzimas (quitinasas, hidrolasas, proteasas) responsables de la inhibición del crecimiento de patógenos (Tejera *et al.*, 2011). Diversos autores recomiendan la utilización de *B. subtilis* para el control biológico de diferentes fitopatógenos, tales como *Cercospora kikuchii*, *C. beticola*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* (Carreras, 2011), *R. stolonifer* (Xiaohong *et al.*, 2011) y *C. gloeosporioides* (Ruiz *et al.*, 2014b), o las bacterias *B. amyloliquefaciens* y *B. methylotrophicus* contra *Phytophthora cactorum* (Ruiz *et al.*, 2017), ya que son inocuas a humanos, animales o plantas, y por producir moléculas bioactivas con capacidad antimicrobiana (Sarti y Miyazaki, 2013).

CAPÍTULO III

AGENTES CAUSALES DE LA PUDRICIÓN DE FRUTO DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) EN NAYARIT, MÉXICO

CAUSAL AGENTS OF THE ROT OF FRUIT SOURSOP (*Annona muricata* L.) IN NAYARIT, MEXICO

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

¹Programa de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit, Xalisco, Nayarit, México. Carretera Tepic-Compostela Km. 9. C.P. 63155. Tel: (311) 2111163. ²Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit, Xalisco, Nayarit, México. Carretera Tepic-Compostela Km. 9. ³Programa de Doctorado en Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit, Xalisco, Nayarit, México. Carretera Tepic-Compostela Km. 9. C.P. 63155. Tel: (311) 2111163. ⁴Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Campus Cuauhtémoc, Chihuahua. Av. Río Conchos S/N, Parque Industrial. C.P. 31570, Cuauhtémoc, Chihuahua, México.

Autor Corresponsal: Octavio Jhonathan Cambero-Campos. Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit, Xalisco, Nayarit, México. Carretera Tepic-Compostela Km. 9. e-mail: jhony695@gmail.com

Cite this paper: Cambero-Ayón, C. B., Luna-Esquivel, G., Rios-Velasco, C., Díaz-Heredia, M., Rodríguez-Palomera, M., Betancourt-Aranguré, A. and Cambero-Campos, O. J. (2019). Causal agents of rot in Soursop fruit (*Annona muricata* L.) in Nayarit, Mexico. Revista Bio Ciencias 6, e538. doi: <http://doi.org/10.15741/revbio.06.01.01/>

Resumen. El estado de Nayarit es el principal productor de *Annona muricata* en México, sin embargo, la producción estatal se ve afectada por pudriciones de fruto y hasta el momento no se ha determinado el agente causal. El objetivo del presente trabajo fue identificar a él o los

agentes causales de las pudriciones de fruto de guanábana en el estado, para lo cual se realizaron muestreos durante el año 2017 en los municipios de San Blas y Compostela. Se aislaron e identificaron a cinco género de hongos asociados a las pudriciones secas y cinco géneros de hongos a las pudriciones blandas, de los cuales se determinó mediante pruebas de patogenicidad en frutos sanos de guanábana y posteriormente con identificación molecular que *Colletotrichum gloeosporioides* (clave de acceso KX960784.1) y *Pestalotiopsis* sp. (clave de acceso KX960814.1) son los causantes de las pudriciones secas, mientras que el hongo *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (clave de acceso MH062942.1) es responsable de las pudriciones blandas de fruto de guanábana en Nayarit, México.

Palabras clave: aislado, hongos fitopatógenos, pruebas de patogenicidad.

Abstract. The state of Nayarit is the main producer of *Annona muricata* in Mexico, however, the state production is affected by fruit rots and until now the causal agent has not been determined. The objective of this work was to identify the causal agent (s) of the soursop fruit rots in the state, for which samplings were carried out during the year 2017 in the municipalities of San Blas and Compostela. Five fungal species associated with dry rot and five genera of soft rot fungi were isolated and identified by pathogenicity tests on healthy soursop fruits and later with molecular identification than *Colletotrichum gloeosporioides* (access code KX960784.1) and *Pestalotiopsis* sp. (access code KX960814.1) are the cause of dry rot, while the fungus *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (access code MH062942.1) is responsible for the soft rot of fruit soursop in Nayarit, Mexico.

Keywords: isolated, phytopathogenic fungi, pathogenicity tests.

Introducción

La guanábana (*Annona muricata* L.) (Magnoliales) es una de las especies más importantes del género *Annona* (Jiménez *et al.*, 2016). En México, se cuenta con una producción anual de 28 853 t distribuidas en una superficie de 3 527 ha, donde el estado de Nayarit es el principal productor al concentrar el 71.7 % de la producción nacional con 2 529 ha (SIAP, 2017).

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

Materiales y Métodos

Área de estudio y recolecta de material biológico

Se realizaron muestreos en un total de 10 huertos comerciales ubicados en los municipios de Compostela y San Blas, Nayarit (Cuadro 1), de los cuales, se visitaron dos veces a huertos

diferentes mensualmente durante el periodo de enero a noviembre de 2017, donde se recolectaron frutos de guanábana con diferente grado de madurez fisiológica que presentaban síntomas de pudrición seca (96 frutos) y pudrición blanda de fruto (23 frutos) (Apéndice A1). Los frutos enfermos se colocaron de manera individual en bolsas de papel y se trasladaron a temperatura ambiente al Laboratorio de Parasitología Agrícola del Centro Multidisciplinario de Investigación Científica (CEMIC 03) de la Universidad Autónoma de Nayarit (UAN) en donde se almacenaron a 0 °C hasta su procesamiento.

Cuadro 1.

Huertos de guanábana muestreados en Nayarit, México, 2017.

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

Aislamiento y purificación de microorganismos asociados a las pudriciones en frutos

Los frutos con síntomas de pudrición seca y pudrición blanda de fruto, se lavaron previamente con agua corriente; posteriormente se cortaron trozos de 5 a 10 mm² de la zona de transición (margen de la lesión de avance de la enfermedad) y se desinfectaron con una solución de NaClO al 2 % por tres minutos; en una campana de flujo laminar (TELSTAR AH-100) se

enjuagaron los trozos obtenido con agua destilada estéril (ADE) tres veces y se secaron a temperatura ambiente sobre papel absorbente, y se sembraron cuatro en cada caja de Petri (90 x 15 mm) con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) de forma equidistante, mismas que se mantuvieron en incubación en una cámara NOVATECH Ei45 a 28 °C para la obtención de los hongos fitopatógenos (Villanueva *et al.*, 2008).

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

Identificación morfológica de microorganismos

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

Pruebas de patogenicidad y grados de virulencia

De cada género de hongo aislado se obtuvo una suspensión de conidios, a los cuales, se les agregó a la caja de Petri 10 ml de ADE y 5 µl de Tween 80 y se procedió a raspar el micelio con ayuda de un asa estéril, la suspensión obtenida se filtró con ayuda de una gasa estéril. El conteo de conidios se realizó con ayuda de una cámara de recuento Neubauer-improved (MARIENFELD®) y un microscopio compuesto (Ruiz *et al.*, 2011). Posteriormente se inocularon frutos de guanábana aparentemente sanos con el fin de reproducir el síntoma del que fue aislado y descubrir el agente causal de la pudrición. Para ello, se recolectaron frutos con apariencia sana de guanábana de tamaño de 6.21 cm de diámetro por 8.25 cm de longitud hasta un tamaño alrededor de 20 cm de longitud y 15 cm de diámetro para las pudriciones secas, en el caso de las pudriciones blandas se recolectaron frutos sanos de 6.5 cm de diámetro y 10 cm

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

En la campana de flujo laminar los frutos de guanábana fueron inoculados sin herida (seis repeticiones y seis testigos) y con una herida superficial (seis repeticiones y seis testigos) (Apéndice A2) en la epidermis de aproximadamente 15 mm de longitud y 5 mm de profundidad, la cual se realizó con ayuda de un bisturí estéril, y con la ayuda de una micropipeta Finnpiette® se les agregó 10 µl de la suspensión de conidios de acuerdo con la esporulación de cada aislado, se usaron concentraciones de cada uno de los géneros en un rango de los 11 200 conidios/mL a 1 000 000 conidios/mL. En el caso de los hongos aislados de pudrición blanda, la inoculación se realizó con una suspensión de 0.5 cc con 11 200 conidios/mL con ayuda de una jeringa hipodérmica que se infiltró en el receptáculo floral a una distancia de 1 cm del pedúnculo (siete repeticiones y 7 testigos) (Apéndice A2). Primero se inocularon los testigos con agua destilada estéril y posteriormente se inocularon los hongos aislados de cada síntoma para evitar contaminación cruzada. Los frutos inoculados se incubaron en una cámara bioclimática (Thermo Scientific) a 28 °C y un fotoperiodo 12:12 luz/oscuridad, se revisaron sistemáticamente cada 24 h por 10 d para registrar la sintomatología y medir el grado de avance de la pudrición (virulencia) con ayuda de un vernier digital (Truper Herramientas S.A de C.V). Para confirmar la identidad del microorganismo inoculado, se realizó un re-aislamiento y se verificó que coincidiera con el que se inoculó (Dinh *et al.*, 2003; Fraire *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2003; Than *et al.*, 2008).

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

Para la identificación molecular de los hongos positivos a las pruebas de patogenicidad, se extrajo el ADN genómico (ADNg), para lo anterior, se colocó un explante del hongo purificado en cajas de Petri con medio PDA y se incubó a 28 °C por 7 d. Con la ayuda de una

espátula estéril se recolectó el micelio, el cual se colocó en un mortero de porcelana estéril con un amortiguador [200 nM Tris-HCl (pH=8), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS] a 70 °C (Ruiz *et al.*, 2017), se maceró y la extracción se realizó de acuerdo con Raeder y Broda (1985). El ADNg fue visualizado por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % y se utilizó para amplificar el espaciador transcrito interno (ITS4 e ITS5) del ADNr los cebadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990; Ruiz *et al.*, 2017). Para la amplificación, se emplearon las siguientes condiciones, una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 60 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 10 min (Ruiz *et al.*, 2017). La amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1 % mediante electroforesis (Ochoa *et al.*, 2012). Posteriormente, los productos de PCR fueron secuenciados por la empresa Macrogen (Rockville, Maryland, EUA). Las secuencias resultantes, se compararon con las reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2018) mediante el programa BLAST (Altschu *et al.*, 1990) para verificar el porcentaje de identidad correspondiente a las especies identificadas.

Resultados y discusión

Descripción de síntomas de pudriciones de fruto en campo

Los síntomas de pudriciones secas y blandas se encuentran en las huertas distribuidas de manera irregular, independientes o asociadas. Sin embargo, los frutos con pudriciones secas se pueden encontrar en diferente tamaño (a partir de 6 cm de diámetro y 8 cm de longitud), las pudriciones aparecen en cualquier parte de la epidermis de los frutos, como manchas ligeramente hundidas de 2 a 3 mm de diámetro que pueden desarrollarse de manera independiente o unirse para formar pudriciones de hasta 10 cm de un color marrón a negro (Figura 1a). El síntoma puede abarcar hasta 10 mm, pero cuando se asocia a *B. cubensis* la profundidad varía en función a la posición de la semilla de donde emerge el adulto de la plaga (Figura 1b), en algunas ocasiones se pueden observar acérvulos sobre el necrosamiento. Los frutos logran madurar de manera irregular a pesar de la pudrición. En el caso de las pudriciones

blandas de fruto, los síntomas aparecen inicialmente en el receptáculo floral, posteriormente la pudrición avanza a la pulpa y a la cáscara del fruto, en un estado avanzado de pudrición, la cáscara se torna de color café y la pulpa y receptáculo floral se comienzan a teñir de un color negro intenso (Figura 1c), los frutos se momifican y no logran llegar a su madurez fisiológica y se quedan adheridos al árbol, lo que se confunde en la mayoría de los casos con un aborto de fruto. Muchos de los frutos momificados presentan acérvulo por parte de *Colletotrichum* sp.

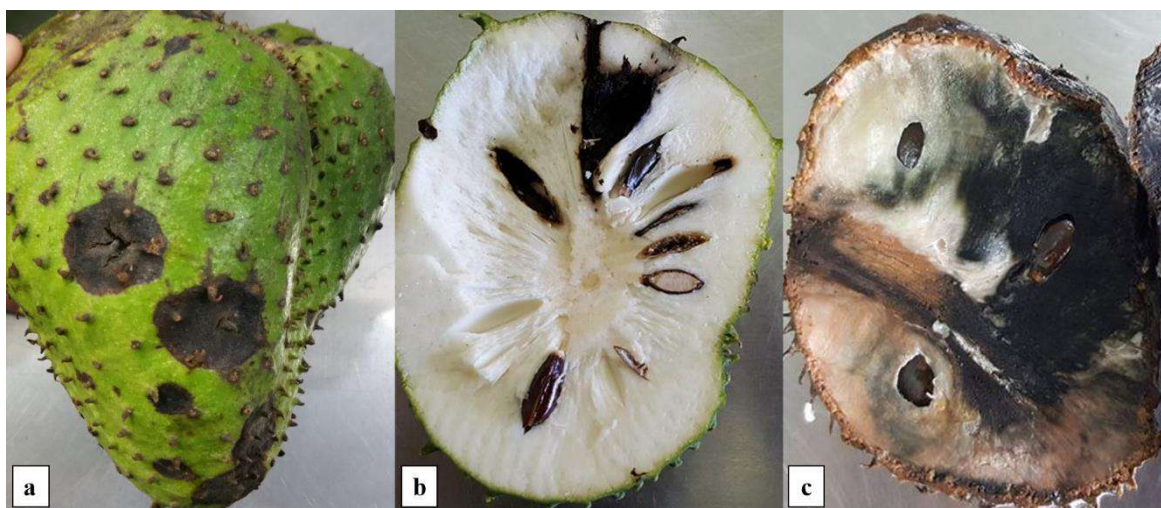


Figura 1. Frutos de guanábana recolectados en campo con síntomas de pudrición, a) Pudrición seca, b) Pudrición asociada con *Bephratelloides cubensis*, c) Pudrición blanda de fruto.

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

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

Pruebas de patogenicidad

De los cinco géneros de hongos aislados de los síntomas de pudrición seca, sólo *Pestalotiopsis* sp. y *Colletotrichum* sp. resultaron positivos a las pruebas de patogenicidad. El hongo *Pestalotiopsis* sp. fue 100 % patogénico con herida (Apéndice A3) y 0 % sin herida (Apéndice A4), la virulencia que alcanzó en 7 días después de la inoculación (ddi) fue de 3.91 mm, lo que indicó que el hongo sólo causa la enfermedad con daño mecánico y aunque no resultó tan agresivo, la enfermedad puede ser causa de pérdida postcosecha de frutos. En el caso de *Colletotrichum* sp., fue 100 % patogénico con herida (Apéndice A5) y 83 % sin herida (Apéndice A6), la virulencia que alcanzó en el décimo ddi fue de 7.36 mm y 3.69 mm respectivamente. Por otra parte, de los cinco géneros aislados de los síntomas de pudrición blanda, sólo el hongo *Lasiodiplodia* sp. causó pudrición en 100 % de los frutos inoculados (Apéndice A7). La virulencia que alcanzó en 6 ddi fue de 9.6 cm, lo que indicó que es demasiado agresivo.

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

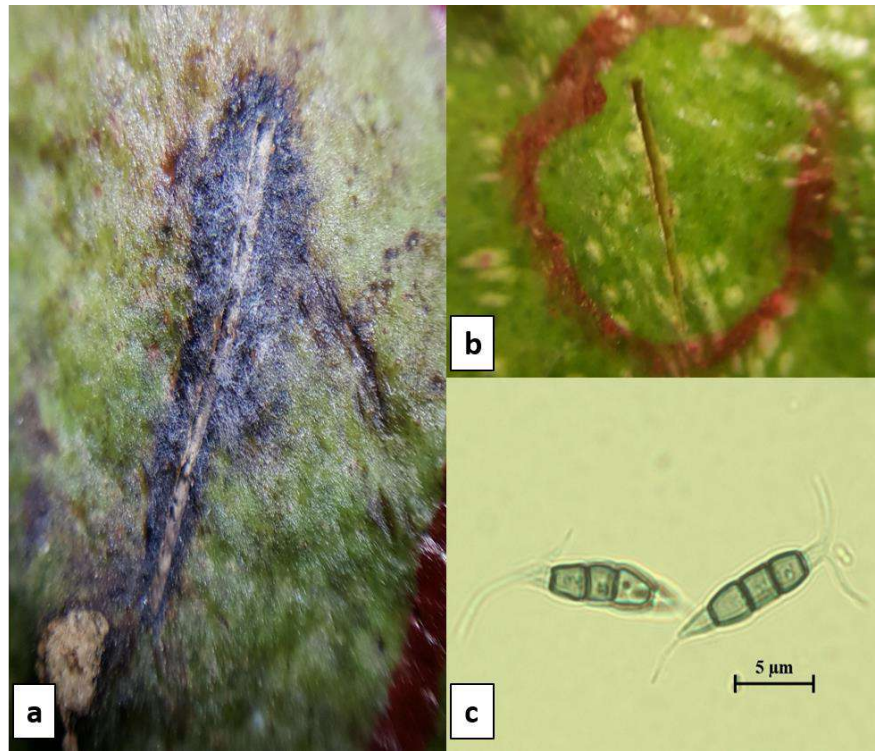


Figura 2. a) Síntomas de pudrición seca por *Pestalotiopsis* sp., b) Fruto de guanábana testigo, c) Conidios de *Pestalotiopsis* sp.

Los síntomas generados por el hongo *Colletotrichum* sp. en las repeticiones sin herida aparecieron al cuarto día después de inoculado, la lesión sólo fue superficial con una consistencia seca; para las repeticiones con herida, los síntomas se mostraron al segundo ddi, donde el avance de la pudrición también fue en la pulpa, las lesiones se tornaron de un color café intenso, con una consistencia dura y seca, con una apariencia necrótica y no hubo presencia de micelio por parte del patógeno (Figura 3).

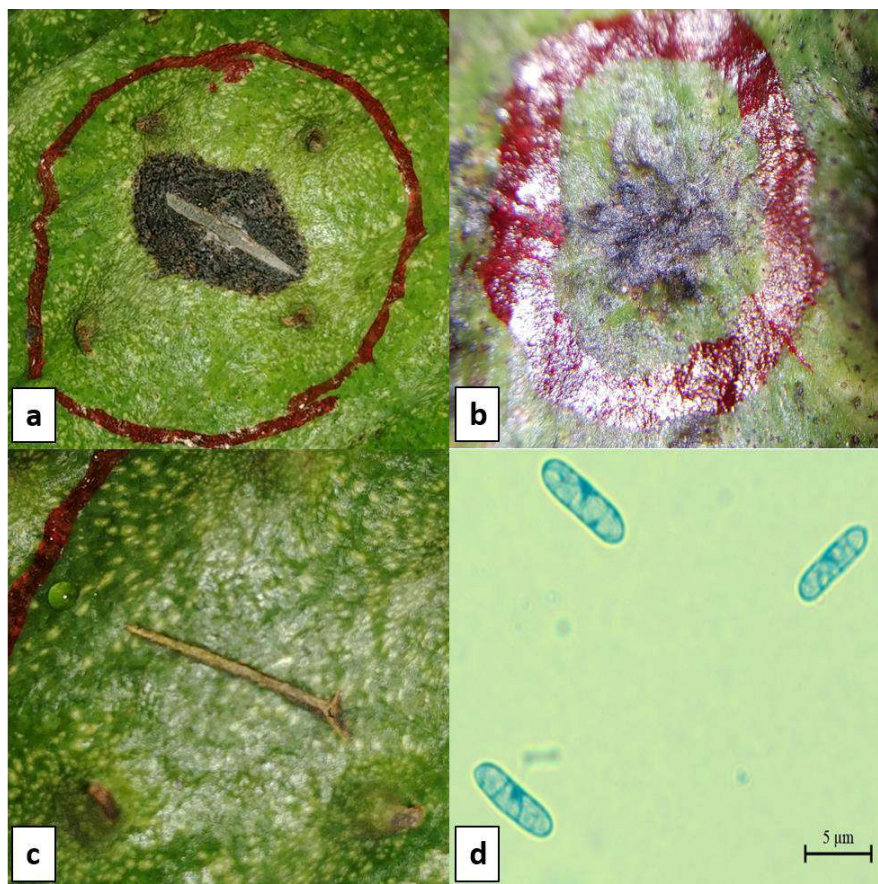


Figura 3. a) Síntoma de pudrición seca con herida por *Colletotrichum* sp. b) Síntoma de podredumbre seca sin herida, c) Fruto de guanábana testigo, d) Conidios correspondiente a *Colletotrichum* sp.

Los síntomas generados por *Lasiodiplodia* sp., aparecieron al tercer día después de la inoculación, desde la base del receptáculo floral se notó un reblandecimiento en la zona, y para el día seis, el fruto se puso blando totalmente y aparecieron manchas café claro por todo el pericarpio, en el día nueve la cascara se momificó totalmente y tomó un color café intenso, para el día 10, la pulpa del fruto era blanda y comenzó a tomar un color negro (Figura 4).

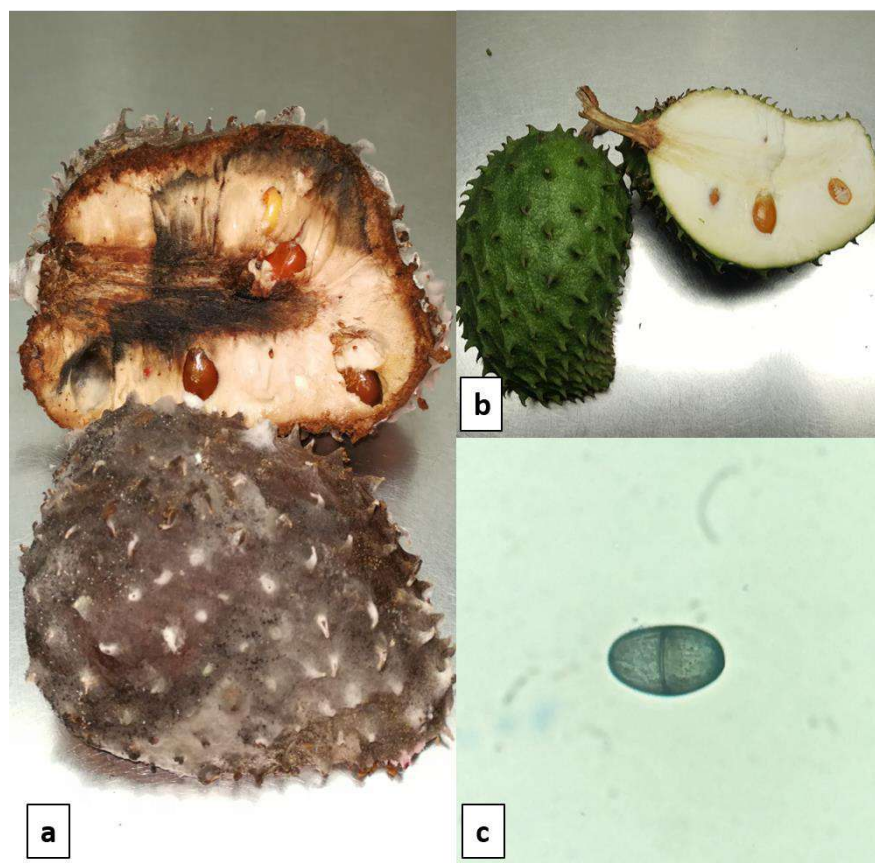


Figura 4. a) Síntomas de pudrición blanda por *Lasiodiplodia* sp., b) Fruto de guanábana testigo, c) Conidio de *Lasiodiplodia* sp.

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

daños en frutos de guanábana en Nayarit, México. Montiel (1997) registró a *Pestalotiopsis* sp. como agente causal de la necrosis de fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.) en Venezuela. En Nayarit, Hernández *et al.* (2013) asociaron a *L. theobromae* como responsable de la pudrición blanda de fruto de guanábana, sin embargo, en esta investigación se encontró a *L. pseudotheobromae* como el agente causal de la pudrición blanda de fruto y es el primer registro para Nayarit, México. Nweke y Ibiam (2012) indicaron que esta pudrición en guanábana es causada por *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer* en Nigeria; mientras que Sandoval *et al.* (2013) mencionaron que *L. pseudotheobromae* es el responsable de la muerte descendente de ramas y se asocia a la pudrición de pedúnculo de mango (*Mangifera indica* L.) cultivados en la Costa del Pacífico en México. Por otra parte, Awan y Akgül (2016) determinaron que *L. pseudotheobromae* es un patógeno postcosecha altamente virulento en limón (*Citrus limon* L. Burm. f.) al dañar aproximadamente del 40 al 50% del área de la fruta después de 5 días de inoculación en Turquía.

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

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

Con base a los caracteres moleculares de los hongos causantes de las pudriciones de frutos en guanábana, se identificaron a *Pestalotiopsis* sp. con un 99 % de identidad con la cepa Cef-S6 (clave de acceso KX960814.1), *Colletotrichum gloeosporioides* con 99 % de identidad con la cepa Bpf-2 (clave de acceso KX960784.1) y *Lasiodiplodia pseudotheobromae* con 99 % de identidad con la cepa CEF-9 (clave de acceso MH062942.1) (NCBI, 2018).

Conclusión

Los hongos *Pestalotiopsis* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides* son los agentes causales de la pudrición seca en frutos de guanábana, mientras que, *Lasiodiplodia pseudotheobromae* es

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

Agradecimientos

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

Referencias bibliográficas

- Agrios, G. (1998). *Fitopatología, Tercera edición México*. Editorial Limusa.
- Alberto, R. T. and Otones A. T. (2016). Morphological and molecular identification and fungicide sensitivity assay of pathogens attacking guayabano (*Annona muricata*) in Philippines. *Plant Pathology & Quarantine*, 6(1): 60-79. DOI: <https://doi.org/10.5943/ppq/6/1/9>.
- Altschul, S. F., Gish, W. W., Miller, E., Myers, W. and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470451496.ch4>.
- Andrades, I., Yender, F., Labarca, J., Ulacio, D., Paredes, C. y Marín, Y. (2009). Evaluación de la antracnosis (*Colletotrichum* sp.) en guanábana (*Annona muricata* L.) tipo Gigante en el sector Moralito del estado de Zulia, Venezuela. *Revista UDO Agrícola*, 9(1): 148-157. Disponible en: <http://www.bioline.org.br/pdf?cg09021> [Última consulta: 25 de mayo de 2018].
- Awan, Q. N. and Akgül, D. S. (2016). First Report of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* Causing Postharvest Fruit Rot of Lemon in Turkey. *Plant Disease* 100(11): 2327. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0512-PDN>.

- Baraona, C. M. y Sancho, B. E. (1992). *Guanábana y macadamia (Fruticultura especial, 5)*. Costa Rica. Editorial Universidad Estatal a Distancia. Disponible en: https://books.google.com.mx/books/about/Guan%C3%A1bana_Y_Macadamia_Fruticultura_Espe.html?id=w4OPt7mFaA0C&redir_esc=y [Última consulta: 20 de mayo de 2018].
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. St. Paul, Minnesota, USA. The American Phytopathological Society.
- Camero, A. C., Rodríguez, P. M., Camero, C. J., Alhagie, K. C. y Camero, N. K. (2017). *Euphoria leucographa* (Gory & Percheron, 1833) (Coleoptera: Melolonthidae) en frutos de guanábana (*Annona muricata* L.) en Nayarit, México. *Revista gaditana de Entomología*, 8(1): 223-227. Disponible en: <https://www.biotaxa.org/RGDE/article/view/33921/30032> [Última consulta: 01 de junio de 2018].
- Coto, D. y Saunders, J. L. (2001). Insectos plaga de la guanábana (*Annona muricata*) en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 61: 60-68. Disponible en: <http://www.sidalc.net/repdoc/A2131e/A2131e.pdf> [Última consulta: 28 de mayo de 2018].
- Dinh, Q., Chongwungse, J., Pongam, P. and Sangchote, S. (2003). Fruit infection by *Colletotrichum gloeosporioides* and anthracnose resistance of some mango cultivars in Thailand. *Australasian Plant Pathology*, 32: 533-538. DOI: <https://doi.org/10.1071/ap03053>.
- Fraire, C. M., Yáñez, M. M. y Nieto, Á. D. (2003). Hongos patógenos en fruto de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3): 288-291. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221307> [Última consulta: 20 de mayo de 2018].
- Guigón, L. C. y González, G. P. A. (2004). Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22: 117-124. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61222115.pdf> [Última consulta: 28 de abril de 2018].
- Gutiérrez, A. O., Nieto, Á. D. y Gutiérrez, A. J. (2002). Características morfológicas, culturales y patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 20(1): 24-30. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61220105.pdf> [Última consulta: 23 de abril de 2018].

- Hernández, F. L. M., R. Gómez J. y J. Andrés A. (2013). *Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano. Libro Técnico Núm. 1.* Campo Experimental Santiago Ixcuintla, Nayarit. México. Disponible en: http://inifapcirpac.gob.mx/publicaciones_nuevas/Importancia,%20plagas%20insectiles%20y%20enfermedades%20fungosas%20del%20cultivo%20del%20Guanabano.pdf [Última consulta: 16 de abril de 2018].
- Jiménez, Z. J., Balois, M. R., Alia, T. I., Juárez, L. P., Sumaya, M. M. y Bello, L. J. (2016). Caracterización de frutos de guanábana (*Annona muricata* L.) en Tepic, Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(6): 1261-1270. DOI: <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i6.175>.
- Montiel, C. A. (1997). *Pestalotiopsis psidii* (Pat.) Mordue causante de necrosis de frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) en plantaciones de los municipios Baralt y Mara del estado Zulia. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, 14: 341-347. Disponible en: <http://www.produccioncientifica.luz.edu.ve/index.php/agronomia/article/view/11687/11677> [Última consulta: 20 de junio de 2018].
- Morales, G. J., Azpíroz, R. H. y Pedraza, S. M. (2009). Caracterización cultural, morfológica, patogénica e isoenzimática de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., causante de la antracnosis del aguacate (*Persea americana* Mill.) en Michoacán, México. *Revista UDO Agrícola* 9(4): 848-856. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3394147> [Última consulta: 20 de junio de 2018].
- Muñoz, C., Gómez, L. y Umaña, G. (2003). Caracterización morfológica y bioquímica de aislamientos de *Colletotrichum* spp. y su patogenicidad en mango (*Mangifera indica* L.). *Tecnología en Marcha*, 16(1): 55-65. Disponible en: http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/1456/1339 [Última consulta: 19 de junio de 2018].
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. (2018). Gen Bank. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [Última consulta: 20 de junio de 2018].
- Nweke, C. N. and Ibiam, O. F. (2012). Pre and post-harvest fungi associated with the soft rot of the fruit of *Annona muricata*, and their effects on the nutrient content of the pulp. *Food & Nutrition Journals*, 2(4): 78-85. Disponible en:

<https://www.scihub.org/AJFN/PDF/2012/4/AJFN-2-4-78-85.pdf> [Última consulta: 25 de abril de 2018].

Ochoa, F. Y. M., Cerna, C. E., Gallegos, M. G., Landeros, F. J., Delgado, O. J. C., Hernández, C. S., Rodríguez, G. R. y Olalde, P. V. (2012). Identificación de especies de *Fusarium* en semilla de ajo en Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36: 27-31. DOI: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v36/v36a5.pdf> [Última consulta: 15 de mayo de 2018].

Okigbo, R. and Obire, O. (2009). Mycoflora and production of wine from fruits of soursop (*Annona muricata* L.). *International Journal of Wine Research*, 1: 1-9. DOI: <https://doi.org/10.2147/ijwr.s4667>.

Raeder, U. and Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1: 17-20. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.1985.tb01479.x>.

Ruiz, C. M., Rios, V. C., Berlanga, R. D., Ornelas, P. J., Acosta, M. C., Romo, C. A., Zamudio, F. P. y Pérez, C. D. (2017). Incidencia y agentes causales de enfermedades de raíz y sus antagonistas en manzanos de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(3): 437-462. DOI: <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1704-3>.

Ruiz, S. E., Chan, C. W., Pérez, G. A., Cristobal, A. J., Uch, V. B., Tun, S. J. y Munguía, R. R. (2011). Crecimiento, esporulación y germinación *in vitro* de cinco cepas de *Metarhizium* y su virulencia en huevos y ninfas de *Bemisia tabaci*. *Revista Mexicana de Micología* 33: 9-15. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v33/v33a3.pdf> [Última consulta: 12 de julio de 2018].

Sandoval, S. M., Nieto, Á. D., Sandoval, I. S., Téliz, O. D., Orozco, S. M. y Silva, R. V. (2013). Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Manguifera indica* L.). *Agrociencia*, 47(1): 61-73. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v47n1/v47n1a6.pdf> [Última consulta: 20 de junio de 2018].

SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2017). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Disponible en: <http://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> [Última consulta: 15 de junio de 2018].

Than, P. P., Jeewon, R., Hyde, K. D., Pongsupasamit, S., Mongkolporn, O. and Taylor, P. W. (2008). Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. *Plant Pathology*, 57: 562-572. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01782.x>.

Villanueva, A. R., Yáñez, M. M. y Hernández, A. A. (2008). Especies de *Colletotrichum* en Chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Agrociencia*, 42: 689-701. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v42n6/v42n6a9.pdf> [Última consulta: 13 de mayo de 2018].

Watanabe, T. (2002). *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to especies. Second edition*. Washington, D.C. USA. CRC PRES, New York.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Press, A. (Ed.), *PCR protocols: A guide to methods and applications*. 315–322 pp. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>.

CAPÍTULO IV

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE ANTAGONISTAS CONTRA PATÓGENOS DE FRUTO DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) EN NAYARIT, MÉXICO

Carlos Bryan Cambero Ayón¹, Gregorio Luna Esquivel^{1,2}, Claudio Rios Velasco³, Orlando Estrada Virgen^{1,2}, Antonio Betancourt Aranguré¹, Néstor Isiordia Aquino² y Octavio Jhonathan Cambero Campos^{1,2}.

¹Programa de Doctorado en Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit. Carretera Tepic-Compostela Km. 9. C.P. 63155, Xalisco, Nayarit, México. Tel: (311) 2111163.

²Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit. Carretera Tepic-Compostela Km. 9. Xalisco, Nayarit, México.

³Doctor en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Campus Cuauhtémoc, Chihuahua. Av. Río Conchos S/N, Parque Industrial. C.P. 31570, Cuauhtémoc, Chihuahua, México.

*Autor para correspondencia E-mail: jhony695@gmail.com

Resumen. Nayarit es el estado productor más importante de guanábana en México, sin embargo, su producción es afectada por enfermedades fungosas, *Pestalotiopsis* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides* que provocan pudriciones secas en fruto, mientras que *Lasiodiplodia pseudotheobromae* pudrición blanda. Se evaluó el antagonismo *in vitro* de tres grupos de antagonistas (Actinomicetos: *Streptomyces* sp. SLe5, *S. viridochromogenes* TDI-4 y *S. tubercidicus* 14241; Hongos: *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* y *T. asperellum*; Bacterias: *Bacillus subtilis*, *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens*). Las cepas de *Streptomyces* ejercieron el 100 % de inhibición del crecimiento de *Pestalotiopsis* sp., *C. gloeosporioides* y *L. pseudotheobromae*, excepto *S. viridochromogenes* que presentó un porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de 88.3 % contra *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. Mientras que las cepas de *Trichoderma* mostraron diferente inhibición en los patógenos evaluados, *Trichoderma longibrachiatum* mostró el mayor (PICR), 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 PICR fue de 58.22 % con *B. methylotrophicus* contra *Pestalotiopsis* sp.

Términos para Indexación: Control biológico, antagonismo, fitopatógeno, confrontación

IN VITRO EVALUATION OF ANTAGONISTS AGAINST SOURSOP FRUIT PATHOGENS (*Annona muricata* L.) IN NAYARIT, MEXICO

Abstract. Nayarit is the most important soursop producer state in Mexico; however, its production is affected by fungal diseases, *Pestalotiopsis* sp. and *Colletotrichum gloeosporioides* which cause dry rot in the fruit, while *Lasiodiplodia pseudotheobromae* soft rot. *In vitro* antagonism of three groups of antagonists was evaluated (Actinomycetes: *Streptomyces* sp. SLe5, *S. viridochromogenes* TDI-4 and *S. tubercidicus* 14241; Fungi: *Trichoderma harzianum*, *T. longibrachiatum* and *T. asperellum*; Bacteria: *Bacillus subtilis*, *B. methylotrophicus* and *B. amyloliquefaciens*). The strains of *Streptomyces* exerted 100 % inhibition of the growth of *Pestalotiopsis* sp., *C. gloeosporioides* and *L. pseudotheobromae*, except *S. viridochromogenes* that presented a percentage of inhibition of radial growth (PIRG) of 88.3 % against *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. While 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. In the case of bacteria, the highest PIRG was 58.22 % with *B. methylotrophicus* against *Pestalotiopsis* sp.

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

Introducción

En México, la guanábana (*Annona muricata* L.) se produce en diez Estados, donde la mayor producción se concentra en Nayarit (21 810 t), Colima (2 986 t), Michoacán (1 394 t) y Guerrero (1 062 t). En el estado de Nayarit destaca el municipio de Compostela con una

producción de 21 157 t, correspondiente al 97 % de la producción (SIAP, 2017). A pesar de esto, su producción es afectada por diversos insectos plaga (HAMADA et al. 1998; COTO; SAUNDERS, 2001) y enfermedades fúngicas, las cuales afectan su fisiología y por ende su rendimiento (Jiménez, 2017). Las enfermedades fúngicas asociadas al fruto de guanábana reportadas en otros países son causadas 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). Por otra parte, en México, los estudios realizados para el diagnóstico de enfermedades en este frutal son escasos. Recientemente, en Nayarit, se ha reportado a *Pestalotiopsis* sp. y *C. gloeosporioides* como causantes de la pudrición seca en frutos de *A. muricata* y a *Lasiodiplodia pseudotheobromae* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous como el agente causal de la pudrición blanda (CAMBERO et al. 2018). El manejo de enfermedades de *A. muricata* en Nayarit, México ha sido cuestionado, debido a que se ha realizado con aplicación de moléculas químicas, aún sin estar autorizadas por la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) (COFEPRIS, 2018). Por lo tanto, en la búsqueda de alternativas permitidas en el manejo de fitopatógenos que disminuyen la calidad y rendimiento de guanábana, se encuentran los microorganismos antagonistas, dentro de los cuales destacan los hongos del género *Trichoderma* (PADDER; SHARMA, 2011; LANDERO et al. 2015), y las bacterias de los géneros *Bacillus* y *Streptomyces*, que han mostrado capacidad antifúngica *in vitro* al ser evaluados contra diversos hongos patógenos (UTKHEDE; SHOLBERG, 1986; DÁVILA et al. 2013; KAMIL et al. 2018). Además, estos grupos de microorganismos no contaminan el ambiente, lo cual permite un manejo sustentable de la problemática fitosanitaria de *A. muricata* del estado de Nayarit. Por lo anterior, el objetivo del trabajo fue, evaluar el efecto antifúngico *in vitro* de cepas de *Streptomyces*, *Trichoderma* y *Bacillus* contra *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Pestalotiopsis* sp., agentes causales de pudriciones en frutos de guanábana en Nayarit, México.

Materiales y Métodos

Microorganismos patógenos y antagonistas. Los hongos fitopatógenos *Pestalotiopsis* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* y *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, agentes causales de pudrición en frutos de *A. muricata* en Nayarit, México (Apéndice A8) (CAMBERO et al. 2018), fueron obtenidos en el año 2018 y depositados en el cepario del Laboratorio de Parasitología Agrícola del Centro Multidisciplinario de Investigación Científica 03 (CEMIC 03) de la Universidad Autónoma de Nayarit (UAN). Mientras que las cepas antagonistas: *Streptomyces* sp. SLe5, *S. viridochromogenes* TDI-4, *S. tubercidicus* 14241, *Trichoderma harzianum* Rifai, *T. asperellum* Samuels, Lieckfeld y Nirenberg, *T. longibrachiatum* Rifai, *Bacillus subtilis*, *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens*, fueron proporcionados por el cepario del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Sede Chihuahua, campus Cuauhtémoc.

Pruebas de antagonismo *in vitro*. Para las confrontaciones con *Streptomyces* spp., se colocaron cuatro explantes con el antagonista de 6 mm de diámetro en cajas de Petri (90 × 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 PDA de 6 mm de diámetro con micelio del patógeno (7 d de crecimiento) en el centro de la caja de Petri, se incubaron a 28 °C 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 (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* spp., se transfirieron a una nueva caja con PDA sin presencia del antagonista, para observar si crecían nuevamente (acción fungistática) o no lo hacían (acción fungicida). Para los bioensayos con las cepas de *Trichoderma*, se realizaron confrontaciones duales de ambos microorganismos en cajas de Petri (90 × 15 mm) con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA). Para ello, se tomaron discos de PDA de 6 mm de diámetro con crecimiento micelial (sin conteo de conidios) del antagonista y el patógeno correspondiente con 7 d de crecimiento y se colocaron equidistantes en los extremos de la caja de Petri. Las confrontaciones se mantuvieron a 25 °C en una incubadora Precision Scientific (Modelo 31534) en ausencia de luz y el crecimiento micelial se midió sistemáticamente cada 24 h (BELL et al. 1982). Por otra parte, las confrontaciones con las cepas de *Bacillus* spp., se hicieron de manera similar a las de *Streptomyces*, sólo que los explantes de 6 mm de diámetro,

colocados en los puntos cardinales se crecieron previamente en medio PDA, posteriormente, en el centro de la caja se colocó el explante de 6 mm de diámetro con micelio del patógeno (7 d de crecimiento) correspondiente y se incubaron a 28 °C (RIOS et al. 2016).

Análisis estadístico. Para cada uno de los antagonistas se evaluó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), mediante la siguiente fórmula, $PICR = (R1 - R2) / R1 \times 100$, donde R1 es el radio del patógeno testigo y R2 es el radio del patógeno en la confrontación (EZZIYYANI et al. 2004). A los datos de PICR se les aplicó un análisis de varianza (ANVA) usando el Statistical Analysis System versión 9.0 (SAS, 2002), y la separación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey ($p= 0.05$). Todas las pruebas se realizaron por triplicado, cada repetición constó de tres unidades experimentales (en total se usaron 9 cajas de Petri por confrontación) y como testigo se consideraron 10 cajas del patógeno sin presencia de antagonista.

Resultados y Discusión

Pruebas de antagonismo *in vitro*. De las cepas probadas de *Streptomyces* (Fig. 1) (Apéndice A9, A10 y A11), las tres inhibieron el 100 % de *L. pseudotheobromae*, *C. gloeosporioides* y *Pestalotiopsis* sp., excepto *S. viridochromogenes* que presentó un PICR de 88.3 % vs *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. Estos valores son superiores a lo registrado por Palaniyandi et al. (2011), quienes obtuvieron un PICR del 57.5 % al confrontar una cepa de *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* las tres cepas presentaron un efecto fungicida *in vitro*. Este grupo de antagonistas fue el más efectivo contra los tres agentes causales de la pudrición de fruto de guanábana, esto posiblemente se deba a que estos microorganismos producen una gran diversidad de 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) lo

cual, se pudiera aprovechar para realizar el aislamiento de estos compuestos para una posterior evaluación *in vivo*.

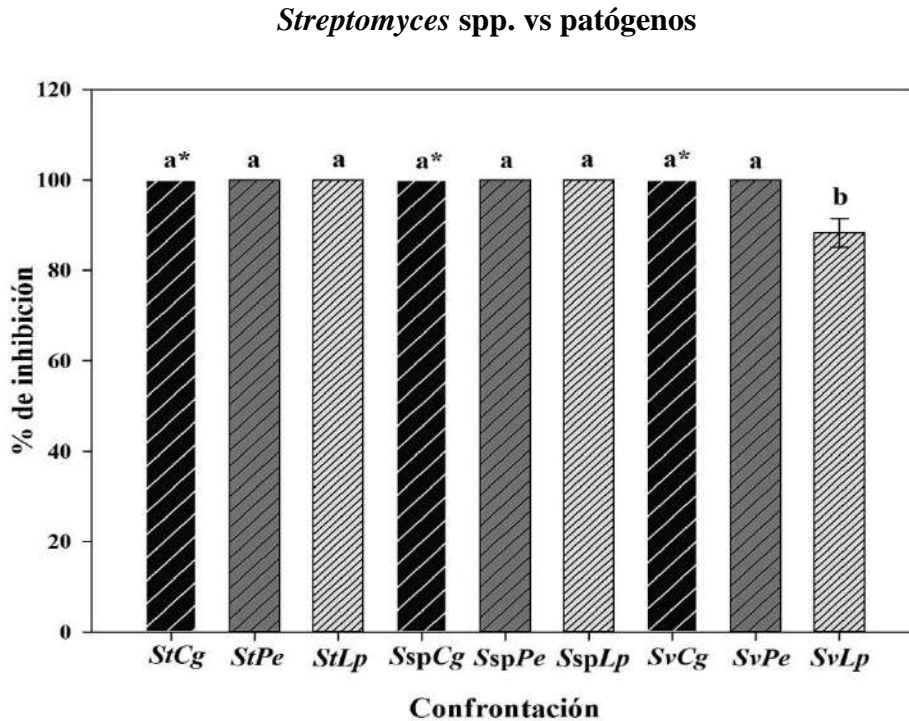


FIGURA 1. Antagonismo *in vitro* de *Streptomyces* spp. contra patógenos de fruto de guanábana. (StCg: *S. tubercidicus* vs *C. gloeosporioides*, StPe: *S. tubercidicus* vs *Pestalotiopsis* sp., StLp: *S. tubercidicus* vs *L. pseudotheobromae*, SspCg: *C. gloeosporioides* vs *Streptomyces* sp., SspPe: *Streptomyces* sp. vs *Pestalotiopsis* sp., SspLp: *Streptomyces* sp. vs *L. pseudotheobromae*, SvCg: *S. viridochromogenes* vs *C. gloeosporioides*, SvPe: *S. viridochromogenes* vs *Pestalotiopsis* sp., SvLp: *S. viridochromogenes* vs *L. pseudotheobromae*).
* Presencia de efecto fungicida de *Streptomyces* vs *C. gloeosporioides*.

De las cepas de *Trichoderma* evaluadas (Fig. 2) (Apéndice A12, A13 y A14), la especie *T. longibrachiatum* fue la más efectiva contra los tres hongos fitopatógenos *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* fueron las confrontaciones con 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 se reportaron PICR de 53.26 a 55.82 %. Las cepas del género *Trichoderma* han sido las más evaluadas para el control de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos como *C. gloeosporioides* por su facilidad para ser aisladas, cultivadas y crecidas en diversos sustratos, entre otros atributos (PAPAVIZAS, 1982; PEREIRA et al. 2010; SANMARTÍN et al. 2012; BHADRA et al. 2014).

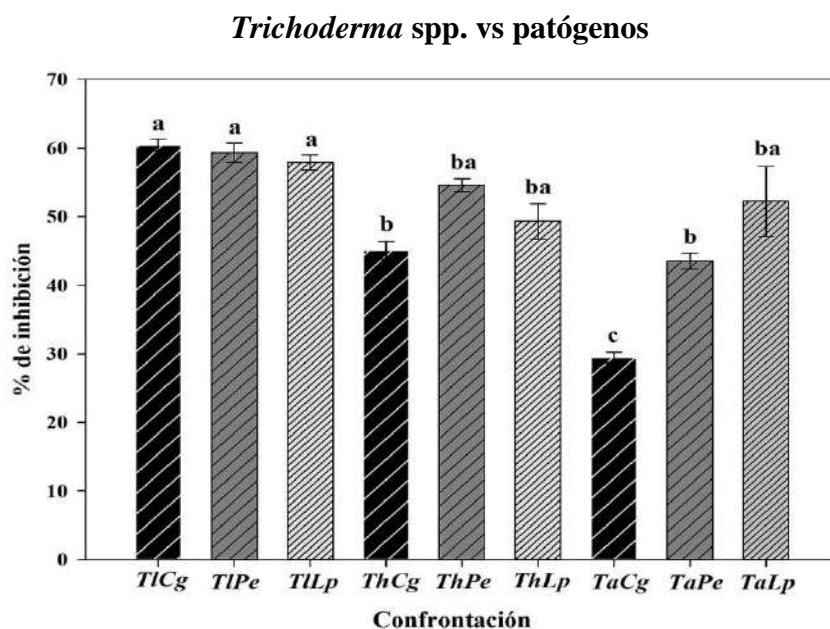


FIGURA 2. Antagonismo *in vitro* de tres especies de *Trichoderma* vs agentes causales de las pudriciones de fruto de guanábana. (TICg: *T. longibrachiatum* vs *Colletotrichum gloeosporioides*, TlPe: *T. longibrachiatum* vs *Pestalotiopsis* sp., TlLp: *T. longibrachiatum* vs *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, ThCg: *T. harzianum* vs *C. gloeosporioides*, ThPe: *T. harzianum* vs *Pestalotiopsis* sp., ThLp: *T. harzianum* vs *L. pseudotheobromae*, TaCg: *T. asperellum* vs *C. gloeosporioides*, TaPe: *T. asperellum* vs *Pestalotiopsis* sp., TaLp: *T. asperellum* vs *L. pseudotheobromae*).

Las especies de *Bacillus* demostraron diferente inhibición en los patógenos (Fig. 3) (Apéndice A15, A16 y A17), 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. Estos porcentajes se encuentran dentro de lo reportado por Ruiz et al. (2017), al evaluar las mismas cepas de *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* contra los tres patógenos evaluados, contrasta 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 %. La inhibición *in vitro* presentada por *Bacillus* spp., posiblemente se deba a la producción de metabolitos antifúngicos como iturina A, surfactina, lipopéptidos cíclicos, y/o fengicina (ARGELLES et al. 2009).

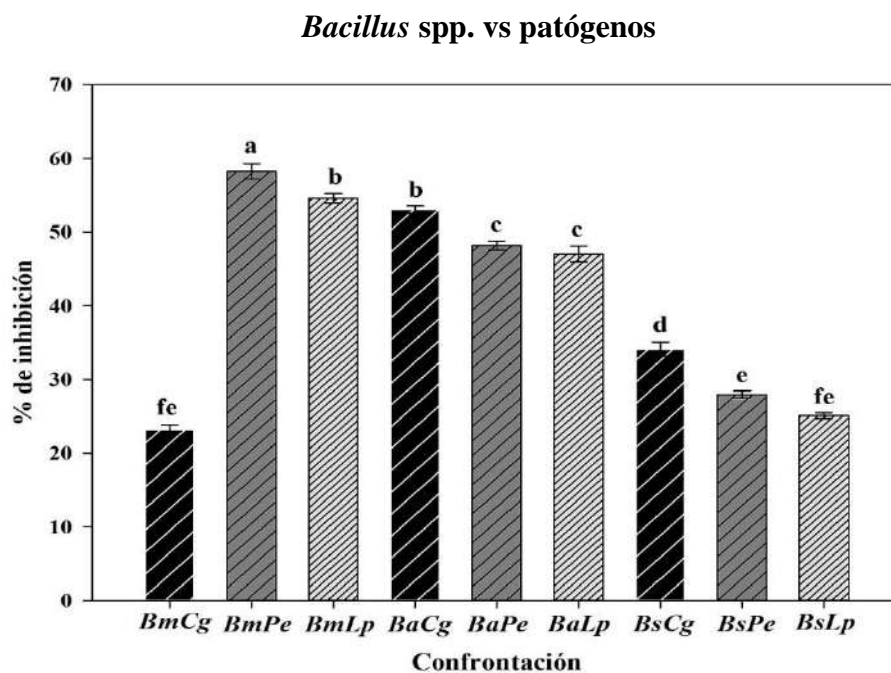


FIGURA 3. Confrontación *in vitro* de *Bacillus* spp. contra patógenos causantes de pudriciones de fruto de guanábana. (*BmCg*: *B. methylotrophicus* vs *Colletotrichum gloeosporioides*, *BmPe*: *B. methylotrophicus* vs *Pestalotiopsis* sp., *BmLp*: *B. methylotrophicus* vs *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *BaCg*: *B. amyloliquefaciens* vs *C. gloeosporioides*, *BaPe*: *B. amyloliquefaciens* vs *Pestalotiopsis* sp., *BaLp*: *B. amyloliquefaciens* vs *L. pseudotheobromae*, *BsCg*: *B. subtilis* vs *C. gloeosporioides*, *BsPe*: *B. subtilis* vs *Pestalotiopsis* sp., *BsLp*: *B. subtilis* vs *L. pseudotheobromae*).

Por lo anterior, estos microorganismos podrían utilizarse para investigaciones futuras en el control biológico *in situ* de los agentes causales de las pudriciones de fruto de *Annona muricata* en México, y de esta manera contribuir a la disminución del uso de fungicidas químicos, evitando la contaminación del ambiente y reduciendo el riesgo de desarrollo de resistencia por los patógenos.

Conclusión

Los tres grupos de antagonistas (hongos, bacterias y actinomicetos) mostraron actividad antifúngica contra los tres patógenos causantes de las pudriciones de fruto de guanábana. Las cepas de *Streptomyces* fueron las más efectivas con inhibiciones del 100 % contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Pestalotiopsis* sp. En *C. gloeosporioides* se encontró un efecto fungicida, ejercido por las tres cepas de *Streptomyces*. Las tres cepas de *Trichoderma* y *Bacillus*, respectivamente, inhibieron a los fitopatógenos evaluados en diferentes porcentajes no mayores al 58 %.

Agradecimientos

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

Referencias

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

ÁLVAREZ, E.; OSPINA, C. A.; MEJÍA, J. F.; LLANO, G. A. Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca. Fitopatología Colombiana, v.28, n.1, p.1-8, 2005.

ARGUELLES, A. A.; ONGENA, M.; HALIMI, B.; LARA, Y.; BRANS, A.; JORIS, B.; FICKERS, P. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogen. *Microbial Cell Factories*, v.8, p.1-12, 2009.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Ecology and Epidemiology*, 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*, 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. Agentes causales de la pudrición de fruto de guanábana (*Annona muricata* L.) en Nayarit, México. *Revista Bio Ciencias*, en proceso de publicación, 2018.

CASTILLO, F. E.; GALLEGOS, M. G.; HERNÁNDEZ, C. F.; CEPEDA, S. M.; ZAMORA, V. V. Efectividad de actinomicetos aislados de la rizósfera de papa sobre *Rhizoctonia solani* Kühn *in vitro*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, v.19, n.2, p.203-207, 2001.

COMISIÓN FEDERAL PARA LA PROTECCIÓN CONTRA RIESGOS SANITARIOS (COFEPRIS). Plaguicidas autorizados. Disponible en: <http://189.254.115.252/Resoluciones/Consultas/ConWebRegPlaguicida.asp>. Acceso el: 20. abr. 2018.

COTO, D.; SAUNDERS, J. L. Insectos plaga de la guanábana (*Annona muricata*) en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, v.61, p.60-68, 2001.

DÁVILA, M. M.; GALLEGOS, M. G.; HERNÁNDEZ, C. F.; OCHOA, F. Y.; FLORES, O. A. Actinomicetos antagónicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 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 annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*, v.26, p.69-78, 2004.

HAMADA, N.; GOMES, A.; COUTURIER, G.; RONCHI, G. Insetos associados à graviroleira (*Annona muricata* L., Annonaceae) na região de Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, v.28, n.4, p.425-431, 1998.

JIMÉNEZ, D. R. Las enfermedades de las plantas: Impactos, amenazas y control. Boletín de la Real Academia de Córdoba, v.166, p.111-130, 2017.

JIMÉNEZ, Z. J.; BALOIS, M. R.; ALIA, T. I.; JUÁREZ, L. P.; SUMAYA, M. M.; BELLO, L. J. Caracterización de frutos de guanábana (*Annona muricata* L.) en Tepic, Nayarit, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, v.7, n.6, p.1261-1270, 2016.

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, 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, v.4, n.1, p.27-32, 2010.

KOON, J.; MARCY, J. Formation of natamycin: cyclodextrin inclusion complexes and their characterization. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 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, 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, 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, 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, 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, v.111, p.443-455, 2011.

PAPAVIZAS, G. C.; LEWIS, J. A.; ABD-EL MOITY, T. H. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities. Phytopathology, v.72, n.1, p.126-132, 1982.

PEREIRA, B. M.; SÃO, J. A.; HOJO, R. T.; SOUSA, S.; BOAS, S. V.; OLVEIRA, D. N. Avaliação antagonica *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* en maracujazeiro amarelo. Summa Phytopathologica, 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 antagonicos a *Fusarium equiseti*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 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, 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. Identificación y actividad antagonica *in vitro* de aislados de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. contra hongos fitopatógenos comunes. Revista Mexicana de Fitopatología, 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, v.35, n.3, p.437-462, 2017.

RUIZ, S. E.; MEJÍA, B. M.; CRISTÓBAL, A. J.; VALENCIA, B. A.; REYES, R. A. Actividad antagonica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 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 antagonica de *Trichoderma asperellum* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium* sp. Revista Tumbaga, v.2, n.7, p.29-49, 2012.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. Acceso el: 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, v.32, p.963-967, 1986.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES GENERALES

Los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Pestalotiopsis* sp. son los agentes causales de la pudrición seca en frutos de guanábana, mientras que *Lasiodiplodia pseudotheobromae* es el agente que causa la pudrición blanda de fruto y receptáculo floral en las zonas productoras de guanábana de los municipios de San Blas y Compostela, Nayarit, México.

Los hongos *L. pseudotheobromae*, *Fusarium* sp. y *Cladosporium* sp. sólo están asociados con la pudrición seca de los frutos de guanábana, mientras que *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp. *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. a la pudrición blanda de fruto y receptáculo floral.

De los antagonistas utilizados, las especies de *Streptomyces* fueron las más efectivas debido a que indujeron una inhibición del 100 % contra los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotiopsis* sp. y *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, excepto la cepa *S. viridochromogenes* que ejerció un 88.3 % de inhibición sobre este último patógeno. De las tres especies de *Trichoderma*, *T. longibrachiatum* fue el que más inhibió a los fitopatógenos 60.45 %. Las tres especies de *Bacillus* tuvieron diferente comportamiento ante cada hongo confrontado, donde la mayor inhibición registrada fue por *B. methylotrophicus* contra *Pestalotiopsis* sp. con 58.22 %. Por lo que, los resultados obtenidos en la presente investigación, sirven como base para futuras evaluaciones *in vivo* o el desarrollo de tecnologías que permitan un manejo integrado de enfermedades de fruto de *A. muricata* con estos microorganismos.

Se registran por primera vez en México a *Pestalotiopsis* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides* como agentes causales de la pudrición seca de guanábana, así como a *Lasiodiplodia pseudotheobromae* como el agente causal de la pudrición blanda de fruto y receptáculo floral.

CAPÍTULO VI

LITERATURA CITADA

- Agrios, G. 1998. Fitopatología. Editorial Limusa, México 3ª edición. 838 p.
- Alberto, R. T. and Otones A. T. 2016. Morphological and molecular identification and fungicide sensitivity assay of pathogens attacking guyabano (*Annona muricata*) in Philippines. *Plant Pathology & Quarantine* 6 (1): 60-79.
- Alonso, C. A., Villarreal, M., Salazar, O. L., Gómez, S. M., Domínguez, F. y García, C. A. 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology* 133: 945-972.
- Alt, B. E., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau, V. V., Jacquard, C., Klenk, H., Clément, C., Ouhdouch, Y. and van Wezel, G. 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80 (1): 1-43.
- Álvarez, E., Ospina, C., Mejía, J. y Llano, G. 2004. Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle de Cauca. *Fitopatología Colombiana* 28 (1): 1-8.
- Baraona, C. M. y Sancho, B. E. 1992. Guanábana y macadamia (Fruticultura especial, 5). Editorial Universidad Estatal a Distancia. Costa Rica. 93 p.
- Barrera, J. F. 2016. Introducción, filosofía y alcance del control biológico. pp: 1-13. En: Lomelí, F. J. y González, H. H. (Ed.) Sociedad Mexicana de Control Biológico. Memorias XXVII Curso Nacional de Control Biológico. México. 267 p.
- Bautista, B. S. y Bravo, L. L. 2004. Evaluación del quitosano en el desarrollo de la pudrición blanda del tomate durante el almacenamiento. *Revista Iberoamericana de Tecnologías Postcosecha* 6 (1): 63-67.
- Becerra, L. E. y Rosas, G. X. 2015. Manejo integral de plagas y enfermedades del guanábano. pp: 173-192. En: Vidal, L. E., Vidal, M. N. y Vidal, H. L. (Comp.) Universidad Autónoma de Chapingo. Versión electrónica. Chapingo, Texcoco, Edo. de México. 263 p.

- Bell, D. K., Wells, H. D. and Markham, C. R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Ecology and Epidemiology* 72: 379-382.
- Camero, A. C., Rodríguez, P. M., Camero, C. J., Cham, A. y Camero, N. K. 2017. *Euphoria leucographa* (Gory & Percheron, 1833) (Coleoptera: Melolonthidae) en frutos de guanábana (*Annona muricata* L.) en Nayarit, México. *Revista Gaditana de Entomología* 8 (1): 223-227.
- Cham, A. K., Luna, E. G., Robles, B. A., Rios, V. C., Coronado, B. J. y Camero, C. J. 2018. Insects associated with the soursop (*Annona muricata* L.) crop in Nayarit, Mexico. *Florida Entomologist*, in press.
- Carreras, B. 2011. Aplicaciones de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* en el control de fitopatógenos. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 12 (2): 129-133.
- Chavarría, L., Uribe, L. y Bolaños, A. 2005. Microorganismos benéficos en el control de enfermedades en jengibre. *Agronomía Costarricense* 29 (3): 145-155.
- Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). 2018. Consultado el 20 de agosto de 2018. Disponible en: <http://189.254.115.252/Resoluciones/Consultas/ConWebRegPlaguicida.asp>
- Coto, D. y Saunders, J. L. 2001. Insectos plaga de la guanábana (*Annona muricata*) en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 61: 60-68.
- Dávila, M. M., Gallegos, M. G., Hernández, C. F., Ochoa, F. Y. y Flores, O. A. 2013. Actinomicetos antagonísticos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4 (8): 1187-1196.
- Estrada, V. M., Camero, C. J., Rios, V. C., Luna, E. G., Robles, B. A. y Peña, S. G. 2016. Actividad antagonística *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *Phytophthora cinnamomi* Rands en el cultivo de aguacate en el Occidente de México. *Métodos en Ecología y Sistemática* 11 (3): 1-10.
- Ezziyyani, M., Pérez, S. C., Requena, M. E., Rubio, L. y Candela, C. M. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* -Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología* 26: 69-78.

- Farrera, P. R., Zambrano, V. A. y Ortiz, M. F. 2007. Identificación de hongos asociados a enfermedades del fruto de la fresa en el municipio Jáuregui del estado Táchira. *Revista de la Facultad de Agronomía* 24 (2): 269-281.
- Franco, C. M. 2009. Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Revista Peruana de Biología* 16 (2): 239-242.
- Franco, C. Y. 2008. Caracterización de aislamientos de *Erwinia* spp. causantes de pudrición blanda en papa (*Solanum tuberosum* L.). *Fitosanidad* 12 (2): 129.
- González, V. R., Flores, D. M., Guerrero, R. E., Mendoza, V. R., Cárdenas, E. A., Aguirre, U. L. y Cerna, C. E. 2013. Efecto insecticida de extractos vegetales, sobre larvas de *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) en laboratorio. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4 (2): 273-284.
- Grisales, V. N., Rodríguez, F. P., Henao, R. J. y Tamayo, M. P. 2016. Incidencia de *Colletotrichum* sp. en aguacate (*Persea americana* Mill. cv. Hass) en Antioquia. *Agronomía Colombiana* 34 (1): 918-921.
- Harman G. 2004. Mythos and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Diseases* 84 (3): 77-393.
- Hernández, F. L., Gómez, J. R. y Andrés A. J. 2013. Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano. Libro Técnico Núm. 1. Campo Experimental Santiago Ixcuintla, Nayarit. México. 87 p.
- Hernández, F. L., Gómez, J. R. y Orozco, S. M. 2014. El barrenador de las semillas *Bephratelloides cubensis* y su manejo en el cultivo de guanábana. Libro científico Num. 1. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México. 73 p.
- Hincapié, Ll. C., Lopera, A. D. y Ceballos, G. M. 2008. Actividad insecticida de extractos de semilla de *Annona muricata* (Annonaceae) sobre *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Revista Colombiana de Entomología* 34 (1): 76-82.
- Illescas, R. C. P. 2009. Plagas en frutos del género *Annona* existentes en la zona centro del estado de Veracruz. Tesis (Profesional), Facultad de Ciencias Agrícolas, Zona Xalapa, Universidad Veracruzana. 72 p.

- Jiménez, Z. J., Balois, M. R., Alia, T. I., Juárez, L. P., Sumaya, M. M. y Bello, L. J. 2016. Caracterización de frutos de guanábana (*Annona muricata* L.) en Tepic, Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7 (6): 1261-1270.
- Mayfield, C. I., Williams, S. T., Ruddick, S. M. and Hatfield, H. L. 1972. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil. *Soil Biology Biochemistry* 4: 79-91.
- Michel, A. C., Otero, M. A., Martínez, R. D., Rodríguez, N. L. Ariza, R. y Barrios, A. 2008. Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14 (2): 185-191.
- Okigbo, R. and Obire, O. 2009. Mycoflora and production of wine from fruits of soursop (*Annona muricata* L.). *International Journal of Wine Research* 1: 1-9.
- Papavizas, G. C., Lewis, J. A., and Moity, T. H. A. E. 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology* 72 (1): 126-132.
- Pereira, B. M., São, J. A., Hojo, R. T., Sousa, S., Boas, S. V. y Olveira, D. N. 2010. Avaliação antagónica *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* en maracujazeiro amarelo. *Summa Phytopathologica* 36 (1): 61-67.
- Pérez, C. D., García, G. N., Gallegos, M. G., Ruiz, C. M., Berlanga, R. D. y Rios, V. C. 2015. Aislamiento de actinomicetos asociados a rizosfera de árboles de manzano antagónicos a *Fusarium equiseti*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6 (7): 1629-1638.
- Rey, M., Delgado, J. J., Rincón, A. M., Limón, M. C. y Benítez, T. 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. *Revista Iberoamericana de Micología* 17: 31-36.
- Ruiz, C. M., Rios, V. C., Berlanga, R. D., Ornelas, P. J., Acosta, M. C., Romo, C. A., Zamudio, F. P. y Pérez, C. D. 2017. Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 437-462.
- Ruiz, M. C., Domínguez, E. P., Flores, P. R. y Illescas, R. C. 2014a. Insects associated with soursop (*Annona muricata* L.) in Veracruz, Mexico. *Southwestern Entomologist* 39 (2): 367-374.

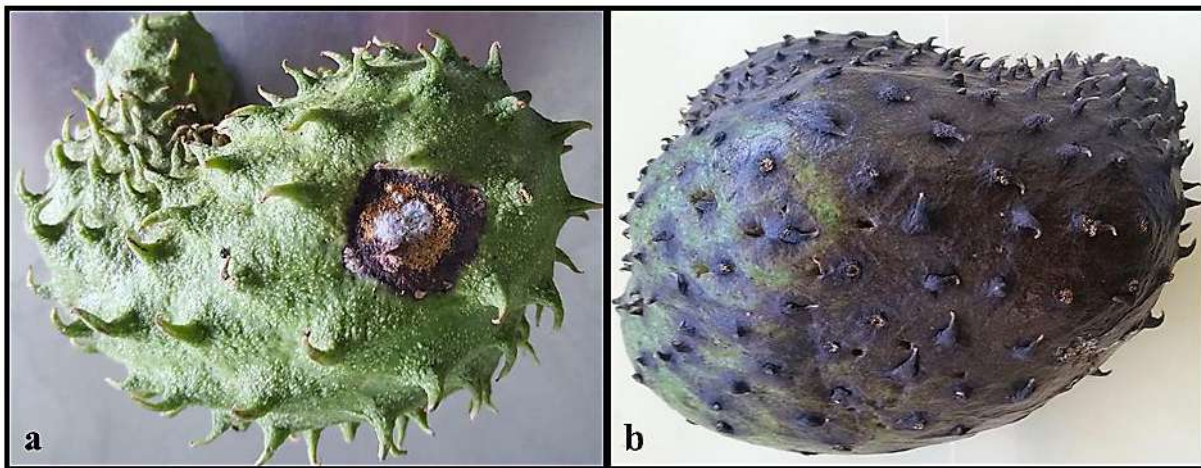
- Ruiz, S. E., Mejía, B. M., Cristóbal, A. J., Valencia, B. A. y Reyes, R. A. 2014b. Actividad antagónica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5 (7): 1325-1332.
- Sandoval, S. M., Nieto, Á. D., Sandoval, I. S., Téliz, O. D., Orozco, S. M. y Silva, R. V. 2013. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica* L.). *Agrociencia* 47 (1): 61-73.
- Sanmartín, N. P., López, X., Pemberthy, M. P., Granada, D. y Rueda, E. A. 2012. Análisis del modo de acción y de la capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium* sp. *Revista Tumbaga* 2 (7): 29-49.
- Sarti, G. C. y Miyazaki, S. S. 2013. Actividad antifúngica de extractos crudos de *Bacillus subtilis* contra fitopatógenos de soja (*Glycine max*) y efecto de su coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum*. *AGROCIENCIA* 47 (4): 373-383.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2017). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Consultado el 15 de octubre de 2018. Disponible en: <http://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Tejera, H. B., Rojas, B. M. y Heydrich, P. M. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 42 (3): 131-138.
- Vidal, H. L., Vidal, M. N., López, M. H., Castillo, R. D. y Chiquito, C. G. 2014a. Propuesta de un plan de desarrollo integral del guanábano (*Annona muricata* L.) en el estado de Veracruz México. *Palestra Anonáceas - V Congreso Internacional & Encontro Brasileiro sobre Annonaceae*, edição especial 36: 94-101.
- Vidal, H. L., López, M. H., Vidal, M. N., Ruiz, B. R., Castillo, R. D. y Chiquito, C. R. 2014b. La situación de las Annonaceae en México: Principales plagas, enfermedades y su control. *Palestra Anonáceas - V Congreso Internacional & Encontro Brasileiro sobre Annonaceae*, edição especial 36: 44-53.
- Xiaohong, Z., Zhaoxin, L., Fengxia, L., Yu, W. and Xiaomei, B. 2011. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* Strain fmbj on the postharvest pathogen *Rhizopus stolonifer*. *Journal of Food Science* 76 (5): 254-259.

- Yuan, W. M. and Crawford, D. L. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (8): 3119-3128.
- Zavaleta, M. E., Bravo, L. L. y Guigón L. C. 2015. Fitopatógenos con origen en el suelo. pp: 65-91. En: Arredondo, B. H. y Rodríguez, L. Casos de control biológico en México, Vol. 2. Editorial del Colegio de Postgraduados. México. 413 p.

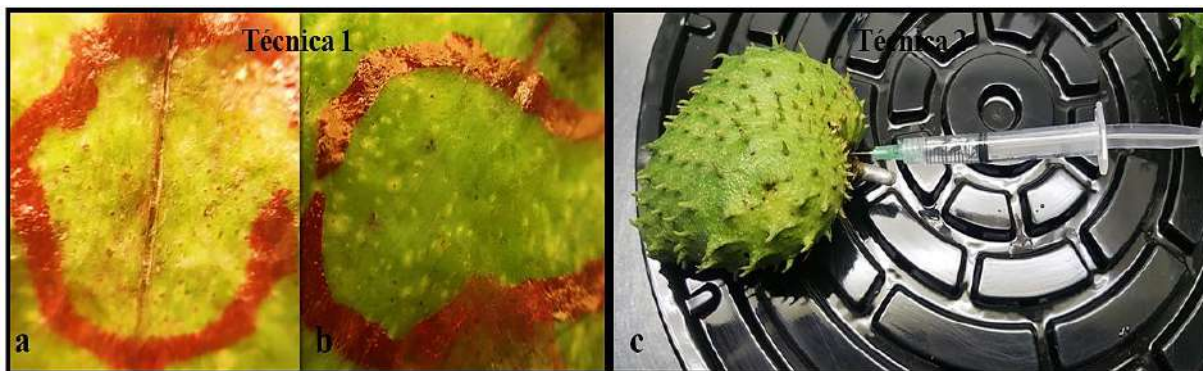
CAPÍTULO VII

APÉNDICE

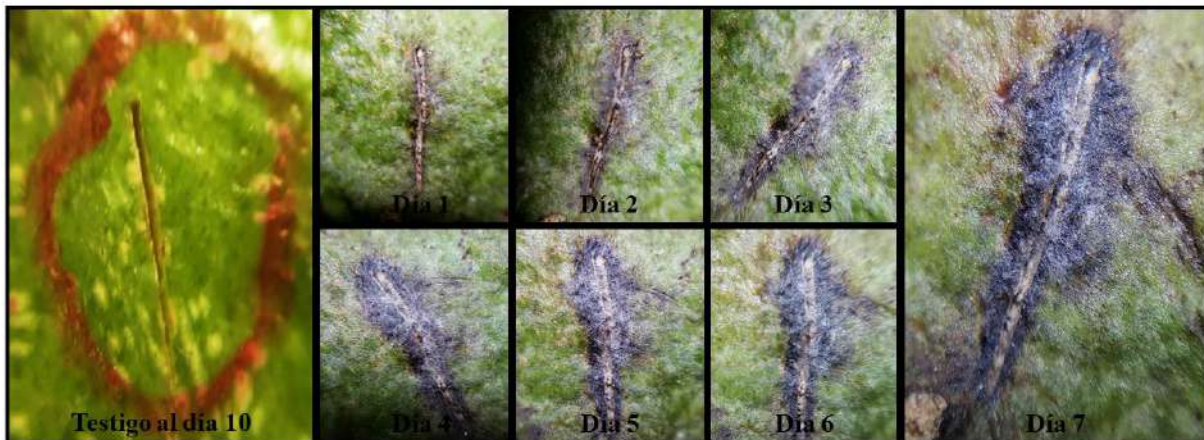
A 1. Síntomas de pudriciones en fruto de guanábana. a) Pudrición seca, b) pudrición blanda.



A 2. Técnicas de inoculación para pruebas de patogenicidad. a) Con herida, b) si herida, c) infiltración de conidios.



A 3. Pruebas de patogenicidad de *Pestalotiopsis* sp. con herida.



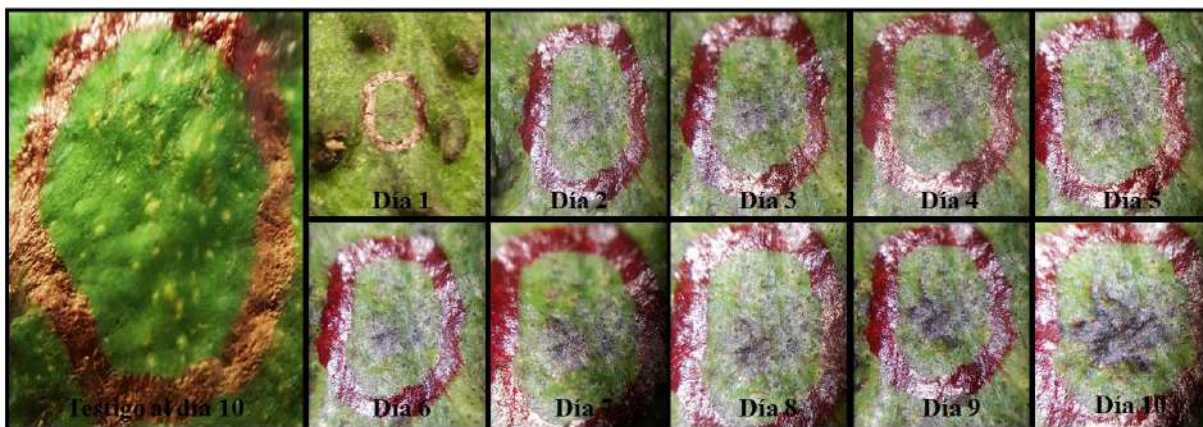
A 4. Pruebas de patogenicidad de *Pestalotiopsis* sp. sin herida.



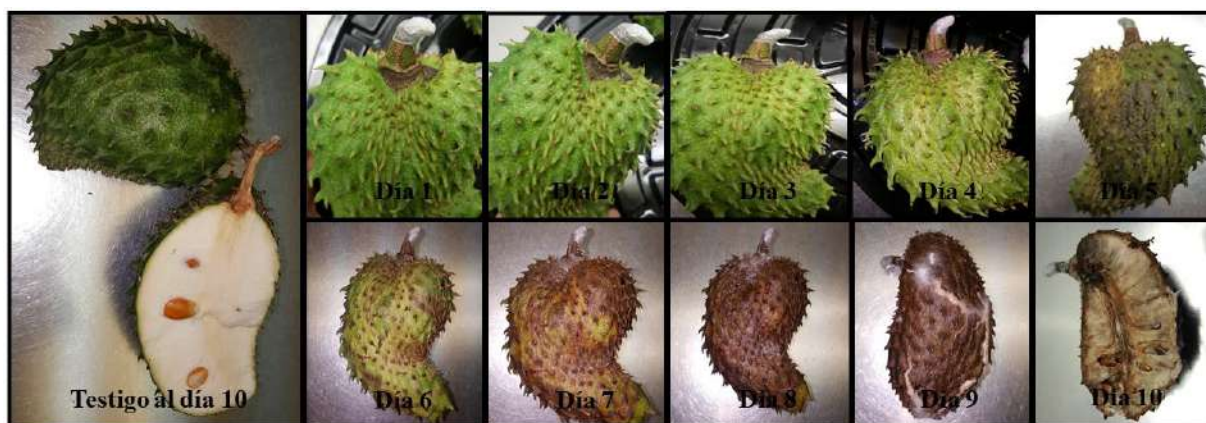
A 5. Pruebas de patogenicidad de *Colletotrichum gloeosporioides* con herida.



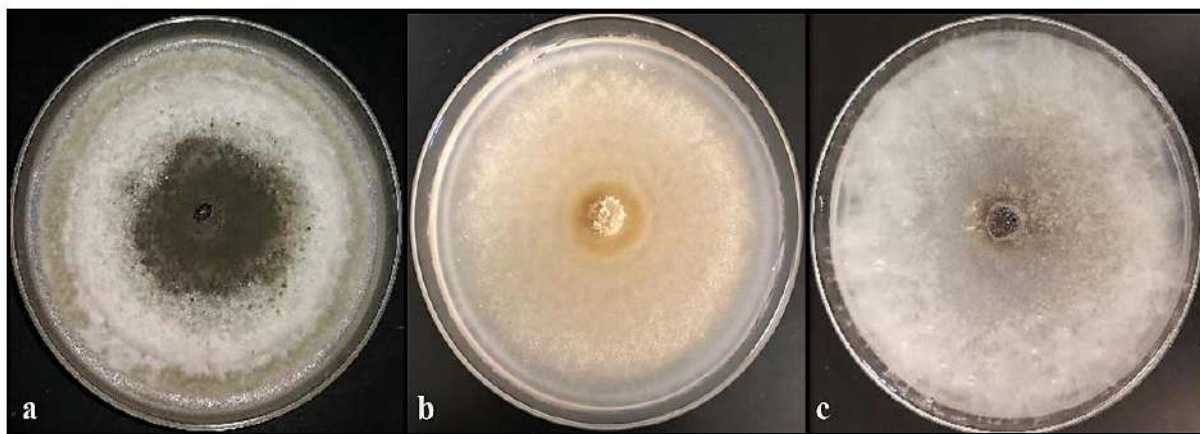
Figura 6A. Pruebas de patogenicidad de *Colletotrichum gloeosporioides* sin herida.



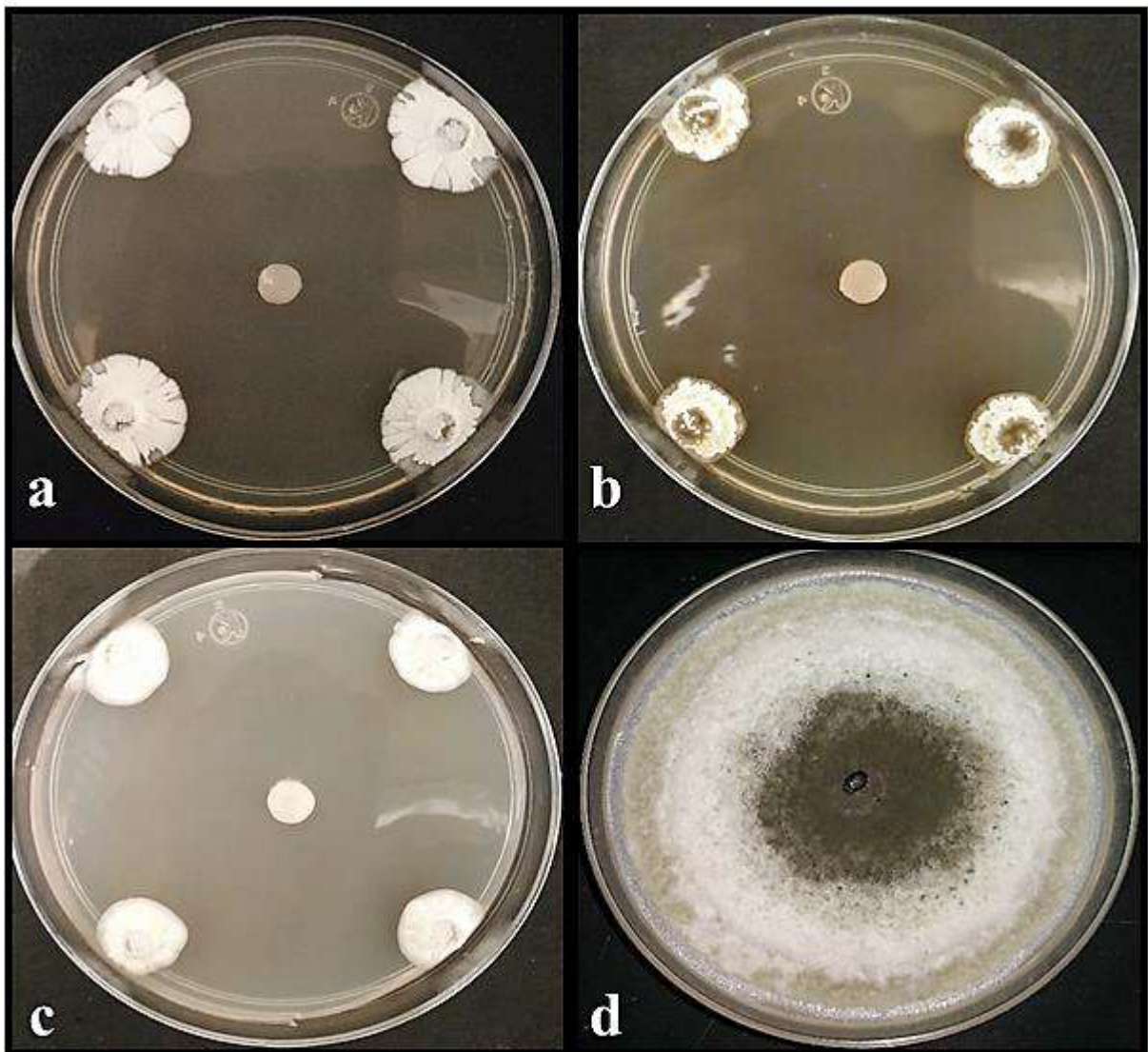
A 7. Pruebas de patogenicidad de *Lasiodiplodia pseudotheobromae* por infiltración de conidios.



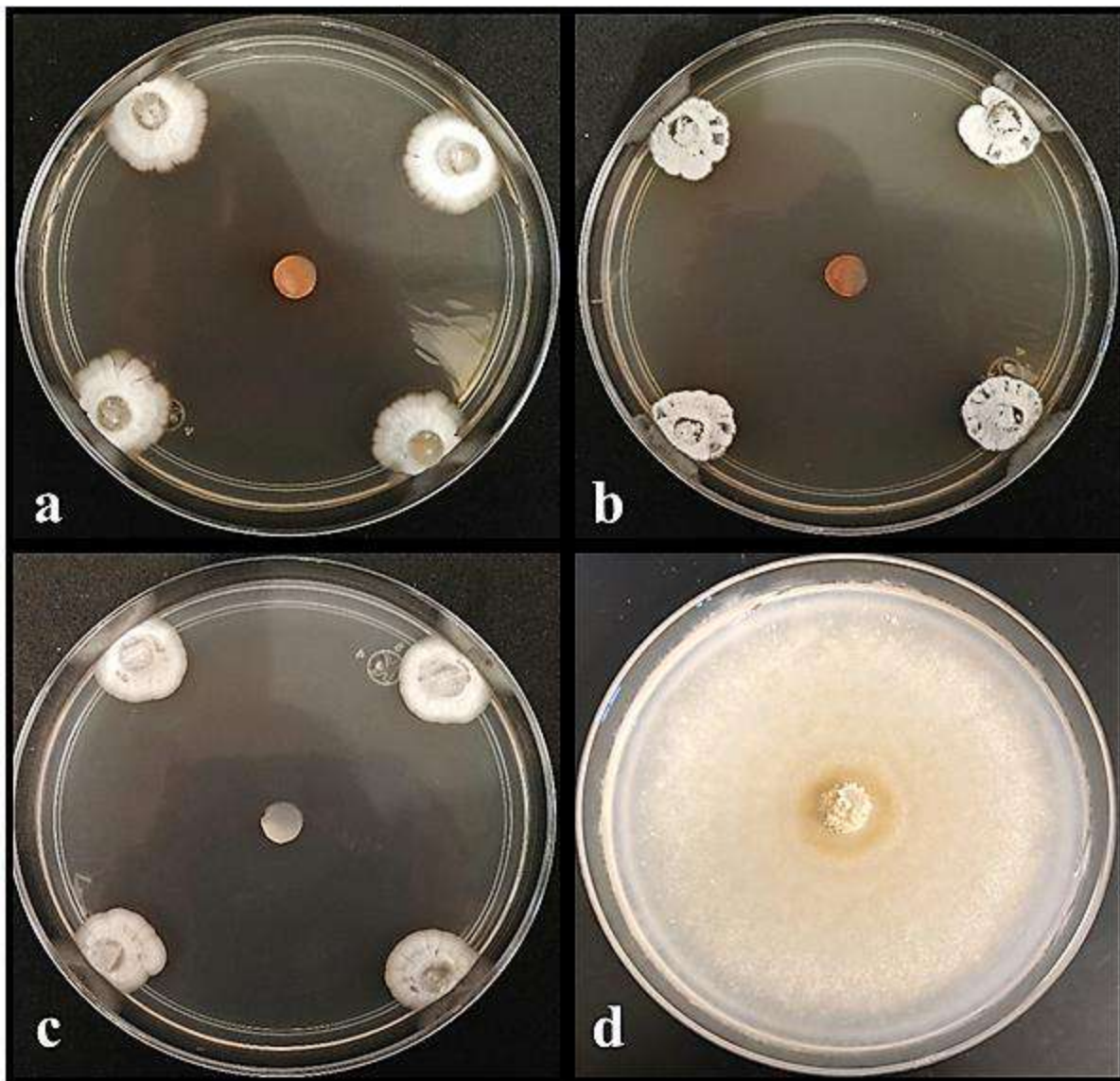
A 8. Hongos fitopatógenos utilizados en las confrontaciones *in vitro*. a) *Colletotrichum gloeosporioides*, b) *Pestalotiopsis* sp., c) *Lasiodiplodia pseudotheobromae*.



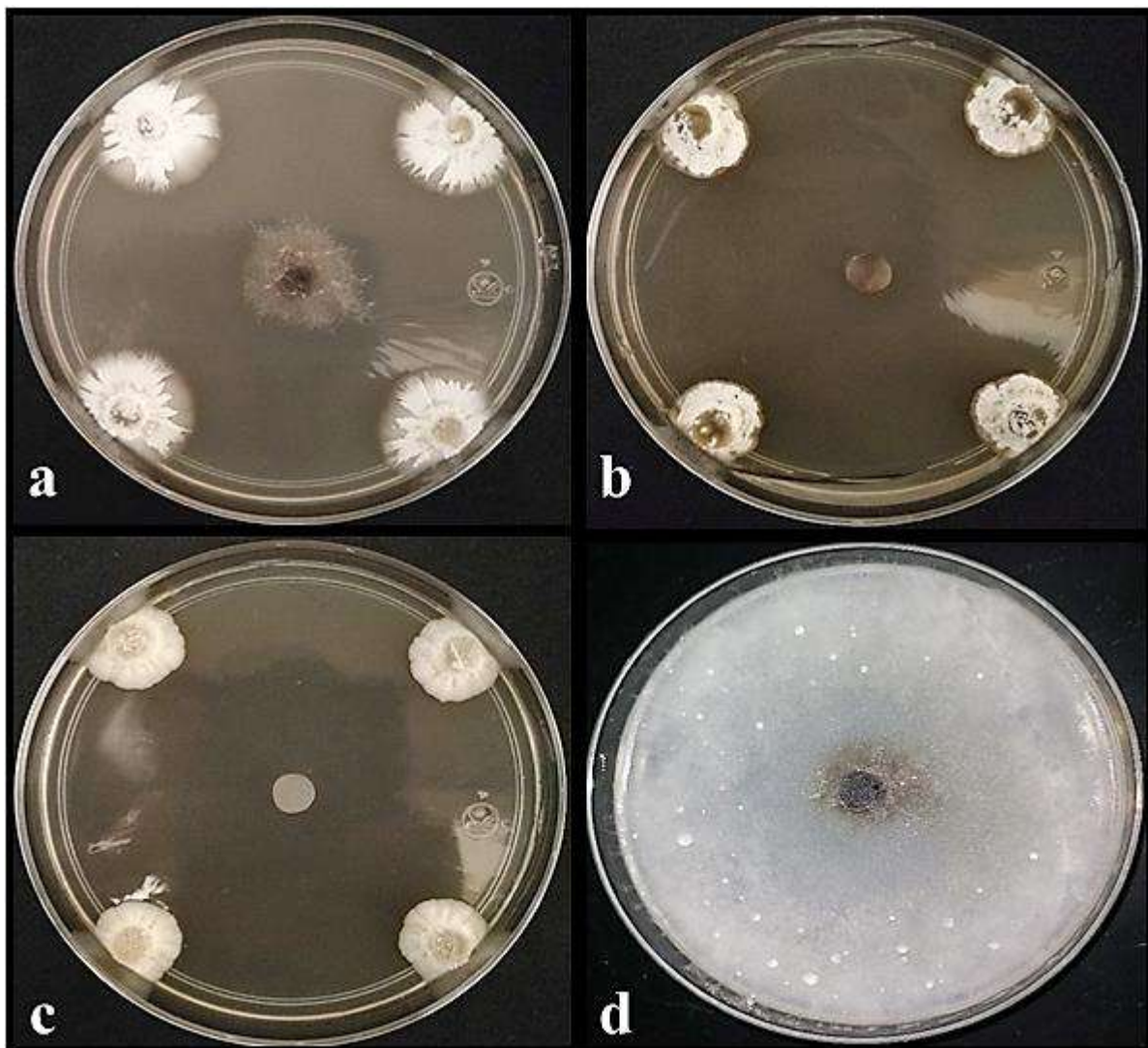
A 9. Cepas de *Streptomyces* spp. contra *Colletotrichum gloeosporioides* causante de la pudrición seca de fruto de *A. muricata*. a) *S. viridochromogenes* vs *C. gloeosporioides*, b) *S. tubercidicus* vs *C. gloeosporioides*, c) *Streptomyces* sp. vs *C. gloeosporioides*, d) Testigo al día 10.



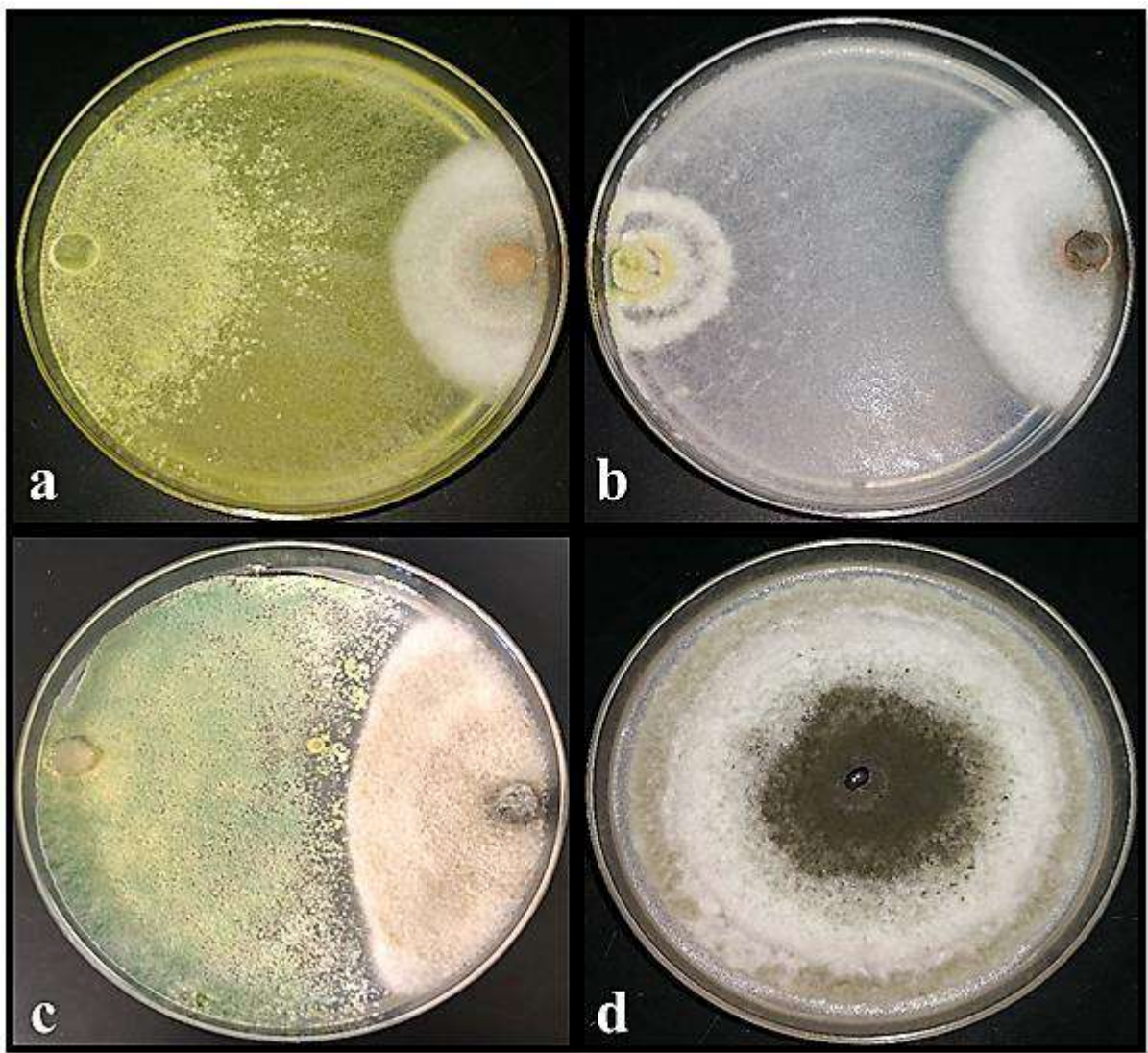
A 10. Cepas de *Streptomyces* spp. contra *Pestalotiopsis* sp. causante de la pudrición seca de fruto de guanábana. a) *S. viridochromogenes* vs *Pestalotiopsis* sp., b) *S. tubercidicus* vs *Pestalotiopsis* sp., c) *Streptomyces* sp. vs *Pestalotiopsis* sp., d) Testigo al día 12.



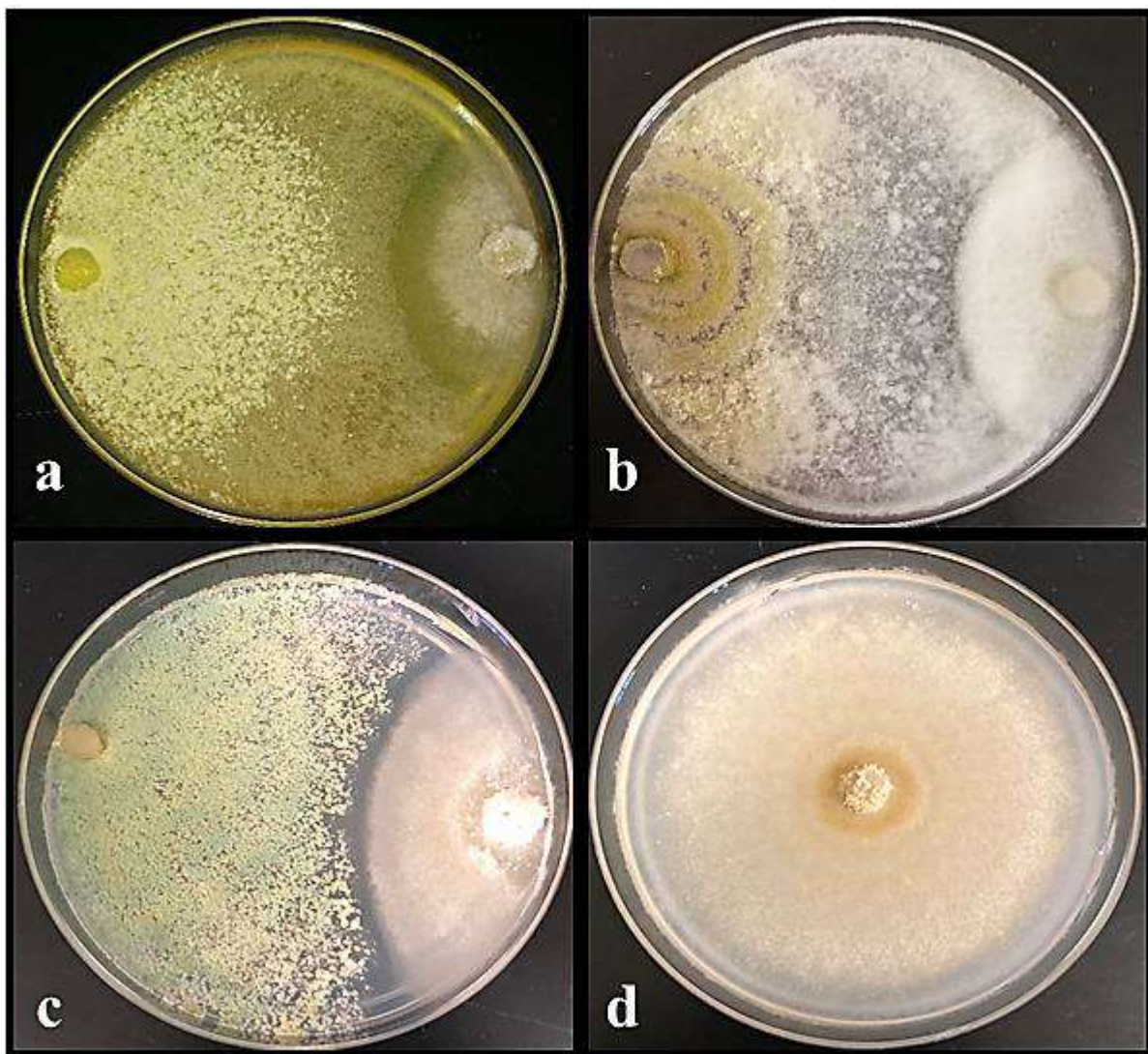
A 11. Cepas de *Streptomyces* spp. contra *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causante de la pudrición blanda y receptáculo floral de fruto de *A. muricata*. a) *S. viridochromogenes* vs *C. gloeosporioides*, b) *S. tubercidicus* vs *C. gloeosporioides*, c) *Streptomyces* sp. vs *C. gloeosporioides*, d) Testigo al día 8.



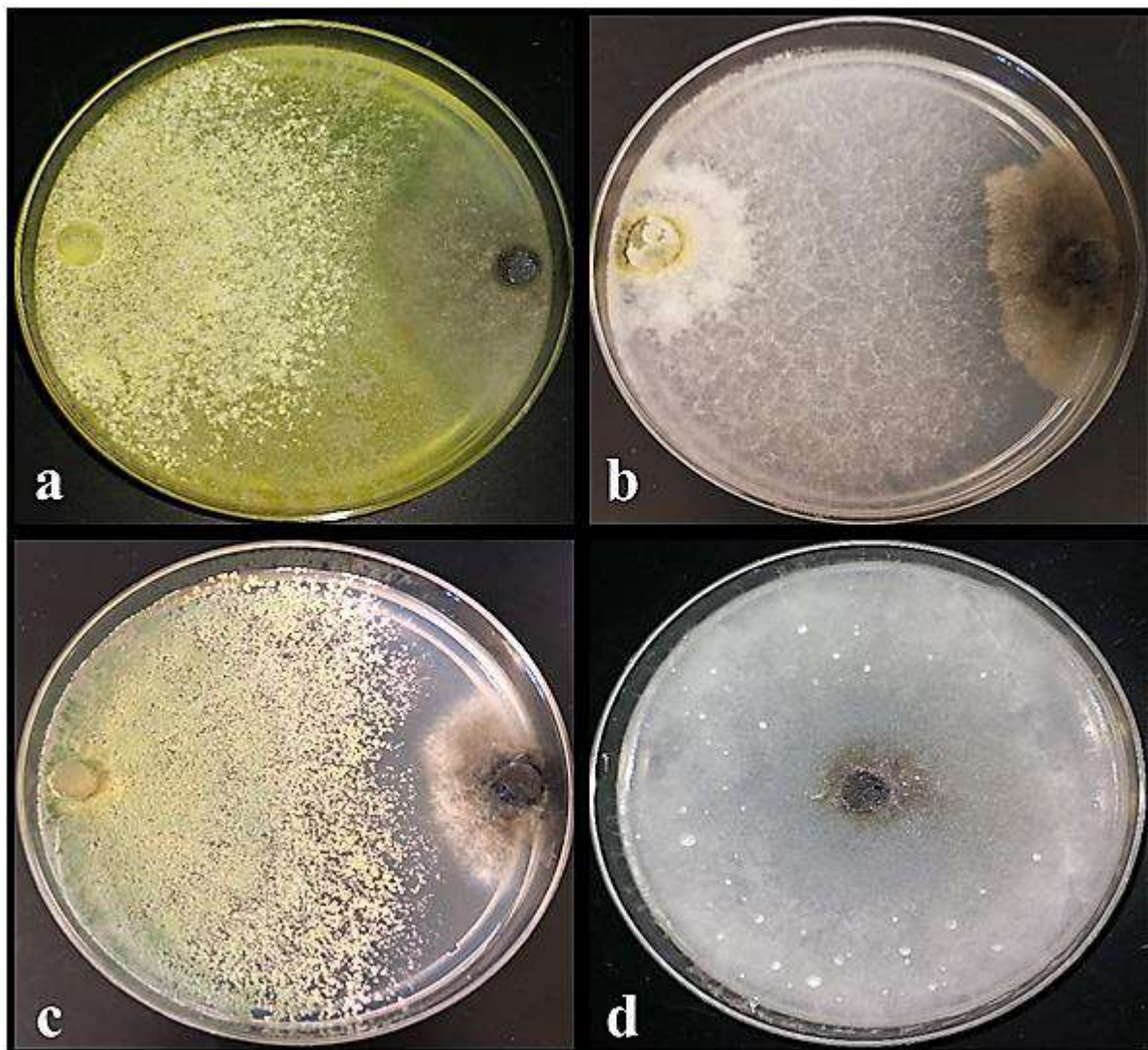
A 12. Cepas de *Trichoderma* spp. contra *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal de la pudrición seca de fruto de guanábana. a) *T. longibrachiatum* vs *C. gloeosporioides*, b) *T. harzianum* vs *C. gloeosporioides*, c) *T. asperellum* vs *C. gloeosporioides*, d) Testigo al día 9.



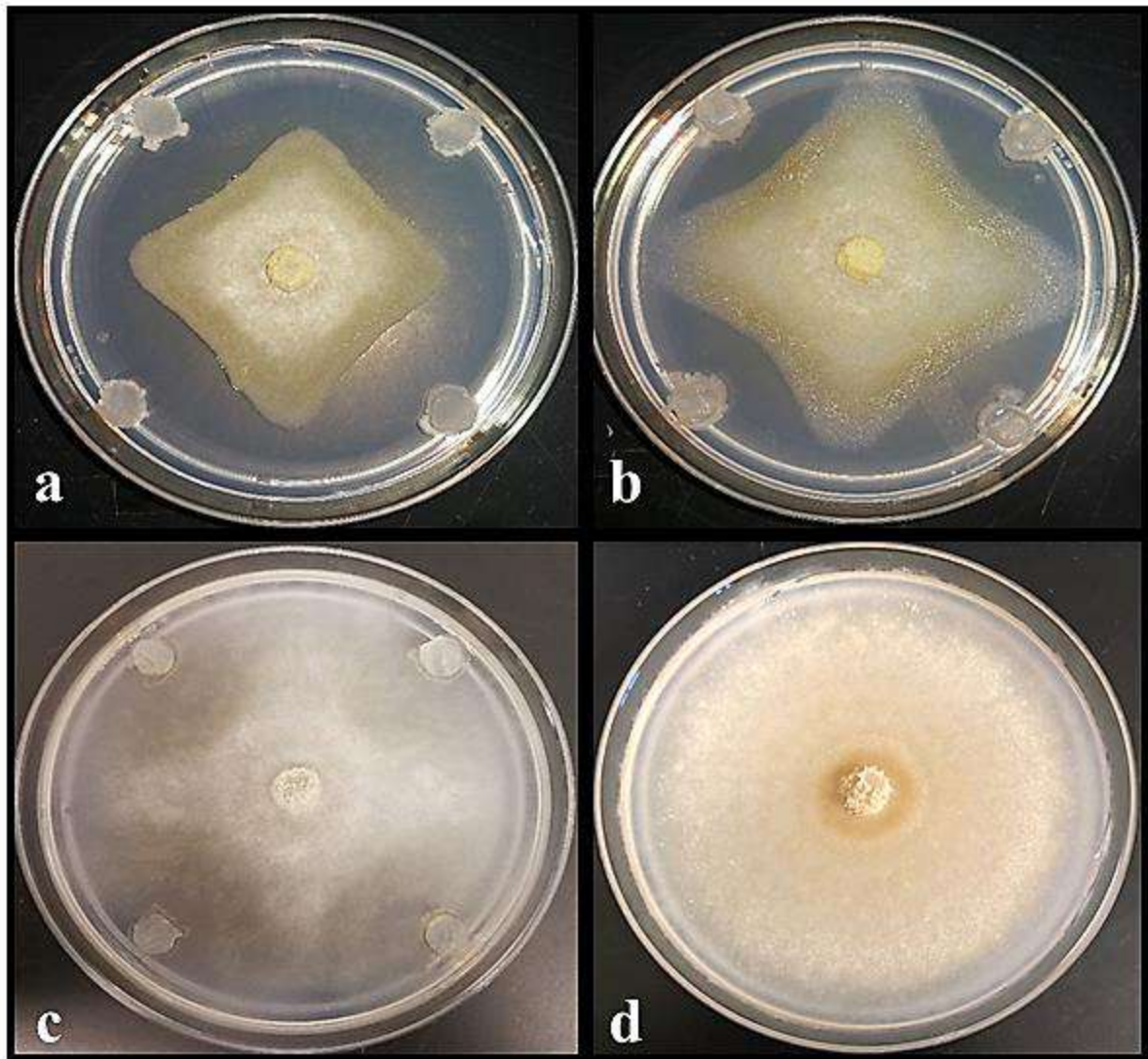
A 13. Cepas de *Trichoderma* spp. contra *Pestalotiopsis* sp. causante de la pudrición seca de fruto de guanábana. a) *T. longibrachiatum* vs *Pestalotiopsis* sp., b) *T. harzianum* vs *Pestalotiopsis* sp., c) *T. asperellum* vs *Pestalotiopsis* sp., d) Testigo al día 12.



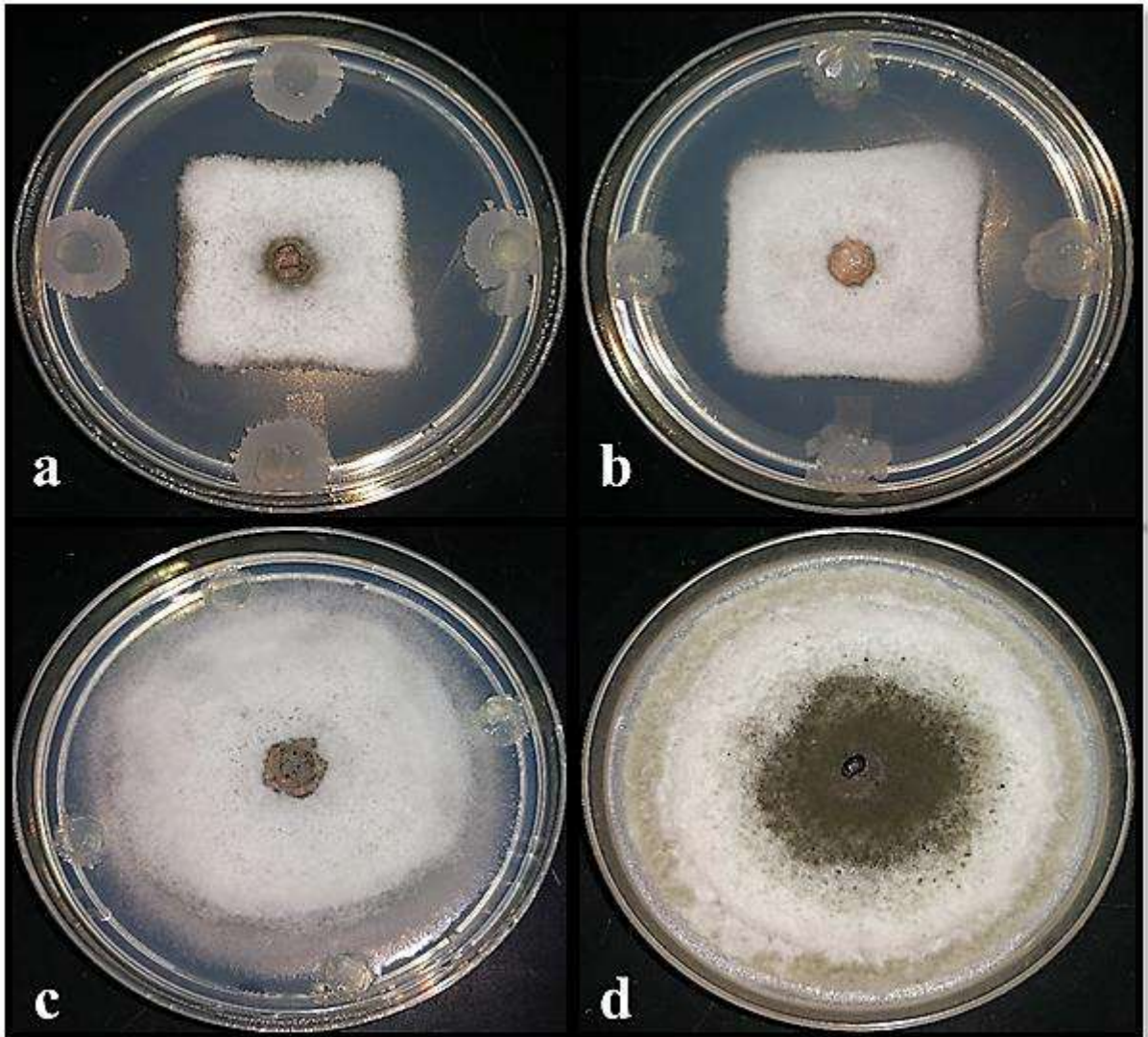
A 14. Cepas de *Trichoderma* spp. contra *Lasiodiplodia pseudotheobromae* patógeno causante de la pudrición blanda y receptáculo floral de fruto de *A. muricata*. a) *T. longibrachiatum* vs *L. pseudotheobromae*, b) *T. harzianum* vs *L. pseudotheobromae*, c) *T. asperellum* vs *L. pseudotheobromae*, d) Testigo al día 8.



A 15. Cepas *Bacillus* spp. contra *Pestalotiopsis* sp. patógeno causante de la pudrición seca de fruto de guanábana. a) *B. methylotrophicus* vs *Pestalotiopsis* sp., b) *B. amyloliquefaciens* vs *Pestalotiopsis* sp., c) *B. subtilis* vs *Pestalotiopsis* sp., d) Testigo al día 12.



A 16. Cepas de *Bacillus* spp. contra *Colletotrichum gloeosporioides* patógeno causante de la pudrición seca de fruto de *A. muricata*. a) *B. methylotrophicus* vs *C. gloeosporioides*, b) *B. amyloliquefaciens* vs *C. gloeosporioides*, c) *B. subtilis* vs *C. gloeosporioides*, d) Testigo al día 9.



A 17. Cepas de *Bacillus* spp. contra *Lasiodiplodia pseudotheobromae* agente causal de la pudrición blanda y receptáculo floral de fruto de *A. muricata*. a) *B. methylotrophicus* vs *L. pseudotheobromae*, b) *B. amyloliquefaciens* vs *L. pseudotheobromae*, c) *B. subtilis* vs *L. pseudotheobromae*, d) Testigo al día 8.

