







Supresión *in vitro* de patógenos fúngicos de raíz en *Annona muricata* L. por cepas de *Trichoderma* y fungicidas convencionales

In vitro suppression of fungal root pathogens in *Annona muricata* L. by *Trichoderma* strains and conventional fungicides

Camero-Ayón, C.B.¹ , Rios-Velasco, C.² , Luna-Esquivel, G.^{1,3} ,
López-Guzmán, G.G.^{1,3} , Estrada-Virgen, M.O.^{1,3} , Camero-Campos, O.J.^{1,3*} .

¹ Programa de Doctorado en Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit, Xalisco, Nayarit, México. C.P. 63155.

² Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Cuauhtémoc, Chihuahua, México. C.P. 31570.

³ Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit, Xalisco, Nayarit, México. C.P. 63155.



Please cite this article as/Como citar este artículo: Camero-Ayón, C.B., Rios-Velasco, C., Luna-Esquivel, G., López-Guzmán, G.G., Estrada-Virgen, M.O., Camero-Campos, O.J. (2023). *In vitro* suppression of fungal root pathogens in *Annona muricata* L. by *Trichoderma* strains and conventional fungicides. *Revista Bio Ciencias*, 10, e1497. <https://doi.org/10.15741/revbio.10.e1497>

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: April 25th 2023.

Accepted/Aceptado: July 18th 2023.

Available on line/Publicado: August 31th 2023.

RESUMEN

Fusarium falciforme y *Lasiodiplodia theobromae*, son los principales patógenos fúngicos en raíz y tallo en árboles de guanábana (*Annona muricata* L.) en Nayarit, México. A la fecha los productores de este frutal en la región no cuentan con estrategias efectivas para el control de esa patología. Por lo que, el objetivo de la investigación fue evaluar el potencial de biocontrol *in vitro* de cepas de antagonistas de *Trichoderma* y la eficacia de fungicidas convencionales. Se evaluaron *in vitro* 13 cepas de *Trichoderma* contra *F. falciforme* y *L. theobromae*. Así mismo, se evaluó la sensibilidad *in vitro* de ambos patógenos fúngicos a ocho fungicidas comerciales. Las cepas de *T. hamatum* y *T. asperellum* inhibieron el crecimiento micelial *in vitro* de *F. falciforme* hasta un 75.31 %. Por otra parte, Mancozeb fue el único fungicida que inhibió por completo el crecimiento micelial *in vitro* de ambos fitopatógenos. Los resultados sugieren el potencial uso de ambas estrategias de control para la supresión de estas enfermedades radiculares y del tallo en guanábana. Se sugiere conducir estudios adicionales relacionados con los posibles efectos sinérgicos de la combinación de ambas estrategias en la prevención y control de esta enfermedad fúngica en *A. muricata*.

PALABRAS CLAVE: Antagonismo, inhibición, moléculas químicas, guanábana, *Trichoderma*.

*Corresponding Author:

Octavio Jhonathan Camero-Campos. Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit, Xalisco, Nayarit, México. C.P. 63155. E-mail: jhony695@uan.edu.mx

ABSTRACT

Fusarium falciforme and *Lasiodiplodia theobromae* are the main root and stem fungal pathogens in soursop trees (*Annona muricata* L.) in Nayarit, Mexico. Regional fruit producers do not have effective strategies to control this pathology. Therefore, the main objective of the research was to evaluate the *in vitro* biocontrol potential of strains of *Trichoderma* antagonists and the efficacy of conventional fungicides. Thirteen *Trichoderma* strains were evaluated *in vitro* against *F. falciforme* and *L. theobromae*. Also, the *in vitro* sensitivity of both fungal pathogens to eight commercial fungicides was evaluated. The strains of *T. hamatum* and *T. asperellum* inhibited the *in vitro* mycelial growth of *F. falciforme* up to 75.31%. On the other hand, Mancozeb was the only fungicide that completely inhibited the *in vitro* mycelial growth of both phytopathogens. Obtained data suggest the potential use of both control strategies for the suppression of root and stem diseases in soursop. It is recommended to conduct additional studies on the possible synergistic effects of the combination of both strategies in preventing and controlling this fungal disease in *A. muricata*.

KEY WORDS: Antagonism, inhibition, molecules, soursop, *Trichoderma*.

Introducción

En México, se producen hasta 30 790 t de guanábana (*Annona muricata* L.) (Annonaceae) y hay un total de 3 612 ha establecidas, distribuidas en 10 estados, donde, Nayarit se posiciona como el principal productor con 2 456 ha y 23 230 t (SIAP, 2019). Por su sabor agridulce, agradable y aromático, los frutos de *A. muricata* son empleados en la industria alimentaria para su consumo en fresco, en combinación con otros frutos, o para su industrialización (Sosa *et al.*, 2022), de igual manera, este frutal tiene beneficios para la salud humana, ya que puede favorecer la digestión y tiene actividades preventivas y curativas de la obesidad, hipertensión, cáncer y enfermedades cardíacas (Clement *et al.*, 2016; Leiva *et al.*, 2018).

Sin embargo, la calidad y tamaño de los frutos de *A. muricata*, se ven afectadas por diferentes enfermedades causadas por fitopatógenos como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *C. theobromicola* Declar., que provocan antracnosis en inflorescencias, hojas y tallos (Álvarez *et al.*, 2004; Betancourt *et al.*, 2019), y algunas cepas de *Colletotrichum* spp., *L. pseudotheobromae*, *Pestalotiopsis* sp., y *Rhizopus oryzae*, que causan pudrición en frutos de guanábana (Álvarez *et al.*, 2004; Cambero *et al.*, 2019). Estas afectaciones, se suman a las provocadas por otros patógenos fúngicos como los hongos *Fusarium falciforme* (Hypocreales, Nectriaceae) (perteneciente al complejo de especies de *F. solani*) y *Lasiodiplodia theobromae*

(Pat.) Griffon and Maubl. (Botryosphaeriales, Botryosphaeriaceae) ya que, recientemente en el cultivo de guanábana en Compostela y San Blas, Nayarit, México, han sido identificados como patógenos de raíz y tallo, como causantes de necrosis, individual o como complejo [Cambero et al. (datos no publicados)]; los árboles afectados por estos patógenos, como consecuencia, disminuyen su producción, desafortunadamente, las afectaciones por estos patógenos fúngicos aún no han sido estimadas en Nayarit.

Unas de las primeras acciones que se implementan para el control de estas enfermedades en cultivos frutícolas, incluida la guanábana, es el uso de fungicidas químicos (comúnmente de amplio espectro). En huertos comerciales de guanábana del Estado de Nayarit, los productores comúnmente utilizan tiofanato de metilo, captan, mancozeb o hidróxido de cobre, para aminorar las afectaciones de las enfermedades fúngicas, sin embargo, su eficacia es baja y en ocasiones costosa, por otra parte, la información disponible sobre el uso de fungicidas para la supresión de hongos fitopatógenos en guanábana es limitada, y no se encuentra un registro disponible en la COFEPRIS para su uso (COFEPRIS, 2023).

Basado en los impactos negativos de los patógenos fúngicos en guanábana, en Nayarit y a la ineficacia de los fungicidas químicos comúnmente usados para su control, es de suma importancia buscar estrategias que contribuyan a disminuir las pérdidas causadas por estos patógenos en este frutal. Es por esto, que el uso de agentes de biocontrol microbiano como *Trichoderma* y nuevos fungicidas químicos podrían ser una alternativa prometedora para el control eficaz de *F. falciforme* y *L. theobromae*.

La capacidad antifúngica de *Trichoderma* ha sido ampliamente documentada contra hongos fitopatógenos, incluidos los miembros de los géneros *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. nygamai*, *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*, entre otros) (Martínez et al., 2018; Michel et al., 2018; Michel et al., 2019) y *Lasiodiplodia* (*L. pseudotheobromae*, *L. theobromae*, *L. citricola*, entre otros) (Valle et al., 2019; Cambero et al., 2020). Mencionado lo anterior, en busca de alguna alternativa viable para el manejo de enfermedades radicales del cultivo de guanábana de Nayarit, los objetivos del estudio fueron evaluar la sensibilidad *in vitro* de *Fusarium falciforme* y *Lasiodiplodia theobromae* a fungicidas convencionales y la inhibición de su crecimiento micelial por cepas de *Trichoderma*.

Material y Métodos

Reactivos, cepas microbianas y fungicidas

Todos los reactivos (grado analítico) utilizados, se adquirieron de Sigma Aldrichs Corp. (St. Louis, MO, USA). Los aislamientos de *Trichoderma* se obtuvieron de suelo cercano a la zona de raíces de árboles sanos de guanábana en Compostela y San Blas, Nayarit, México. También se incluyeron a *Trichoderma* sp., *T. longibrachiatum*, *T. asperellum* y *T. harzianum*, facilitados por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.), Unidad Cuauhtémoc, Chihuahua. En el caso de los fungicidas químicos evaluados, se obtuvieron de casas comerciales de la región.

Las cepas de *Lasiodiplodia theobromae* y *Fusarium falciforme*, fueron aisladas e identificadas morfológica y molecularmente [Cambero *et al.* (datos no publicados)], a partir de tejidos de raíz de árboles de guanábana enfermos de San Blas y Compostela, Nayarit, México.

Aislamiento e identificación de *Trichoderma*

Los microorganismos antagonistas se aislaron de suelo cercano a la rizósfera de árboles de guanábana con apariencia sana. En julio de 2020, en seis huertos comerciales de guanábana (Tabla 1), se recolectaron muestras de suelo (500 g por árbol) en cinco árboles ubicados en los puntos cardinales y el centro, subsecuentemente, se homogeneizaron y finalmente se recuperaron 200 g por huerto y se colocaron en bolsas plásticas transparentes (25 × 35 cm) para su procesamiento en el Laboratorio de Parasitología Agrícola del Centro Multidisciplinario de Investigación Científica 03 (CEMIC 03) de la Universidad Autónoma de Nayarit (UAN).

Tabla 1. Sitios para la recolección de muestras de suelo rizósferico en árboles de *Annona muricata* de Nayarit, México.

MUNICIPIO	HUERTO	COORDENADAS	ALTITUD
Compostela	Capomo I	N 21°07'08" W 105°10'02"	36
	Divisadero I	N 21°07'18" W 105°11'33"	94
	Tonino I	N 21°04'02" W 105°12'48"	335
San Blas	Infiernillo I	N 21°32'21" W 105°11'06"	175
	La Palma I	N 21°31'00" W 105°11'57"	9
	La Palma II	N 21°32'00" W 105°10'43"	213

El aislamiento de *Trichoderma*, se hizo mediante diluciones seriadas (1:10) del suelo. Alícuotas de 50 µL de las diluciones 10⁻⁴ a 10⁻⁶ fueron sembradas en cajas de Petri (90 × 15 mm) con medio de cultivo Papa-Dextroza-Agar (PDA). Los microorganismos fúngicos que mostraron actividad antagonica fueron purificados mediante cultivos monohifales (Moreno & Albarracín, 2012; Pérez *et al.*, 2015; Méndez *et al.*, 2017). Todos los hongos con cualidades antagonistas purificados fueron probados preliminarmente *in vitro* en cuanto a su actividad antifúngica contra *F. falciforme* y *L. theobromae*. Aquellos aislados que no mostraron propiedades antifúngicas, no se consideraron en las subsecuentes pruebas *in vitro* (Mendoza *et al.*, 2020).

Ensayos de biocontrol *in vitro* de cepas de *Trichoderma*

La habilidad de las cepas de *Trichoderma* para suprimir *in vitro* a los patógenos fúngicos *F. falciforme* y *L. theobromae*, se evaluó mediante la técnica de confrontación dual (directa). Ambos microorganismos (antagonistas y patógenos) fueron confrontados en cajas de Petri (90 × 15 mm) que contenían el medio PDA solidificado. En los ensayos de confrontación con *Trichoderma*, se usaron explantes (PDA con micelio y conidios con 7 d de crecimiento) de 6 mm de diámetro, tanto del antagonista como del patógeno. Los explantes de ambos grupos de microorganismos se inocularon simultáneamente en los extremos de las cajas de Petri que contenían medio de cultivo PDA (Bell *et al.*, 1982). En estas confrontaciones se determinó el nivel de antagonismo de acuerdo con la escala propuesta por Bell *et al.* (1982) y el tipo de antagonismo (antibiosis, micoparasitismo y/o competencia) de acuerdo con Infante *et al.* (2009).

Las cajas de Petri experimentales se incubaron a 24 ± 2 °C en oscuridad, hasta que el patógeno testigo llenó por completo la caja. El crecimiento micelial de los hongos patógenos (solos y en confrontación) se midió diariamente hasta que el patógeno testigo llenó por completo la caja de Petri (Rios *et al.*, 2016).

Pruebas de susceptibilidad *in vitro* de *F. falciforme* y *L. theobromae* a fungicidas convencionales

Se utilizó la técnica del medio envenenado de acuerdo con Alburqueque & Gusqui (2018), sobre PDA solidificado + fungicida a la dosis recomendada por el fabricante (Tabla 2) en cajas de Petri (90 × 15 mm), se colocaron explantes de 6 mm de diámetro (con crecimiento superficial de micelio y conidios de 7 d de crecimiento) del hongo patógeno. Cajas de Petri con PDA sin fungicida fueron usados como testigos. Las cajas de Petri experimentales se incubaron a 24 ± 2 °C en oscuridad hasta que el testigo llenó por completo la caja de Petri.

Identificación molecular de aislados de *Trichoderma* antifúngicos

Sólo se identificaron molecularmente las cepas (T62, T1 y T10) de *Trichoderma* que inhibieron el crecimiento micelial de los patógenos fúngicos en más del 60 %. El DNA genómico (DNAg) de *Trichoderma* se extrajo de acuerdo con las metodologías descritas por Allers & Litchen (2000) y Bobadilla *et al.* (2020), a partir del micelio fúngico con 3 d de crecimiento cultivado en medio líquido (caldo) PDB (Potato Dextrose Broth). La calidad del DNA se visualizó por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1 %.

El DNA se utilizó para amplificar el espaciador transcrito interno (ITS, por sus siglas en inglés) del rADN, con los cebadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), se empleó una etapa inicial a 94 °C/5 min, 30 ciclos a 94 °C/30 s, 60 °C/30 s, 72 °C/10 min y una elongación final a 72 °C/4 min (White *et al.*, 1990; Ruíz *et al.*, 2017). La detección de los productos del PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % por 110 min a 80V. Se utilizó el marcador de peso molecular de 100

pb (Invitrogen por Thermo Fisher Scientific®). Los productos del PCR fueron secuenciados por la empresa Macrogen en Beotkkot-ro, Geumcheon-gu, Seoul (Gasán-dong, World Meridian I), Corea del Sur. Las secuencias obtenidas se compararon con las disponibles en base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2022) mediante el algoritmo de BLAST, y finalmente se depositaron en la base de datos del NCBI.

Tabla 2. Ingredientes activos de los fungicidas convencionales usados en los ensayos *in vitro* contra *Lasiodiplodia theobromae* y *Fusarium falciforme*, ambos patógenos fúngicos de raíz y tallo en *Annona muricata*.

INGREDIENTE ACTIVO	DOSIS RECOMENDADA	GRUPO QUÍMICO
Mancozeb	12.5 g/L	Ditiocarbamato
Pidiflumetofen+Difenoconazole	5 ml/L	Triazol, Carboxamides
Clorotalonil	15 ml/L	Cloronitrilo
Carbendazim	0.5 g/L	Benzimidazol
Cyprodinil+Fludioxonil	0.75 g/L	Fenilpiroles, AP
Captan	25 g/L	Ftalimida
Mancozeb+Azoxytrobin	25 g/L	Carbamatos, Estrobilurina
Boscalid+Pyraclostrobin	4 g/L	Piridincarboxamidas, Metoxy-carbamatos

Análisis estadístico

En los enfrentamientos *in vitro* (*Trichoderma* y fungicidas vs *F. falciforme* y *L. theobromae*), se utilizaron nueve cajas de Petri en cada enfrentamiento y un grupo testigo (cultivo del fitopatógeno en ausencia de los antagonistas-fungicidas). En ambos patógenos fúngicos se evaluó la Inhibición del Crecimiento Micelial (ICM) por *Trichoderma*, con la fórmula $ICM = (R1 - R2) / R1 \times 100$, donde R1 es el radio del patógeno testigo (*F. falciforme*-*L. theobromae*) y R2 es el radio del patógeno en el enfrentamiento (Rios *et al.*, 2016). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado de forma independiente. Los datos de ICM se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) con el Statistical Analysis System versión 9.0, 2002 (SAS, 2002), y las medias fueron separadas con la prueba de Tukey ($p = 0.05$).

Resultados y Discusión

Aislamiento de microorganismos antagonistas y su confrontación *in vitro*

Se aislaron en total 12 hongos del género *Trichoderma*, 10 aislados de Compostela y dos de San Blas, de los cuales, en las pruebas preliminares *in vitro*, sólo nueve mostraron actividad antagónica contra *Fusarium falciforme* y *Lasiodiplodia theobromae*. Pueden existir diferentes especies de antagonistas, ya que, la rizósfera se considera un ecosistema complejo, con una gran diversidad de microorganismos (Sokolova, 2015), en donde las condiciones climáticas, o del suelo, son determinantes para la supervivencia de las comunidades microbianas (Ordóñez et al., 2020).

Inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *Fusarium falciforme* y *Lasiodiplodia theobromae* por *Trichoderma*

Las cepas evaluadas mostraron potencial antifúngico contra *F. falciforme* y *L. theobromae*, luego de 13 y dos días de incubación, respectivamente (Figura 1). Los valores de inhibición del crecimiento micelial por las cepas de *Trichoderma* oscilaron entre el 0 a 21.72 % para *L. theobromae* y 32.13 a 75.31 % para *F. falciforme*. Los aislados T1, T10 y T62 de *Trichoderma* nativos de suelos cercanos a la zona de raíces de árboles de guanábana inhibieron el crecimiento de *F. falciforme* en más del 64.05 %, pero contra *L. theobromae* la inhibición de su crecimiento por estas tres cepas de *Trichoderma* fue menor al 11.84 %. El aislado T62 fue el más efectivo en inhibir hasta el 75.31 % el crecimiento del micelio de *F. falciforme* (Figura 1b). Los valores de inhibición de *Trichoderma* en *F. falciforme* de nuestro estudio se encuentran entre los rangos reportados en otras especies de *Fusarium*, Rios et al. (2016) reportaron inhibiciones del crecimiento micelial en *F. oxysporum* de 43.3 a 52.3 %, por cepas de *T. asperellum*. Por otra parte, Cambero et al. (2020) registraron inhibiciones del crecimiento micelial de 49.5 % a 57.9 % contra *L. pseudotheobromae* con cepas de *Trichoderma* (*T. longibrachiatum*, *T. harzianum* y *T. asperellum*) proporcionadas por el CIAD, A.C., Unidad Cuautemoc, Chihuahua.

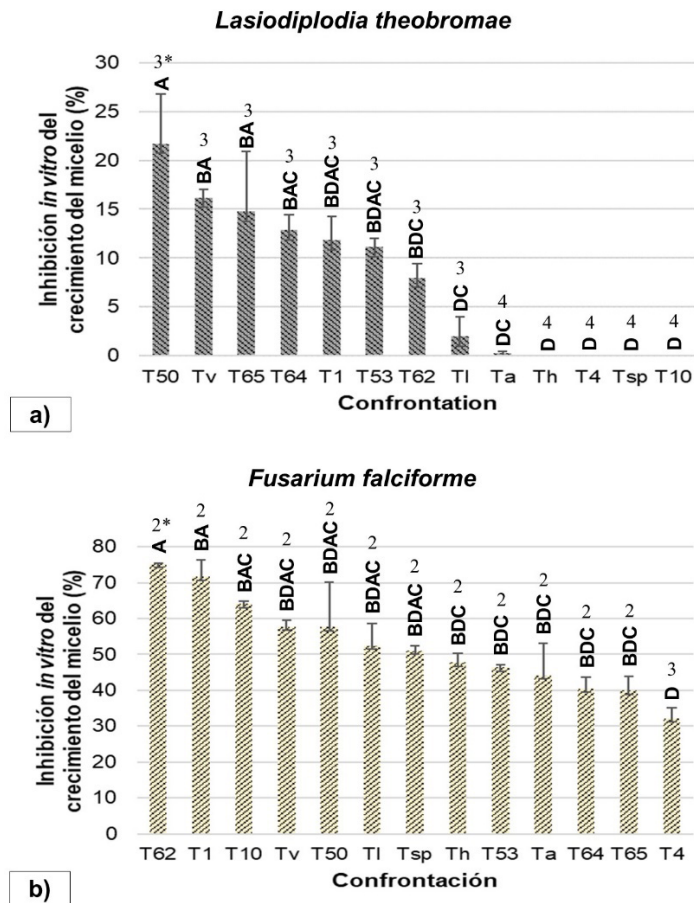


Figura 1. Inhibición de crecimiento micelial de los hongos patógenos *Lasiodiplodia theobromae* y *Fusarium falciforme* por aislados de *Trichoderma*.

Literales iguales dentro de la misma columna muestran igualdad estadística de acuerdo con la prueba de Tukey ($p = 0.05$). 2*, 3* y 4*= Nivel en la escala de Bell *et al.* (1982).

Así mismo, Bhadra *et al.* (2014) reportaron inhibiciones del crecimiento micelial de *L. theobromae* de hasta 80 % con *T. koningii* y *T. viridae* atribuyendo la capacidad antifúngica de estas cepas al micoparasitismo y a su rápido crecimiento, permitiéndoles competir por el espacio y los nutrientes disponibles. Los valores de inhibición del crecimiento micelial de *L. theobromae* por *Trichoderma* fueron menores (Figura 1a) a los documentados contra *F. falciforme*, esto posiblemente se debe a que en este estudio *L. theobromae* tuvo la capacidad de crecer rápidamente y llenar por completo la caja de Petri en sólo dos días después de la siembra,

teniendo un crecimiento más rápido que el de *Trichoderma* spp. De igual manera, cabe mencionar que los aislados de *Trichoderma* nativos, presentaron porcentajes de inhibición de crecimiento micelial más altos que los evidenciados por las cepas proporcionadas por el CIAD A.C., lo que posiblemente indica que tienen más probabilidad de adaptarse a las condiciones climatológicas de las zonas productoras de *A. muricata* de Nayarit.

Trichoderma suprime a patógenos fúngicos mediante diferentes mecanismos, tales como, micoparasitismo, antibiosis, competencia por espacio, luz y nutrientes, así como la estimulación de crecimiento de las plantas (Martínez et al., 2013). La competencia por espacio y nutrientes disponibles fue el mecanismo de biocontrol evidenciado en nuestras cepas de *Trichoderma* sobre los patógenos *L. theobromae* y *F. falciforme*. Los hongos del género *Trichoderma* han sido reportados como agentes de biocontrol microbiano exitoso de especies fitopatógenas de *Fusarium* (Sánchez et al., 2017), tales como *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*, *F. roseum* (Infante et al., 2009; Schuster & Schmoll, 2010) y de *Lasiodiplodia* como *L. pseudotheobromae* (Cambero et al., 2020).

Sensibilidad *in vitro* de *F. falciforme* y *L. theobromae* a fungicidas convencionales

La sensibilidad *in vitro* de los patógenos a fungicidas evaluados se muestra en la Figura 2. Ambos patógenos mostraron sensibilidad a los ocho fungicidas evaluados, con inhibiciones de crecimiento micelial superiores al 74.55 %. *Fusarium falciforme* y *L. theobromae*, fueron inhibidos por completo (100 %) sólo con el fungicida Mancozeb, esto posiblemente a que pertenece al grupo de los ditio carbamatos, capaz de inhibir proteínas motoras y actividad multisitio (Medina et al., 2022). Los fungicidas Cyprodinil+Fludioxonil y Mancozeb+Azoxyestrobina inhibieron en un 100 % el crecimiento micelial de *L. theobromae*. *Fusarium falciforme* fue menos sensible a los fungicidas Boscalid+Pyraclostrobina y Clorotalonil (Figura 2).

Piñeros et al. (2019) evidenciaron alta sensibilidad (100 % de ICM) en *F. subglutinans* y *F. graminearum* a los fungicidas Prochloraz+Difenoconazole, Carboxin+Captan y Tebuconazole+Trifloxystrobina. Michael et al. (2018), obtuvieron ICM de 76.67 % en *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* con el fungicida Metalaxil+Clorotalonil. Mientras que, Tovar et al. (2013) proponen la utilización de Ciprodinil+Fludioxonil, Piraclostrobina+Boscalid, Prochloraz, Tebuconazol e Iprodina por ser los fungicidas más efectivos en el control *in vitro* de *L. theobromae* en mamey. Los fungicidas pertenecen a diferentes grupos químicos, por ende, tienen diferente modo de acción, estos pueden inhibir el crecimiento del micelio, la germinación de conidios, la respiración, alterar la membrana celular, entre otros (FRAC, 2020), sin embargo, en respuesta a la presión ejercida por los fungicidas, los hongos fitopatógenos pueden adquirir resistencia o perder sensibilidad a estos (Li et al., 2020). Para evitar que los patógenos desarrollen resistencia a los fungicidas, se sugiere usar sistémicos y de contacto de manera rotativa o en combinación (Denman et al., 2004).

Ambos patógenos fúngicos (*F. falciforme* y *L. theobromae*) mostraron crecimiento micelial 10 d después de haber sido tratados con los fungicidas, evidenciando sólo una acción fungistática por Mancozeb+Azoxyestrobina, Boscalid+Pyraclostrobina, Pidiflumetofen+ Difenoconazole y Clorotalonil, posiblemente estos fungicidas no inhiben por completo la germinación de conidios

de estos agentes causales, lo cual, es fundamental para un control químico exitoso de hongos fitopatógenos en plantas (Shin *et al.*, 2014), el desarrollo de resistencia a los fungicidas puede ser una de las principales razones (Moreira *et al.*, 2021).

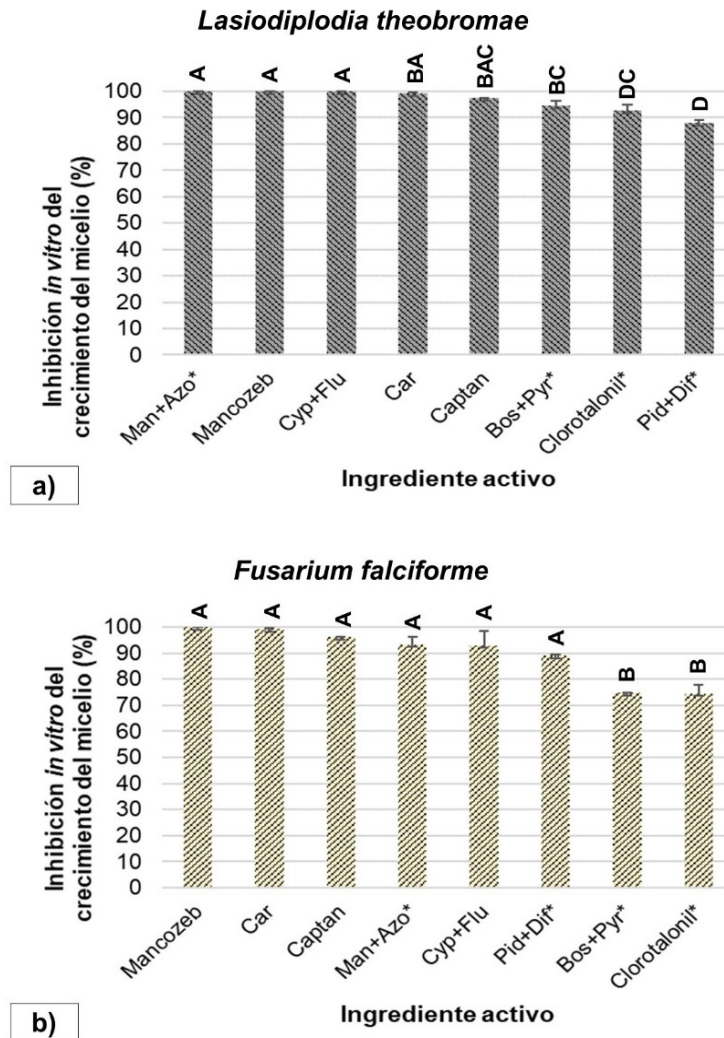


Figura 2. Sensibilidad *in vitro* de *Lasiodiplodia theobromae* y *Fusarium falciforme* a fungicidas convencionales.

Medias (\pm error estándar) con literales iguales indican igualdad estadística de acuerdo con la prueba de Tukey ($p = 0.05$). Man+Azo: Mancozeb+Azoxyestrobina; Cyp+Flu: Cyprodinil+Fludioxonil; Bos+Pir: Boscalid+Piraclostrobina; Pid+Dif: Pidiflumetofen+Difenoconazol; Car: Carbendazim; *El microorganismo evaluado contra ese fungicida, siguió con un crecimiento muy lento (sin medición).

Estas alternativas de control se pueden considerar en un manejo integrado de enfermedades y realizar un diagnóstico oportuno nos permitirá tener mejores resultados. Por otra parte, el uso de microorganismos puede aplicarse de manera preventiva, y utilizar los fungicidas únicamente en casos donde la problemática empiece a sobrepasar ese umbral económico.

Aislados nativos de *Trichoderma* antifúngicos identificados molecularmente

De los nueve aislados de *Trichoderma* provenientes de los municipios de Compostela y San Blas, Nayarit, México, sólo se identificaron los aislados (T62, T1, T10) por inhibir >60 % el crecimiento micelial del *Fusarium falciforme*. De acuerdo con sus caracteres moleculares y al compararlos con secuencias disponibles en la base de datos del NCBI, se obtuvo un 100 % de similitud del aislado T62 con *T. hamatum*, el T1 con *T. asperellum* y el aislado T10 con *T. asperellum*. Las secuencias de estos aislados fueron dadas de alta en el GenBank bajo los siguientes números de accesión (OQ696060, OQ696061 y OQ696062, respectivamente). Cabe mencionar, que, es el primer registro de estos antagonistas en huertas comerciales de guanábana del estado de Nayarit, México. Cepas de *T. hamatum*, han sido identificadas en Catamarca, Argentina, con capacidad antagónica contra *Verticillium dahliae* KLEB (González et al., 2021), por otra parte, *T. asperellum* ha sido identificado en Perú en huertos de aguacate (*Persea americana* Mill.) con potencial de biocontrol contra *Phytophthora cinnamomi* (Morales et al., 2020), aunque existe una amplia diversidad de especies de *Trichoderma* como, *T. asperellum*, *T. atroviridae*, *T. koningopsis*, *T. piluliferum*, *T. viridae* por mencionar algunos (Sánchez et al., 2018).

Conclusiones

Los aislados de *Trichoderma* spp. inhibieron exitosamente a *F. falciforme*. *Trichoderma hamatum* (T62) inhibió en mayor medida el crecimiento micelial de *F. falciforme*. *Lasiodiplodia theobromae* fue menos susceptible ante las cepas de *Trichoderma*. Por otra parte, ambos patógenos fúngicos fueron inhibidos 100 % por Mancozeb, mientras que *Lasiodiplodia theobromae* también fue inhibido por completo por Cyprodinil+Fludioxonil. Los efectos antifúngicos *in vitro* sobre *F. falciforme* y *L. theobromae* tanto de *Trichoderma* como de los fungicidas evaluados son promisorios. Por lo que, sugiere conducir experimentos antifúngicos *in situ* o en campo, para demostrar esta misma eficacia antifúngica.

Contribución de los autores

C. A. C. B. Desarrollo de la metodología, manejo de datos; **R. V. C.** Validación experimental; **L. E. G.** Validación experimental; **L. G. G. G.** Desarrollo de metodología; **E. V. M. O.** Conceptualización del trabajo, validación experimental; **C. C. O. J.** Adquisición de fondos, administrador de proyecto, validación experimental.

“Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo”.

Financiamiento

Esta investigación fue financiada por el “Fondo Sectorial de Investigación en Materia Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agrobiotecnología y Recursos Fitogenéticos” Núm. 266891.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) y a la Universidad Autónoma de Nayarit.

Conflicto de interés

“Los autores declaran no tener conflicto de interés”.

Referencias

- Albuquerque, A. D., & Gusqui, M. R. (2018). Eficacia de fungicidas químicos para el control *in vitro* de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas. *Arnaldoa*, 25(2), 489-498. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25209>
- Álvarez, E., Ospina, C., Mejía, J., & 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. https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/44257/Caract_colletotrichum%20EAlvarez1%20_2.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Allers, T., & Lichten, M. (2000). A method for preparing genomic DNA that restrains branch migration of Holliday junctions. *Nucleic Acids Research*, 28(2), 26-28. <https://doi.org/10.1093/nar/28.2.e6>
- Bell, D. K., Well, H. D., & Markham, C. R. (1982). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72(4), 379-382. <https://doi.org/10.1094/phyto-72-379>
- Betancourt, A. A., Cambero, C. J., Rios, V. C., Cruz, C. E., Cambero, A. C., & Luna, E. G. (2019). *In vitro* evaluation of antagonistic microorganisms and fungicides against *Colletotrichum theobromicola* Delacr, causal agent of anthracnose on soursop (*Annona muricata* L.) inflorescences. *Revista Bio Ciencias*, 6, 1-13. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e678>
- Bhadra, M., Khair, A., Hossain, A., & Sikder, M. (2014). Efficacy of *Trichoderma* spp. and fungicides against *Lasiodiplodia theobromae*. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 49(2), 125-130. <https://doi.org/10.3329/bjsir.v49i2.22008>
- Bobadilla, C. G., Magallón, S. P., López, V. M., Palomino, H. Y., Ramírez, R. J., Gutiérrez, L. R., Ibarra, C. L., & Bautista, R. P. (2020). Characterization and proliferation capacity of

- potentially pathogenic fungi in marine and freshwater fish commercial feeds. *Archives of Microbiology*, 202(9), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01954-4>
- Cambero, A. C., Luna, E. G., Rios, V. C., Díaz, H. M., Rodríguez, P. M., Betancourt, A. A., & Cambero, C. J. (2019). Causal agents of rot in soursop fruit (*Annona muricata* L.) in Nayarit, Mexico. *Revista Bio Ciencias*, 6, 1-13. <http://dx.doi.org/10.15741/revbio.06.e538>
- Cambero, A. C., Luna, E. G., Rios, V. C., Estrada, V. O., Betancourt, A. A., & Cambero, C. J. (2020). Evaluación *in vitro* de antagonistas contra patógenos de fruto de guanábana (*Annona muricata* L.) en Nayarit, México. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 42(2), 1-6. <https://doi.org/10.1590/0100-29452020147>
- Cambero, A. C., Rios, V. C., Luna, E. G., López, G. G., Estrada, V. O., & Cambero, C. O. (Datos no publicados). Patógenos causantes de pudrición de raíz en guanábana (*Annona muricata* L.), en Nayarit, México. *Manuscrito presentado para publicación*.
- Clement, Y., Mahase, V., Jagroop, A., Kisson, K., Maharaj, A., Mathura, P., Quan, M., Ramadhin, D., & Mohammed, C. (2016). Herbal remedies and functional foods used by cancer patients attending specialty oncology clinics in Trinidad. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1380-x>
- Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios [COFEPRIS]. (2023, march 23). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. <http://siipris03.cofepris.gob.mx/Resoluciones/Consultas/ConWebRegPlaguicida.asp>
- Denman, S., Crous, P., Sadie, A., & Wingfield, M. (2004). Evaluation of fungicides for the control of *Botryosphaeria protearum* on *Protea magnifica* in the Western Cap Province of South Africa. *Australasian Plant Pathology*, 33, 97-102. <https://doi.org/10.1071/ap03080>
- Fungicide Resistance Action Committee [FRAC]. (2020, May 23). Mode of action group. <https://www.frac.info/fungicide-resistance-management/by-frac-mode-of-action-group>
- González, B. M., Picón, M. C., & Bellone, C. (2021). Evaluación de la capacidad antagonica de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Verticillium dahliae* en la provincia de Catamarca. *Revista FAVE – Ciencias Agrarias*, 20(2), 33-44. <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar/publicaciones/index.php/FAVEAgrarias/article/view/10623/14124>
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14-21. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v24n1/rpv02109.pdf>
- Leiva, G.S., Gayoso, B.G., & Chang, C.L. (2018). *Annona muricata* L. “soursop” (Annonaceae), a fruit used for feeding in Ancient Peru. *Arnaldoa*, 25(1), 127-140. <http://www.scielo.org.pe/pdf/arnal/v25n1/a08v25n1.pdf>
- Li, Y., Tsuji, S., Hu, M., Cámara, S., Michereff, S., Schnabel, G., & Chen, F. (2020). Characterization of difenoconazole resistance in *Lasiodiplodia theobromae* from papaya in Brazil. *Pest Management Science*, 76(4), 1344-1352. <https://doi.org/10.1002/ps.5645>
- Martínez, B., Infante, Caraballo, W., Duarte, Y., & Echevarría, H. (2018). Antagonismo de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg frente a aislamientos de *Fusarium* spp. procedentes de garbanzo. *Revista de Protección Vegetal*, 33(2), 1-13. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v33n2/2224-4697-rpv-33-02-e07.pdf>
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 1-11. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n1/rpv01113.pdf>

- Medina, O. F., Gutiérrez, D. A., Ochoa, A. S., & Sinagawa, G. S. (2022). *In vitro* sensitivity of *Fusarium sacchari* isolated from sugar cane to five fungicides. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 40(3), 447-457. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2206-1>
- Méndez, U. J., Flores, H. M., & Páramo, A. L. (2017). Isolation and identification of *Bacillus subtilis* and evaluation of antagonism *in vitro* against phytopathogenic fungi. *Nexo Revista Científica*, 30(2), 96-110. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6483874.pdf>
- Mendoza, H. Y., Rios, V. C., Cambero, C. J., De Dios, Á. N., Pérez, C. D., Rodríguez, G. R., & Estrada, V. M. (2020). Actinomicetos antagonistas a *Colletotrichum* sp. Penz. en el cultivo de mango en Nayarit, México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 7(2), 1-9. <https://www.scielo.org.mx/pdf/era/v7n2/2007-901X-era-7-02-00007.pdf>
- Michel, A. A., Ariza, F. R., Otero, S. M., Barrios, A. A., & Quiroz, M. A. (2018). Efectividad *in vitro* e *in situ* de fungicidas químicos y biológicos en el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* y *Uromyces transversalis* en gladiola. *Agro Productividad*, 7(3), 3-11. <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/518/398>
- Michel, A. A., Hernández, M. J., Toledo, A. R., Sabino, L. J., & Romero, R. T. (2019). Capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. nativa contra *Phytophthora parasítica* y *Fusarium oxysporum* aislados de cultivos de Jamaica. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 42(3), 235-241. <https://doi.org/10.35196/rfm.2019.3.235-241>
- Morales, T. E., Lino, N. M., Ortega, R. E., & Castellanos, S. P. (2020). Evaluación de la capacidad antagónica *in vitro* de cepas de *Trichoderma* spp. frente a *Phytophthora cinnamomi*, fitopatógeno de *Persea americana* (Palta). *Ciencia e Investigación*, 23(1), 65-70. <https://doi.org/10.15381/ci.v23i1.18754>
- Moreira, M. A., Cedeño, M. Á., Canchingnia, M. F., & Garcés, F. F. (2021). *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl [(syn.) *Botryodiplodia theobromae* Pat] in the cocoa crop: symptoms, biological cycle, and strategies management. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 653-662. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.068>
- Moreno, J., & Albarracín, V. (2012). Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. *Reduca (Biología)*. *Serie Microbiología*, 5(5), 79-93. <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/963/996>
- National Center for Biotechnology Information [NCBI]. (2022, October 20). Gen Bank. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Ordóñez, B. V., Orduño, C. N., Rios, V. C., Jacobo, C. J., Hernández, D. C., & Acosta, M. C. (2020). Characterization of Rhizobacteria associated with *Vitis vinifera* and its interaction *in vitro* with *Entomopathogenic* fungi. *Eurastan Soil Science*, 53(10), 1469-1479. <https://doi.org/10.1134/s1064229320100130>
- Pérez, C. D., García, G. N., Gallegos, M. G., Ruiz, C. M., Berlanga, R. D., & Rios, V. C. (2015). Isolation of actinomyces associated to apple trees rhizosphere antagonistic to *Fusarium equiseti*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(7), 1629-1638. <https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v6n7/v6n7a16.pdf>
- Piñeros, G. N., Maldonado, A. G., & Gómez, C. S. (2019). Effect of thermal and *in vitro* fungicide treatments on pathogens of the genus *Fusarium* associated with maize seeds. *Agronomía Colombiana*, 37(3), 228-238. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v37n3.80302>
- Rios, V. C., Caro, C. J., Berlanga, R. D., Ruiz, C. M., Ornelas, P. J., Salas, M. M., Villalobos P. E., & Guerrero, P. V. (2016). Identificación y actividad antagónica *in vitro* de aislados de

- Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. contra hongos fitopatógenos comunes. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(1), 84-99. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v34n1/2007-8080-rmfi-34-01-00085-es.pdf>
- Ruíz, C. M., Rios, V. C., Berlanga, R. D., Ornelas, P. J., Acosta, M. H., Romo, C. A., Zamudio, F., & Pérez, C. D. (2017). Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology*, 35(3), 437-462. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v35n3/2007-8080-rmfi-35-03-00437-en.pdf>
- Sánchez, G. B., Espinosa, H. E., Villordo, P. E., Rodríguez, G. R., & Mora, A. M. (2017). *Trichoderma* spp. native strains molecular identification and *in vitro* antagonistic evaluation of root phytopathogenic fungus of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. *Montcalm*. *Agrociencia*, 51, 63-79. <https://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v51n1/1405-3195-agro-51-01-00063-en.pdf>
- Sánchez, H. L., Arias, M. R., Rosique, G. J., & Pacheco, F. C. (2018). Diversidad del género *Trichoderma* (Hypocraceae) en un área natural protegida en Tabasco, México. *Acta Botánica Mexicana*, 123, 1-20. <https://doi.org/10.21829/abm123.2018.1269>
- Schuster, A., & Schmoll, Monika. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 787-799. <https://doi.org/10.1016/c2012-0-00434-6>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP]. (2019, March 23). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Shin, J., Han, J., Lee, J., & Kim, K. (2014). Characterization of the maize stalk rot pathogens *Fusarium subglutinans* and *F. temperatum* and the effect of fungicides on their mycelial growth and colony formation. *Plant Pathology Journal*, 30(4), 397-406. <https://doi.org/10.5423/ppj.oa.08.2014.0078>
- Sokolova, T. A. (2015). Specificity of soil properties in the rhizosphere: Analysis of literature data. *Eurasian Soil Science*, 48, 968-980. <https://doi.org/10.1134/s1064229315050099>
- Sosa, C. I., Pareja, A. J., Mugarte, M. A., Chel, G. L., & Betancur, A. D. (2022). Propiedades, beneficios y efectos de la guanábana (*Annona muricata* L.) sobre la glucemia y el cáncer. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 9(2), 86-101. <https://doi.org/10.23850/24220582.4976>
- Tovar, P. J., Mora, A. J., Nava, D. C., Téliz, O. D., Villegaz, M. Á., & Leyva, M. S. (2013). Control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of dieback of sapote mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn] grafts in Mexico. *Revista Fitotécnica Mexicana*, 36(3), 233-238. <https://doi.org/10.35196/rfm.2013.3.233>
- Valle, P. M., Guillén, S. D., Alia, T. I., López, M. V., Juárez, L. P., Martínez, F. E., Hernández, A. M., & Ariza, F. R. (2019). Control *in vitro* de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl y *L. citricola* Abdollahz aislados de lima Persa (*Citrus latifolia* Tanaka) en Morelos, México. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 5, 4-10. <https://doi.org/10.30973/aap/2019.5.0051001>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. (Ed.), *PCR protocols: A guide to methods and applications*. (pp. 315-322). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>