



***In vitro* evaluation of antagonistic microorganisms and fungicides against *Colletotrichum theobromicola* Delacr, causal agent of anthracnose on soursop (*Annona muricata* L.) inflorescences**

Evaluación *in vitro* de microorganismos antagonistas y fungicidas contra *Colletotrichum theobromicola* Delacr, causante de antracnosis en inflorescencias de guanábana (*Annona muricata* L.)

Betancourt-Aranguré, A.¹, Cambero-Campos, O. J.², Rios-Velasco, C.³, Cruz-Crespo, E.², Cambero-Ayón, C. B.¹, Luna-Esquivel, G.^{2*}.

Universidad Autónoma de Nayarit, ¹Programa de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias.

²Unidad Académica de Agricultura, Carretera Tepic-Compostela Km.9., C.P. 63155, Xalisco Nayarit, México.

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

Cite this paper/Como citar este artículo: Betancourt-Aranguré, A., Cambero-Campos, O. J., Rios-Velasco, C., Cruz-Crespo, E., Cambero-Ayón, C. B., Luna-Esquivel, 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, e678. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e678>



ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the *in vitro* antagonism of six strains of microorganisms on *Colletotrichum theobromicola* Delacr, the causal agent of anthracnose in soursop (*Annona muricata* L.) inflorescences in Nayarit, Mexico. Three strains of *Trichoderma* (*T. asperellum*, *T. harzianum* and *T. longibrachiatum*), three strains of *Streptomyces* [*Streptomyces* sp. (A7), *S. tubercidicus* (A19), and *S. viridochromogenes* (A27)] and seven commercial fungicides Maxtrobyn® (azoxystrobin SC), ExCitrus® (Citric extract + quercetin), Canelys® (*Cinnamomum zeylanicum* extract), Hidrocu® PH (Copper hydroxide), Pull75WG® (cuprous oxide), Score® 250 EC (Difenoconazole) and Switch® 62.5 WG (cyprodinil +

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: February 5th 2019.

Accepted/Aceptado: August 30th 2019.

Available on line/Publicado: September 3rd 2019.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio consistió en evaluar el antagonismo *in vitro* de seis cepas de microorganismos sobre *Colletotrichum theobromicola* Delacr, causante de antracnosis en inflorescencias de *Annona muricata* L. en Nayarit, México. Se usaron tres cepas de *Trichoderma* (*T. asperellum*, *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*), tres de *Streptomyces* [*Streptomyces* sp. (A7); *S. tubercidicus* (A19), y *S. viridochromogenes* (A27)] y siete fungicidas comerciales Maxtrobyn® (azoxistrobina SC), ExCitrus® (Extracto cítrico + quercetina), Canelys® (Extracto de *Cinnamomum zeylanicum*), Hidrocu® PH (Hidróxido de cobre), Pull75WG® (óxido cuproso), Score® 250 EC (Difenoconazol) y Switch® 62.5 WG (cyprodinil + fludioxonil). Las dosis evaluadas de los fungicidas fueron: D1 (mitad de la dosis recomendada), D2 (dosis recomendada), y D3 (dosis recomendada más la mitad de ésta), partiendo de las dosis recomendadas por el fabricante. Los seis antagonistas mostraron un alto porcentaje de inhibición de crecimiento radial, superior a 80 %, destacando el género *Streptomyces* al inhibir hasta

*Corresponding Author:

Gregorio Luna-Esquivel, Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad Académica de Agricultura, Xalisco, Nayarit, México. Carretera Tepic-Compostela Km. 9. C.P. 63155. Phone: (311) 211 1163. E-mail: gollole@hotmail.com.

fludioxonil) were used. The fungicides doses were: D1 (half of the recommended dose), D2 (recommended dose), and D3 (recommended dose plus half of it), according to the doses recommended by the manufacturer. The six antagonists showed more than 80 % of radial growth inhibition, the genus *Streptomyces* was the most efficient inhibiting up to a 90 % the growth of *C. theobromicola*. Strain A27 completely inhibited the fungi (100 %), followed by strains A19 (96.18 %) and A7 (90.4 %). SCORE® 250 EC, Canelys® and Hidrocu® PH fungicides showed a 100 % *in vitro* inhibition of *C. theobromicola* with the three doses analyzed. The results of this study demonstrate the potential of *Streptomyces* spp. strains and commercial fungicides for the control of *C. theobromicola*, which can be further used in the integrated management for controlling anthracnose in soursop.

KEY WORDS

Chemical and biological control, soursop, phytopathogen, *Trichoderma*, *Streptomyces*, Nayarit.

Introduction

In soursop (*Annona muricata* L.), anthracnose is mainly attributed to the genus *Colletotrichum* and is considered the most economically important disease, because it causes necrosis and loss of inflorescences and fruits throughout the year. The highest incidence of this disease occurs during the periods of precipitation with high relative humidity (90 %), it also attacks leaves, buds and young branches (Rondón, 1999; Villanueva *et al.*, 2006; Andrades *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2014a). The affected inflorescence petals show small brown-black color, which are enlarged and sink, causing the premature fall of petals and even the total loss of the floral structure (Álvarez *et al.*, 2002; Hernández, 2013; Hernández *et al.*, 2014b). *Colletotrichum theobromicola* Delacr (sin. *C. fragariae*) belongs to the Glomerellaceae family of the Glomerellales order and the class Sordariomycetes, this species is widely distributed in tropical and subtropical regions, in a wide range of hosts such as strawberry (*Fragaria × ananassa*), cocoa (*Theobroma cacao*) and Annona (*Annona diversifolia*) (Rojas *et al.*, 2010; Weir *et al.*, 2012). Losses greater than 90 % in non-technified orchards have been recorded in Colombia (Álvarez *et al.*, 2002). Hernández *et al.* (2014b) reported a 75.92 % anthracnose in soursop caused by *Colletotrichum* in Veracruz, Mexico. The state

en un 90 % el crecimiento de *C. theobromicola*. La cepa A27 lo inhibió por completo (100 %), seguido por las cepas A19 (96.18 %) y A7 (90.4 %). Los fungicidas SCORE® 250 EC, Canelys® e Hidrocu® PH mostraron un 100 % de inhibición *in vitro* de *C. theobromicola* con las tres dosis probadas. Los resultados de este estudio demuestran el potencial de cepas de *Streptomyces* spp. y de fungicidas comerciales para el control de *C. theobromicola*, los cuales son candidatos para ser usados en el manejo integrado de antracnosis en guanábana.

PALABRAS CLAVE

Control químico y biológico, guanábana, fitopatógeno, *Trichoderma*, *Streptomyces*, Nayarit.

Introducción

En guanábana (*Annona muricata* L.), la antracnosis se atribuye principalmente al género *Colletotrichum* y es considerada la enfermedad de mayor importancia económica, ya que provoca necrosamiento y pérdida de inflorescencias y frutos durante todo el año. La mayor agresividad de la enfermedad ocurre durante los periodos de precipitación con humedad relativa superior al 90 %, además ataca hojas, brotes y ramas jóvenes (Rondón, 1999; Villanueva *et al.*, 2006; Andrades *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2014a). Los pétalos de las inflorescencias afectadas muestran pequeñas lesiones de color café a negro, las cuales se agrandan y hundeen, causando la caída prematura de pétalos e inclusive la pérdida total de la estructura floral (Álvarez *et al.*, 2002; Hernández, 2013; Hernández *et al.*, 2014b). *Colletotrichum theobromicola* Delacr (sin. *C. fragariae*) pertenece a la familia Glomerellaceae del orden Glomerellales y a la clase Sordariomycetes, esta especie se encuentra ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales, en una amplia gama de hospedadores como, fresa (*Fragaria × ananassa*), cacao (*Theobroma cacao*) y anona (*Annona diversifolia*) (Rojas *et al.*, 2010; Weir *et al.*, 2012). En Colombia se han registrado pérdidas superiores al 90 % en huertos no tecnificados (Álvarez *et al.*, 2002). En Veracruz, México, Hernández *et al.* (2014b) registraron una incidencia del 75.92 % de antracnosis en guanábana causada por *Colletotrichum*. En México, el estado de Nayarit es el principal productor de guanábana, responsable del 75.6 % correspondiente a una producción

of Nayarit is the main soursop producer in Mexico, with a production of 21,810.86 t, corresponding to 75.6 % of the total production (SIAP, 2017). The anthracnose caused by *C. gloeosporioides* can diminish up to 90 % of the soursop yield (Pinto et al., 2005). Therefore, the damages caused by this phytopathogenic fungus reaffirm the need to develop and evaluate new, efficient and environmentally friendly fungicides (Juárez et al., 2010). In addition, the use of broad-spectrum chemical fungicides is currently being regulated for inducing resistance in target organisms and due to the adverse effects on the environment and human health (Astúa et al., 1994). The use of antagonistic microorganisms as biological control agents is one of the alternatives that have demonstrated potential in the control of pathogenic diseases (Carrillo et al., 2005), mainly in strains of the genera *Bacillus*, *Trichoderma* and *Streptomyces*, showing antimicrobial potential against the phytopathogens such as *Moniliophthora*, *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Stemphylium*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Pseudomonas*, *Pectobacterium* and *Bacillus* (Chavarría et al., 2005; Rodríguez & Veneros 2011; Rincón et al., 2014; Pérez-León et al., 2015; Rios-Velasco et al., 2016; Tenorio & Mollinedo, 2016; Evangelista et al., 2017). The use of formulations based on synthetic molecules and vegetable extracts could represent another alternative for soursop anthracnose management. In fruit-trees and vegetables such as mango (*Mangifera indica* L.), papaya (*Carica papaya* L.), Andean raspberry (*Rubus glaucus* Benth.) and chili (*Capsicum annuum* L.) some of these formulations have been analyzed in the control of anthracnose, giving satisfactory results, especially with the application of difenoconazole, copper hydroxide, mancozeb, azoxystrobin, prochloraz and lavender extract (*Lavandula stoechas* Lam.) (Zabala et al., 2005; Arias & Carrizales, 2007; Santamaría et al., 2011; Gaviria et al., 2013; Pérez-León et al., 2015; Linu & Jisha, 2017; Villacís et al., 2017). Based on the above mentioned, the objective of the study was to evaluate the antifungal effect of six antagonistic microorganisms and seven commercial fungicides on the *in vitro* growth of *C. theobromicola*, the causal agent of anthracnose in soursop inflorescences in Nayarit, Mexico.

Material and Methods

In vitro antagonism

We evaluated the *in vitro* antagonism of *T. asperillum* (Ta), *T. harzianum* (Th), *T. longibrachiatum*

de 21,810.86 t (SIAP, 2017). La antracnosis causada por *C. gloeosporioides* puede disminuir hasta en 90 % el rendimiento de guanábana (Pinto et al., 2005). Por lo que, los daños causados por este hongo fitopatógeno reafirman la necesidad de desarrollar y evaluar nuevos fungicidas más eficientes y amigables con el ambiente (Juárez et al., 2010). Además, el uso de fungicidas químicos de amplio espectro está siendo regulado y restringido por inducir resistencia en los organismos blanco y sus efectos adversos al ambiente y salud humana (Astúa et al., 1994). Entre las alternativas que han mostrado potencial en el control de enfermedades se encuentra el uso de microorganismos antagonistas como agentes de control biológico (Carrillo et al., 2005), en especial cepas de los géneros *Bacillus*, *Trichoderma* y *Streptomyces* que han mostrado ser potenciales antimicrobianos al ser evaluados contra fitopatógenos como *Moniliophthora*, *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Stemphylium*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Pseudomonas*, *Pectobacterium* y *Bacillus* (Chavarría et al., 2005; Rodríguez & Veneros 2011; Rincón et al., 2014; Pérez-León et al., 2015; Rios-Velasco et al., 2016; Tenorio & Mollinedo, 2016; Evangelista et al., 2017). Otra alternativa para el manejo de antracnosis en guanábana podría ser el uso de formulaciones a base de moléculas sintéticas y extractos vegetales. En frutas y hortalizas como mango (*Mangifera indica* L.), papaya (*Carica papaya* L.), mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.) y chile (*Capsicum annuum* L.) se han probado algunas de estas formulaciones con resultados satisfactorios en el control de antracnosis, especialmente con la aplicación de difenoconazol, hidróxido de cobre, mancozeb, azoxistrobina, prochloraz y extracto de lavanda (*Lavandula stoechas* Lam.) (Zavala et al., 2005; Arias & Carrizales, 2007; Santamaría et al., 2011; Gaviria et al., 2013; Pérez-León et al., 2015; Linu & Jisha, 2017; Villacís et al., 2017). Con base en lo anterior, el objetivo del estudio fue evaluar el efecto antifúngico de seis microorganismos antagonistas y siete fungicidas comerciales sobre el crecimiento *in vitro* de *C. theobromicola*, causante de antracnosis en inflorescencias de guanábana en Nayarit, México.

Material y Métodos

Antagonismo *in vitro*

Se evaluó el antagonismo *in vitro* de *T. asperillum* (Ta), *T. harzianum* (Th), *T. longibrachiatum* (Tl), y las actinobacterias *Streptomyces* sp. (A7), *S. tubericidicus* (A19) y *S.*

(T1), and the actinobacteria *Streptomyces* sp. (A7), *S. tubercidicus* (A19) and *S. viridochromogenes* (A27) against *C. theobromicola* isolated from soursop inflorescences of Compostela and San Blas, Nayarit, Mexico. The identification and pathogenicity of this fungus were previously confirmed. The strain was placed in the microbial strain collection of Laboratory of Agricultural Parasitology (Cemic 03) of the Universidad Autónoma de Nayarit. Antagonists were provided by the Laboratory of Plant Pathology and Biological Control of the Research Center for Food and Development, A.C., Chihuahua-Campus Cuauhtémoc. Confrontations in Petri dishes (90 × 15 mm) containing the potato-dextrose-agar culture medium (PDA, DIBICO®) were carried out. The antifungal effect of the antagonist vs *C. theobromicola* was determined by direct confrontation method. *Streptomyces* spp. strains were grown in PDA culture medium for 10 d by placing 7 mm diameter culture discs in the four cardinal points of PDA Petri dishes. Thereafter, 7 mm culture discs of 7-day-old cultures of *C. theobromicola* (mycelium and conidia without quantifying) were placed in the center of Petri dishes. *Trichoderma* strains were confronted by dual cultures, that consisted in placing the antagonist in one side of the dish and the pathogen in the opposite side of the Petri dish, both were planted on the same day. Experiments were performed in triplicate, each replicate consisted of three Petri dishes, and nine PDA Petri dishes only inoculated with *C. theobromicola* were used as a positive control (Ruiz-Cisneros *et al.*, 2017). Petri dishes were incubated at 28 °C in a Novatech® incubator (model EI60-AIA) in the absence of light and the radial growth of the confronted microorganisms was systematically measured every 24 h during 3 and 4 d for *Trichoderma* spp. strains and 12 d for *Streptomyces* spp. strains. The *in vitro* antagonism was evaluated estimating the percentage of radial growth inhibition of the pathogen (PICR) and calculated by the following formula $PICR = (R1 - R2) / R1 \times 100$, where R1 was the radial growth of the control colony (pathogen) and R2 was the radial growth of the pathogen colony in the *in vitro* confrontation. The antagonism level of *Trichoderma* was classified using the Bell *et al.* (1982), which consists of five types: (1) The antagonist has completely overgrown the pathogens and fills the culture surface, entirely covering the pathogen; (2) the antagonist exceeds two-thirds of the culture surface; (3) the antagonist and the pathogen colonize approximately half of the culture surface and none dominates the other; (4) the pathogen overgrew the antagonist, colonizing three-quarters of the culture surface; (5) the phytopathogenic

viridochromogenes (A27) contra *C. theobromicola* aislado de inflorescencias de guanábana en los municipios de Compostela y San Blas, Nayarit, México. La identificación y patogenicidad de este hongo en inflorescencias se confirmó con estudios previos. La cepa fue depositada en el cepario del Laboratorio de Parasitología Agrícola (Cemic 03) de la Universidad Autónoma de Nayarit. Los antagonistas fueron proporcionados por el cepario del Laboratorio de Patología Vegetal y Control Biológico del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Sede Chihuahua-Campus Cuauhtémoc. Las confrontaciones se realizaron en cajas de Petri (90 × 15 mm) que contenían el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA, DIBICO®). El efecto antifúngico de los antagonistas vs *C. theobromicola* se determinó por el método de confrontación de cultivos. Las cepas de *Streptomyces* spp., se crecieron en medio de cultivo PDA por 10 d, para lo cual se colocaron discos de cultivo de 7 mm de diámetro en los cuatro puntos cardinales de las cajas de Petri que contenían PDA, después de esta incubación se sembraron en el centro de las cajas, discos de cultivo de 7 mm del hongo *C. theobromicola* de 7 d de edad (micelio y conidios sin cuantificar). Las cepas de *Trichoderma* se confrontaron mediante cultivos duales, para lo cual el antagonista se colocó en un extremo de la caja y el patógeno en el extremo opuesto de la caja de Petri, ambos fueron sembrados el mismo día. Ambos experimentos se realizaron por triplicado donde cada repetición constó de tres cajas de Petri, y como testigo positivo se utilizaron nueve cajas de Petri con PDA sembradas con *C. theobromicola* en ausencia de los antagonistas (Ruiz-Cisneros *et al.*, 2017). Las cajas se incubaron a 28 °C en una incubadora Novatech® (modelo EI60-AIA) en ausencia de luz y el crecimiento radial de los microorganismos confrontados se midió sistemáticamente cada 24 h por 3 y 4 d para las cepas de *Trichoderma* spp. y 12 d para las cepas de *Streptomyces* spp. El antagonismo *in vitro* se evaluó mediante la estimación del porcentaje de inhibición del crecimiento radial del patógeno (PICR), usando la fórmula $PICR = (R1 - R2) / R1 \times 100$, donde R1 fue el crecimiento radial del patógeno testigo y R2 el crecimiento radial del patógeno en la confrontación. El tipo de antagonismo de *Trichoderma* se determinó mediante la escala de Bell *et al.* (1982), la cual consta de cinco tipos: (1) El antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno; (2) el antagonista sobrepasa las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo; (3) el antagonista y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno domina al otro; (4) el patógeno sobrepasa al crecimiento del antagonista colonizando tres cuartas partes

completely overgrew the antagonist and filled the culture surface. The antagonism level of *Streptomyces* strains was determined according to the six-level scale proposed by Pérez-Corral *et al.* (2015). (1) No growth of the fungus (0 %); (2) radial growth (1 % to 25 %); (3) radial growth (26 % to 50 %); (4) radial growth greater than 50 %; without overgrowing the actinomycete; (5) presence of halo; and (6) the actinomycete has completely overgrown (100 %) by the fungus (without antagonism).

In vitro evaluation of fungicides

We evaluated the fungicide sensitivity of *C. theobromicola* to seven commercial fungicides: Maxtrobyn® (azoxystrobin SC), ExCitrus® (Citric extract + quercetin), Canelys® (Cinnamomum zeylanicum extract), Hidrocu® PH (Copper hydroxide), Pull75WG® (cuprous oxide), SCORE® 250 EC (Difenoconazole) and SWITCH® (cyprodinil + fludioxonil) 62.5 WG (Table 1). The doses were provided according to the manufacturer's recommendations, half of the recommended dose [low dose (D1)], recommended dose [medium dose (D2)] and recommended dose plus half of this [high dose (D3)]. Five replicates (Petri dishes) for each dose with five controls for each treatment were carried out in this experiment. Each dose of the fungicide was mixed with PDA at 48 °C, stirred to homogenize the mixture and then poured into the Petri dishes (90 × 15 mm). Subsequently, disks (0.7 mm explants) of 7-day-old cultures of *C. theobromicola* were placed in the center of the Petri dishes. The control treatment was considered the PDA culture inoculated with *C. theobromicola* without the fungicides. Radial growth of the fungus was measured every 24 h for 12 d, time when the controls completely filled the Petri dishes (Gaviria *et al.*, 2013). Based on these measurements, the PICR of *C. theobromicola* was calculated with the formula previously mentioned.

Experimental design and statistical analysis

A completely randomized design was used to examine the variables. Analysis of variance and comparison by means of the Tukey test ($\alpha = 0.05$) was carried out to PICR data using Statistical Analysis System program (Sas Institute Inc., 2009).

Results and Discussion

In vitro antagonism

The six antagonists of *Streptomyces* and *Trichoderma* showed high PICR on *C. theobromicola*, the

de la caja; (5) el agente fitopatógeno cubre totalmente la caja. Mientras que el tipo de antagonismo por parte de las cepas de *Streptomyces* se determinó de acuerdo con la escala propuesta por Pérez-Corral *et al.* (2015), donde propone seis tipos. (1) Crecimiento nulo del hongo (0 %); (2) crecimiento radial (1 % a 25 %); (3) crecimiento radial (26 % a 50 %); (4) crecimiento radial mayor a 50 %; sin sobrecrecer al actinomiceto; (5) presencia de halo; y (6) sobre-crecimiento al 100 % del actinomiceto por parte del hongo (sin antagonismo).

Evaluación in vitro de fungicidas

Se evaluó la sensibilidad de *C. theobromicola* a siete fungicidas comerciales: Maxtrobyn® (azoxystrobin SC), ExCitrus® (Extracto cítrico + quercetina), Canelys® (Extracto de *Cinnamomum zeylanicum*), Hidrocu® PH (Hidróxido de cobre), Pull75WG® (óxido cuproso), SCORE® 250 EC (Difenoconazol) y SWITCH® (cyprodinil + fludioxonil) 62.5 WG (Tabla 1). Las dosis evaluadas, fueron consideradas en función a las dosis recomendadas por el fabricante, mitad de la dosis recomendada [dosis baja (D1)], dosis recomendada [dosis media (D2)] y dosis recomendada más la mitad de ésta [dosis alta (D3)]. El experimento consistió de cinco repeticiones donde cada repetición constó de una caja de Petri para cada dosis con cinco testigos para cada tratamiento. Se mezcló cada dosis del fungicida con el PDA a 48 °C y se agitó para homogeneizar la mezcla antes de ser vertida en las cajas de Petri (90 × 15 mm). Posteriormente, se colocaron discos (explantes de 0.7 mm) del cultivo de *C. theobromicola* de 7 d de edad, en el centro de las cajas de Petri. Los testigos consistieron de la siembra del hongo *C. theobromicola* en PDA en ausencia de los fungicidas. El crecimiento radial del hongo se midió cada 24 h por 12 d, tiempo en el cual los testigos llenaron por completo las cajas de Petri (Gaviria *et al.*, 2013). Con base en estas mediciones se calculó el PICR de *C. theobromicola* con la formula arriba mencionada.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar. A los datos del PICR se les aplicó un análisis de varianza y una prueba de separación de medias por Tukey ($\alpha = 0.05$) mediante el programa Statistical Analysis System (Sas Institute Inc., 2009).

Resultados y Discusión

Antagonismo in vitro

Los seis antagonistas de *Streptomyces* y

Table 1.
Fungicides and doses evaluated *in vitro* against *C. theobromicola*.

Tabla 1.
Fungicidas y dosis evaluados *in vitro* contra *C. theobromicola*.

Treatment	Fungicide		Doses (mL o g/L ⁻¹)		
	Trade name	Active ingredient	D1	D2	D3
T1	Maxtrobyn®	Azoxystrobin SC	0.44 mL	0.88 mL	1.32 mL
T2	ExCitrus®	Citrus extract + quercetin	2.5 mL	5 mL	7.5 mL
T3	Canelys®	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> extract	2.5 mL	5 mL	7.5 mL
T4	Hidrocu® PH	Copper hydroxide	2.5 g	5 g	7.5 g
T5	Pull75WG®	Cuprous oxide	2.5 g	5 g	7.5 g
T6	SCORE® 250 EC	Difenoconazole	1.5 g	3 g	4.5 g
T7	SWITCH®	Cyprodinil + fludioxonil	3 g	6 g	9 g

PICR showed significant differences in the Tukey test ($\alpha = 0.05$) (Figure 1), highlighting the *Streptomyces* strains, which inhibited the pathogen growth between 90 and up to 100 %: Strain A27 completely inhibited the pathogen (100 %), followed by strains A19 and A7 with 96.18 and 90.4 %, respectively. The three strains A27, A19 and A7 showed inhibition halos of 26.35, 26.03 and 24.2 mm, respectively.

The antagonism was of type 1 for A27 where the fungus

Trichoderma mostraron altos PICR sobre *C. theobromicola*, los PICR mostraron diferencias significativas en la prueba de separación de medias por Tukey ($\alpha = 0.05$) (Figura 1), destacando las cepas de *Streptomyces*, que inhibieron el crecimiento del patógeno entre 90 y hasta el 100 %: La cepa A27 lo inhibió por completo (100 %), seguida por las cepas A19 y A7 con 96.18 y 90.4 %, respectivamente. Las tres cepas A27, A19 y A7 mostraron halos de inhibición de 26.35, 26.03 y 24.2 mm, respectivamente.

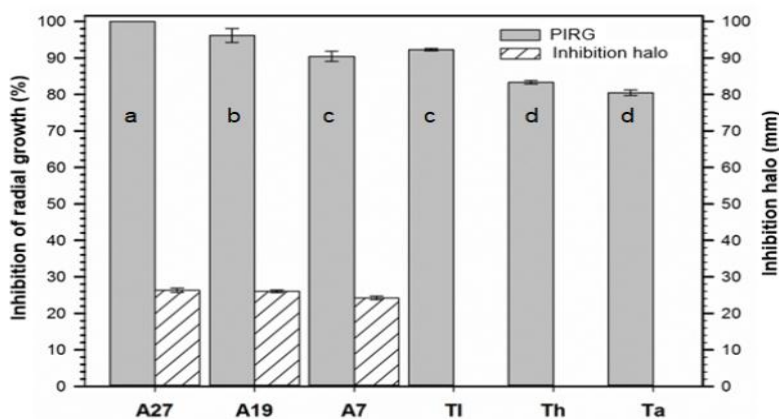


Figure 1. PIRG and inhibition halo of antagonists vs *C. theobromicola*. *Streptomyces* sp. (A7), *streptomyces tubercidicus* (A19), *Streptomyces viridochromogenes* (A27), *Trichoderma asperellum* (Ta), *Trichoderma harzianum* (Th) and *Trichoderma longibrachiatum* (TI). Bars with the same letters are not statistically different (Tukey, 0.05).

Figura 1. PIRG y halo de inhibición de antagonistas vs *C. theobromicola*. *Streptomyces* sp. (A7), *Streptomyces tubercidicus* (A19), *Streptomyces viridochromogenes* (A27), *Trichoderma asperellum* (Ta), *Trichoderma harzianum* (Th) y *Trichoderma longibrachiatum* (TI). Las barras con mismas letras no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

growth was zero (0 %) and type 2 for A7 and A19 where the radial growth was from 1 to 25 %. These results differ with those obtained by Dávila *et al.* (2013), those authors evaluated *in vitro* isolates of *Streptomyces* sp. against phytopathogenic fungi such as *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. and *Colletotrichum* sp., reporting inhibitions percentages lower than 62 %, where the highest inhibition percentage was recorded against *Colletotrichum* sp. The antifungal capacity of the evaluated *Streptomyces* strains could be due to the production of some fungistatic compound (De Lima *et al.*, 2012; Atta, 2015; Pathalam *et al.*, 2017). In this regard, Srividya *et al.* (2012) mentioned that one of the biocontrol mechanisms of *Streptomyces* is through the production of mycolic enzymes, mainly chitinase and β -1, 3 glucanase as well as cellulase, lipase and protease. In a study performed by Savarana *et al.* (2014) found that the active principle of the strain SCA 7 of *Streptomyces* sp. was the compound 2,4-bis (1,1-dimethylethyl) phenol. In the same way, Shaik *et al.* (2017) found three *Streptomyces* isolates with an antifungal activity which produced the bioactive metabolites alpha-amylase, lipase, protease and cellulase. Atta (2015) mentioned that *S. torulosus* produces tunicamycin, a broad-spectrum antibiotic against Gram-positive and Gram-negative bacteria, and unicellular and filamentous fungi. The three strains of *Trichoderma* also showed *in vitro* antifungal potential by inhibiting *C. theobromicola* up to 92.27 %, *T. longibrachiatum* was the most effective strain, followed by *T. harzianum* and *T. asperellum* with inhibitions of 83.33 and 80.48 %, respectively. The three strains of *Trichoderma* showed antagonism type 1 for *T. asperellum* and *T. harzianum* (i.e the antagonist has overgrown completely the pathogens and fills the culture surface covering completely the pathogen) and type 2 for *T. longibrachiatum* (where the antagonist exceeded two-thirds of the culture surface). *Trichoderma* has been proposed as a potential agent of biological control against *Colletotrichum* spp., due to its rapid growth and the activity of its lytic enzymes such as chitinases, endoglucanases and exoglucanases (Hoyos *et al.*, 2008; Rodríguez & Veneros 2011; Sanmartín *et al.*, 2012; Vargas *et al.*, 2012). Peláez *et al.* (2016) reported a 91 % *in vitro* growth inhibition of *C. gloeosporioides* by *T. asperellum*, and also observed an overgrowth in the phytopathogen. In addition, the same authors found a synergistic effect in the integrated use of *T. asperellum* and a low dose of the fungicide captan 50[®] (0.1 g L⁻¹) which led to a 99 % *in vitro* growth inhibition of *C. gloeosporioides*. The antifungal potential (*in vitro* inhibition > 80 %) of our *Trichoderma* isolates, surpass up to four

El antagonismo fue del tipo 1 para A27 donde el crecimiento del hongo fue nulo (0 %) y tipo 2 para A7 y A19 donde el crecimiento radial fue de 1 a 25 %. Estos resultados difieren con los obtenidos por Dávila *et al.* (2013), ya que al evaluar *in vitro* aislados de *Streptomyces* sp. contra hongos fitopatógenos como *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *Colletotrichum* sp., reportaron inhibiciones menores al 62 %, donde la mayor inhibición la registraron contra *Colletotrichum* sp. La capacidad antifúngica de nuestras cepas de *Streptomyces* evaluadas pudo deberse a la producción de algún compuesto fungistático (De Lima *et al.*, 2012; Atta, 2015; Pathalam *et al.*, 2017). Ya que, al respecto Srividya *et al.* (2012) mencionan que uno de los mecanismos de biocontrol de *Streptomyces* es mediante la producción de enzimas micolíticas principalmente quitinasa y β -1, 3 glucanasa así como celulasa, lipasa y proteasa. En un estudio realizado por Saravana *et al.* (2014) encontraron que el principio activo de la cepa SCA 7 de *Streptomyces* sp. fue el compuesto 2,4-bis (1,1-dimetiletil) fenol. En el mismo sentido Shaik *et al.* (2017) encontraron tres aislados de *Streptomyces* con actividad antifúngica los cuales producían los metabolitos bioactivos alpha amilasa, lipasa, proteasa y celulasa. Atta (2015) encontró que *S. torulosus* produce tunicamicina, un antibiótico de amplio espectro contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y de hongos unicelulares y filamentosos. Las tres cepas de *Trichoderma* también mostraron potencial antifúngico *in vitro* al inhibir a *C. theobromicola* hasta en un 92.27 %, siendo *T. longibrachiatum* la cepa más efectiva, seguida de las cepas *T. harzianum* y *T. asperellum* con inhibiciones del 83.33 y 80.48 %, respectivamente. Las tres cepas de *Trichoderma* mostraron antagonismo tipos; 1 para *T. asperellum* y *T. harzianum* (es decir el antagonista ocupó completamente la superficie de la caja cubriendo totalmente al patógeno) y 2 para *T. longibrachiatum* (donde el antagonista sobrepasó las dos terceras partes de la superficie de la caja). *Trichoderma* se ha propuesto como un agente potencial de control biológico de *Colletotrichum* spp., debido a su rápido crecimiento y a la actividad de sus enzimas líticas como quitinasas, endoglucanases y exoglucanases (Hoyos *et al.*, 2008; Rodríguez & Veneros 2011; Sanmartín *et al.*, 2012; Vargas *et al.*, 2012). Peláez *et al.* (2016) reportaron un 91 % de inhibición *in vitro* del crecimiento de *C. gloeosporioides* por *T. asperellum*, ellos también observaron un sobrecrecimiento en el fitopatógeno. Además, los mismos autores encontraron un efecto sinérgico en el uso integrado de *T. asperellum* y una dosis baja del fungicida captan 50[®] (0.1 g L⁻¹) lo que condujo a la inhibición del crecimiento *in vitro* de *C. gloeosporioides* en un 99 %. El potencial antifúngico (inhibición *in vitro* >80 %) de nuestros aislados de *Trichoderma*, superan hasta

times the values reported by De la Cruz *et al.* (2018), who found *in vitro* inhibitions percentages of 9.5, 22.5 and 21.9 % by strains of *T. harzianum*, *T. asperellum* and *T. longibrachiatum*, respectively. Ghosh & Chakraborty, (2012) demonstrated the *in vitro* potential of *T. viride* strains as a biological control agent of *C. gloeosporioides*, the authors found that the spores of *Trichoderma* adhere to the cell wall of *C. gloeosporioides* and contract them. In this regard, Vargas *et al.* (2012) evaluated the *in vitro* antagonistic activity of *T. longibrachiatum*, *T. asperellum* and *T. harzianum* strains against *Colletotrichum* sp., showing an inhibition percentage higher than 70 % in the 33.3 % of their strains, highlighting the *T. asperellum* strains. On the other hand, Sanmartín *et al.* (2012) found *in vitro* inhibitions from 55.5 to 66.8 % against *C. gloeosporioides* using *T. asperellum* strains, this antagonistic activity was correlated with the production of chitinolytic and cellulolytic enzymes. In a study performed by Rodríguez and Veneros (2011), demonstrated that the hyphae of *T. harzianum* covered and degraded (mycoparasitism) the hyphae of the pathogens *R. nigricans*, *C. gloeosporioides*, *A. alternata*, *S. lycopersici*, *F. oxysporum* and *L. thebromae*.

In vitro evaluation of fungicides

The susceptibility of *C. theobromicola* to the seven fungicides was variable, since Canelys®, Hidrocu® PH and SCORE® 250 EC inhibited 100 % of the fungus growth with its three doses; Pull75WG® inhibited 100 % with D2 and D3; Switch® 62.5 WG from 93.1 to 98.67 %; Excitri® of 47, 77 and 98 % with doses D1, D2 and D3, respectively; Maxtrobryn® showed the lowest inhibition values (68.44, 71.60 and 65.05 %) with doses D1, D2 and D3, respectively. The three doses of Canelys®, Hidrocu® PH, SCORE® 250 EC and Pull75WG®, as well as the high doses of Switch® 62.5 WG and Excitri®, did not show significant differences according to the Tukey test ($\alpha = 0.05$) (Figure 2). Based on the results exhibited here, we can assume that 5 fungicides showed a high potential of *in vitro* control against *C. theobromicola* (Canelys®, Hidrocu® PH, SCORE® 250 EC, Pull75WG® and Switch®). However, considering that soursop is an emergent crop where the management of diseases at low cost is sought, the fungicides Canelys® and Hidrocu® PH, could be a viable alternative for the control of anthracnose in field conditions, because they are considered low cost and environmentally friendly.

Gaviria *et al.* (2013) obtained similar results using

cuatro veces los valores reportados por De la Cruz *et al.* (2018), quienes encontraron inhibiciones *in vitro* de 9.5, 22.5 y 21.9 % por cepas de *T. harzianum*, *T. asperellum* y *T. longibrachiatum*, respectivamente. Ghosh & Chakraborty (2012) demostraron el potencial *in vitro* de cepas de *T. viride* como agente de control biológico de *C. gloeosporioides*, ellos encontraron que las esporas de *Trichoderma* se adhieren a las paredes de *C. gloeosporioides* y las contraen. Al respecto, Vargas *et al.* (2012) al evaluar la actividad antagonística *in vitro* de cepas de *T. longibrachiatum*, *T. asperellum* y *T. harzianum* contra *Colletotrichum* sp., encontraron que el 33.33 % de sus cepas mostraron un porcentaje de inhibición superior al 70 %, destacando las cepas de *T. asperellum*. Mientras que Sanmartín *et al.* (2012) encontraron cepas de *T. asperellum* con inhibiciones *in vitro* contra *C. gloeosporioides* superiores al 55.5 pero menores al 66.8 %, esta actividad antagonística fue correlacionada con la producción de enzimas quitinolíticas y celololíticas. En un estudio realizado por Rodríguez & Veneros (2011), encontraron que las hifas de *T. harzianum* cubrieron y degradaron (micoparasitismo) las hifas de los patógenos *R. nigricans*, *C. gloeosporioides*, *A. alternata*, *S. lycopersici*, *F. oxysporum* y *L. thebromae*.

Evaluación in vitro de fungicidas

La susceptibilidad de *C. theobromicola* a los siete fungicidas evaluados fue variable, ya que Canelys®, Hidrocu® PH y SCORE® 250 EC inhibieron el 100 % del crecimiento del hongo con sus tres dosis; Pull75WG® inhibió el 100 % con la D2 y D3; Switch® 62.5 WG de 93.1 a 98.67 %; Excitri® de 47, 77 y 98 % con las dosis D1, D2 y D3, respectivamente; Maxtrobryn® mostró los valores de inhibición más bajos (68.44, 71.60 y 65.05 %) con las dosis D1, D2 y D3, respectivamente. Las tres dosis de Canelys®, Hidrocu® PH, SCORE® 250 EC y Pull75WG®, así como las dosis altas de Switch® 62.5 WG y Excitri® no mostraron diferencias significativas de acuerdo la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) (Figura 2). Con base a los resultados, se puede interpretar que 5 fungicidas evaluados mostraron alto potencial de control *in vitro* contra *C. theobromicola* (Canelys®, Hidrocu® PH, SCORE® 250 EC, Pull75WG® y Switch®). Sin embargo, considerando que guanábana es un cultivo emergente donde se busca el manejo de las enfermedades a bajo costo, los fungicidas Canelys® e Hidrocu® PH, podrían ser una alternativa viable para el control de antracnosis en condiciones de campo, debido a que son considerados amigables con el ambiente y de bajo costo.

Gaviria *et al.* (2013) obtuvieron resultados similares con Score 250® EC (difenoconazol 100 ppm) y Kocide® 101

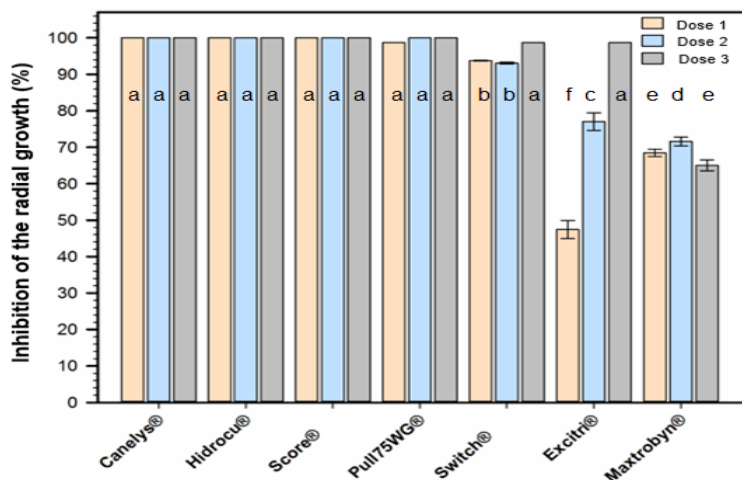


Figure 2. *In vitro* inhibition of the radial growth of *C. theobromicola* by commercial fungicides. Bars with the same letters are not statistically different (Tukey, 0.05).

Figura 2. Inhibición *in vitro* del crecimiento radial de *C. theobromicola* por fungicidas comerciales. Las barras con mismas letras no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

Score 250® EC (difenoconazole 100 ppm) and Kocide® 101 (copper hydroxide 2460 ppm) with 100 % *in vitro* inhibition of *C. gloeosporioides* and *C. acutatum*. While the values obtained with Amistar® 50 WG (azoxystrobin 63 ppm) was not different since it ranges from 38.75 to 70 %. About that, Linu & Jisha, (2017) evaluated the *in vitro* effect of three fungicides (carbendazim 0.05 %, mancozeb 0.2 % and azoxystrobin 0.1 %) against *C. capsici*, obtaining inhibition percentages of 64.12, 73.47 and 62.21 %, respectively, where the inhibition of azoxystrobin was similar to the obtained in this investigation. Zavala *et al.* (2005), analyzed the *in vitro* effect of azoxystrobin against *C. gloeosporioides*, reporting a lower inhibition (59.8 %) than the found in our study, whereas when evaluated *in vivo* effect on the control of *C. gloeosporioides* the anthracnose severity in papaya was only reduced by 20.35 %. On the other hand, *in vivo* studies of some of these fungicides such as azoxystrobin mixed with cyproconazole at a dose of 50 g/100 L⁻¹ have demonstrated that the incidence (below 25 %) of anthracnose caused by *C. gloeosporioides* in post-harvest mango fruits has been reduced (Arias & Carrizales, 2007). In another study conducted by Pérez-León *et al.* (2015) applied azoxystrobin in *Sansevieria trifasciata* var. *Hahnii* leaves, reporting a 100 %

(hidróxido de cobre 2460 ppm) con el 100 % de inhibición *in vitro* de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*. Mientras que los valores obtenidos con Amistar® 50 WG (azoxystrobin 63 ppm) no fueron diferentes ya que fluctuó de 38.75 a 70 %. Al respecto, Linu & Jisha, (2017) evaluaron tres fungicidas (carbendazim 0.05 %, mancozeb 0.2 % y azoxystrobin 0.1 %) *in vitro* contra *C. capsici* y obtuvieron porcentajes de inhibición de 64.12, 73.47 y 62.21 %, respectivamente, donde la inhibición de azoxystrobin fue similar al obtenido en esta investigación. Zavala *et al.* (2005), al evaluar el efecto *in vitro* de azoxystrobin contra *C. gloeosporioides* reportaron una inhibición menor (59.8 %) a la encontrada en nuestro estudio, mientras que al evaluarlo *in vivo* en el control de *C. gloeosporioides* solo redujo la severidad de antracnosis en papaya en un 20.35 %. Por otra parte, en estudios *in vivo* de algunos de estos fungicidas como azoxistrobina en mezcla con ciproconazole a una dosis de 50 g/100 L⁻¹ se ha reducido la incidencia (por debajo del 25 %) de antracnosis en frutos de mango poscosecha causada por *C. gloeosporioides* (Arias & Carrizales, 2007). En otro estudio realizado por Pérez-León *et al.* (2015) reportaron un 100 % de protección de las hojas *Sansevieria trifasciata* var. *Hahnii* de la antracnosis causada por *C. sansevieriae*, al aplicar azoxistrobina. Mientras que en frutos de papaya maradol, azoxystrobin mostró un 87.5 % de efectividad

protection of anthracnose caused by *C. sansevieria*. In papaya maradol fruits, azoxystrobin showed an 87.5 % effectiveness in reducing the severity of *C. gloeosporioides* (Santamaría *et al.*, 2011).

Conclusions

Both groups of antagonists showed *in vitro* biocontrol potential and therefore could be potential candidates to be evaluated in the field in order to control soursop inflorescence anthracnose. Strain A27 of *Streptomyces* completely inhibited the *in vitro* growth of *C. theobromicola*. The strains of *Trichoderma* inhibited *C. theobromicola* in values higher than 80.48 %.

Canelys[®], Hidrocu[®] PH and SCORE[®] 250 EC fungicides were the most efficient for completely inhibiting (100 %) the *in vitro* growth of *C. theobromicola*. ExCitri[®] and Maxtrobyn[®] were the least effective, however, they showed percentages of inhibition higher than 47.43 %. Based on these results, the fungicides Canelys[®], Hidrocu[®] PH, SCORE[®] 250 EC, Pull75WG[®] and Switch[®] 62.5 WG could be a potential alternative for the chemical control of anthracnose in the field as part of an integrated management scheme.

Acknowledgments

This study was funded by "Fondo Sectorial de Investigación en Materia Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agrobiotecnología y Recursos Fitogenéticos" with grant

References

- Álvarez, E., Llano, G. A., Mejía, J. F. and Ospina, C. A. (2002). Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca. *Fitopatología Colombiana*, 28 (1): 1-8. http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos_ciat/Caract_colletotrichum%20EAlvarez1%20_2.pdf
- Andrades, I., Labarca, J., Marín, Y., Paredes, C., Ulacio, D. and Yender, F. (2009). Evaluación de la antracnosis (*Colletotrichum* sp.) en guanábana (*Annona muricata* L.) tipo gigante en el sector Moralito del estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola*, 9 (1): 148-157. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3293882>.
- Arias, R. B. & Carrizales, L. (2007). Control químico de la antracnosis del mango (*Mangifera indica* L.) en pre y postcosecha en el municipio Cedeño, estado de Monagas, Venezuela. *Bioagro*, 19 (1): 19-25. <https://www.redalyc.org/pdf/857/85719103.pdf>
- Astúa, G., Arauz, L. F. and Umaña, G. (1994). Sensibilidad reducida al tiabendazole en *Colletotrichum gloeosporioides*

en la reducción de la severidad de *C. gloeosporioides* (Santamaría *et al.*, 2011).

Conclusiones

Ambos grupos de antagonistas mostraron potencial de biocontrol *in vitro* por lo que podrían ser candidatos potenciales para ser evaluados en el control de antracnosis en inflorescencias de guanábana en campo. La cepa A27 de *Streptomyces* inhibió por completo el crecimiento *in vitro* de *C. theobromicola*. Las cepas de *Trichoderma* inhibieron a *C. theobromicola* en valores superiores al 80.48 %.

Los fungicidas Canelys[®], Hidrocu[®] PH y SCORE[®] 250 EC fueron los más eficaces al inhibir por completo (100 %) el crecimiento *in vitro* de *C. theobromicola*. ExCitri[®] y Maxtrobyn[®] fueron los menos efectivos, sin embargo, mostraron porcentajes de inhibición superiores al 47.43. Con base en estos resultados, los fungicidas Canelys[®], Hidrocu[®] PH, SCORE[®] 250 EC, Pull75WG[®] y Switch[®] 62.5 WG podrían ser una alternativa potencial para el control químico de antracnosis en campo como parte de un esquema de manejo integrado.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el "Fondo Sectorial de Investigación en Materia Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agrobiotecnología y Recursos Fitogenéticos" con No. de Proyecto (266891).

- aislado de papaya. *Agronomía Costarricense*, 18: 35-39. http://www.mag.go.cr/rev_agr/v18n01_035.pdf
- Atta, H. M. (2015). Biochemical studies on antibiotic production from *Streptomyces* sp.: Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19: 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.12.011>
- Bell, D. K., Wells, H. D. and Markham, C. R. (1982). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72: 378-382. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19821384099>
- Carrillo, F. J. A., García, E. R. S., Muy, R. M. D., Sañudo, B. A., Márquez, Z. I., Allende, M. R., De La Garza, R. Z., Patiño, V. M. and Galindo, F. E. (2005). Control biológico de antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] y su efecto en la calidad poscosecha del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(1): 24-32. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61223104.pdf>
- Chavarría, M., Uribe, L. and Bolaños A. (2005). Microorganismos benéficos en el control de enfermedades en jengibre. *Agronomía Costarricense*, 29 (3): 145-155. http://www.mag.go.cr/rev_agr/v29n03_145.pdf.
- Dávila M. M. D., Gallegos, M. G., Hernández, C. F. D., Ochoa, F. Y. M. and Flores O. A. (2013). Actinomicetos antagónicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4(8): 1187-1196. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342013000800006
- De la Cruz, Q. R., Roussos, S., Rodríguez, H. R., Hernández, C. D. and Aguilar, C. N. (2018). Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native Mexican *Trichoderma* strains. *Karbala International Journal of Modern Science*, 4 (2): 237-243. <https://doi.org/10.1016/j.kijoms.2018.03.002>
- De Lima, P. R. E., Reis da S. I., Kassawara, M. M., Lúcio de A. J. and Magali de A. J. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16 (5): 466-471. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>
- Evangelista, M. Z., Quiñones, A. E. E. and Rincón, E. G. (2017). Potencial biotecnológico de las actinobacterias aisladas de suelos de México como fuente natural de moléculas bioactivas: compuestos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 21(63): 39-51. http://www.utm.mx/edi_anteriores/temas63/T63_E011-2017.pdf
- Gaviria, H. V., Patiño, H. L. F. and Saldarriaga, C. A. (2013). Evaluación *in vitro* de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum* spp., en mora de castilla. *Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 14(1): 67-75. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0122-87062013000100008
- Ghosh, S. & Chakraborty, N. (2012). *In vitro* biological control of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal organism of anthracnose of sarpagandha (*Rouloffia serpentina*). *Agriculture and Biology Journal of North America*, 3: 306-310. <https://doi.org/10.5251/abjna.2012.3.8.306.310>
- Hernández, F. L. M., Gómez J. R. and Andrés A. J. (2013). Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano. Libro Técnico Núm. 1. Campo Experimental Santiago Ixcuintla, Nayarit, México, p.87. http://inifapcirpac.gob.mx/publicaciones_nuevas/Importancia,%20plagas%20insectiles%20y%20enfermedades%20fungosas%20del%20cultivo%20del%20Guanabano.pdf
- Hernández, V. L., Castillo, R. D. G., Chiquito, C. R. G., López, M. H., Ruiz B. R. and Vidal M. N. A. (2014a). La situación de las Annonaceae en México: principales plagas, enfermedades y su control. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36 (1): 44-54. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452014000500005>
- Hernández, V. L., Martínez, N. A. V., Moctezuma, H. L., Rocha, D. G. C. and Contreras, R. G. C. (2014b). Propuesta de un plan de desarrollo integral del guanábano (*Annona muricata* L.) en el estado de Veracruz, México. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(1): 94-101. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452014000500011>
- Hoyos, C. L., Duque, G. and Orduz, S. (2008). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 2(1): 76-86. https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias_hortícolas/article/view/1175
- Juárez, B. G. P., López, M. A. and Sosa, M. M. E. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 4(2): 14-23. [https://www.udlap.mx/WP/Tsia/files/No4-Vol-2/TSIA-4\(2\)-Juarez-Becerra-et-al-2010.pdf](https://www.udlap.mx/WP/Tsia/files/No4-Vol-2/TSIA-4(2)-Juarez-Becerra-et-al-2010.pdf)
- Linu, M. S. & Jisha, M. S. (2017). *In vitro* control of *Colletotrichum capsici* induced chilli anthracnose by fungicides and biocontrol agent. *International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture (IJAPSA)*, 3(5): 27-33. <https://pdfs.semanticscholar.org/969d/16cde0c4c2c55021f42ac880bc28c221d277.pdf>

- Pathalam, G., Appadurai, D. R., Rajendran, H. A. D., Munusamy, R. G., Michael G. P., Naif Abdullah Al-Dhabi, and Savarimuthu, I. (2017). Antimicrobial activity of some actinomycetes from Western Ghats of Tamil Nadu, India. *Alexandria Journal of Medicine*, 53: 101-110. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2016.03.004>
- Peláez, A. A., de los Santos, V. S., Yépez, E. A., Parra, C. F. I. and Reyes, R. R. T. (2016). Efecto sinérgico de *Trichoderma asperellum* T8A y Captan 50[®] contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7 (6): 1401-1412. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342016000601401
- Pérez-Corral, D. A., García-González, N. Y., Gallegos-Morales, G., Ruiz-Cisneros, M. F., Berlanga-Reyes, D. I. and Ríos-Velasco, C. (2015). Aislamiento de actinomicetos asociados a rizosfera de árboles de manzano antagonísticos a *Fusarium equiseti*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 6(7): 1629-1638. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342015000700016&script=sci_abstract
- Pérez-León, G., Castillo-Matamoros, R., Chavarría-Pérez, L., Brenes-Angulo, A. and Gómez-Alpizar, L. (2015). Combate químico de la antracnosis de *Sansevieria trifasciata* var. Hahnii en un sistema de hojas separadas. *Agronomía Mesoamericana*, 26 (2): 305-313. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1659-13212015000200305&script=sci_abstract&tlng=es
- Pinto, A. C., Cordeiro, R. M. C., De Andrade, M. S. R., Ferreira, H. F., De Filgueiras, A. H., Alves, E. R. and Kinpara, I. D. (2005). Annona species. International Centre for Underutilised Crops (ICUC). University of Southampton, UK 268 p.
- Rincón, E. G., López, P. L. and Quiñones, A. E. E. (2014). Efectividad biológica *in vitro* de actinomicetos sobre el agente causal del tizón de halo en frijol. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37(3): 229-234. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802014000300008
- Ríos-Velasco, C., Caro-Cisneros, J. M., Berlanga-Reyes, D. I., Ruiz-Cisneros, M. F., Ornelas-Paz, J. J., Salas-Marina, M. Á., Villalobos-Pérez, E. and Guerrero-Prieto, V. M. (2016). Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(1): 84-99. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092016000100085&script=sci_abstract
- Rodríguez, L. M. & Veneros, T. R. (2011). Control biológico de *Trichoderma harzianum* RIFAI sobre hongos patógenos de frutos postcosecha de *Carica papaya* procedente de zonas de distribución del distrito Trujillo (Perú). *Revista de la Facultad de Ciencias Biológicas (REBIOL)*, 31(2): 1-9. http://www.facbio.unitru.edu.pe/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=102&Itemid=62
- Rojas, E. I., Rehner, S. A., Samuels, G. J., Van Bael, S. A. Herre, E. A., Cannon, P., Chen, R., Pang, J., Wang, R., Zhang, Y., Peng, Yan-Qiong. and Sha, T. (2010). *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: Multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia*, 102(6): 1318-1338. <https://doi.org/10.3852/09-244>
- Rondón C. J. C. (1999). Estudio biológico y epidemiológico de la antracnosis, del tomate de árbol y generación de alternativas para su manejo integrado en Colombia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA. Informe Técnico. Santafé de Bogotá, D. C. p.147.
- Ruiz-Cisneros, M. F., Ríos-Velasco, C., Berlanga-Reyes, D. I., Ornelas-Paz, J. J., Acosta-Muñiz, C. H., Romo-Chacón, A., Zamudio-Flores, P. B., Pérez-Corral, D. A., Salas-Marina, M. Á., Ibarra-Rendón, J.E. and Fernández-Pavía, S. P. (2017). Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(3): 437-462. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1704-3>
- Sanmartín, N. P., López, X., Pemberthy, M. P., Granada, S. D. and Rueda, L. E. A. (2012). Análisis del modo de acción y de la capacidad antagonística de *Trichoderma asperellum* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium* sp. *Revista Tumbaga*, 2(7): 29-49. <http://revistas.ut.edu.co/index.php/tumbaga/article/viewFile/36/353>
- Santamaría, B. F., Díaz, P. R., Gutiérrez, A. O., Santamaría, F. J. and Larqué, S. A. (2011). Control de dos especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en frutos de papaya maradol. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 2(5): 631-643. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342011000500001
- Saravana K. P., Duraipandiyar, V. and Ignacimuthu, S. (2014). Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 30: 435-446. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2014.05.006>
- SAS (Statistical Analysis System). (2009). SAS Version 9.2. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. s/p.

- Servicio De Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2017). Cierre de la producción agrícola por cultivo. http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp
- Shaik, M., Girija, S. G., Iswarya, M. and Rajitha, P. (2017). Isolation and characterization of bioactive metabolites producing marine *Streptomyces parvulus* strain sankarensis-A10. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15: 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.02.004>
- Srividya, S., Adarshana, T., Deepika, V. B., Kajingailu, G. and Nilanjan, D. (2012). *Streptomyces* sp. 9p as effective biocontrol against chilli soilborne fungal phytopathogens. *European Journal of Experimental Biology*, 2(1): 163-173. <https://pdfs.semanticscholar.org/a033/0930990a4fe62c928bf7db9f9fc37067786f.pdf>
- Tenorio, R. & Mollinedo, P. A. (2016). Inhibitory capacity of filtrates from *Trichoderma inhamatum* and *Caiophora andina* over phytopathogens of *Theobroma cacao*. *Revista Boliviana de Química*, 33(3): 116-126. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602016000300002
- Vargas, H. H. A., Rueda, L. E. A. and Gilchrist, R. E. (2012). Actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* (Fungi: Ascomycota) a diferentes temperaturas. *Actualidades Biológicas*, 34(96): 103-112. <http://www.scielo.org.co/pdf/acbi/v34n96/v34n96a08.pdf>
- Villacís, A. L. A., León, G. O., Santana, M. R., Mangui, T. J., Carranza, G. and Pazmiño, M. P. (2017). Actividad anti fúngica (*in vitro*) de extractos vegetales para el control de antracnosis (*Colletotrichum acutatum*). *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 5(1): 59-64. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-38592017000100007
- Villanueva, A. R., Cárdenas, S. E., Hernández, A. A. M., Mora, A. A. and Téliz, O. D. (2006). Patogénesis de la antracnosis (*Colletotrichum fragariae*) en frutos de chirimoya. *Agrociencia*, 40(8): 773-782. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2100819>
- Weir, B. S., Johnston, P. R. and Damm, U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in mycology*, 73(1): 115-180. <https://doi.org/10.3114/sim0011>
- Zavala, L. M. J., Tun, S. J. M., Cristóbal, A. J., Ruiz, S. E., Gutiérrez, A. O., Vázquez, C. M. and Méndez-G. R. (2005). Control postcosecha de la antracnosis en papaya y sensibilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. a fungicidas organosintéticos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 11(2): 251-255. <https://www.redalyc.org/pdf/609/60911210.pdf>