



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

HONGOS ENDÓFITOS EN CAFÉ PARA EL MANEJO DE *Emilia vastatrix* (BERK. & BR.) DEL SOCONUSCO, CHIAPAS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL



APROBADA



P R E S E N T A

Alba Leonorilda Solís Pérez

Bajo la supervisión de: DR. DIMAS MEJÍA SÁNCHEZ, DOCTOR EN CIENCIAS EN
FITOSANIDAD-FITOPATOLOGIA



Chapingo, Estado de México, Junio 2023

**HONGOS ENDOFITOS EN CAFÉ PARA EL MANEJO DE *Hemileia vastatrix*
(Berk. & Br.) DEL SOCONUSCO, CHIAPAS.**

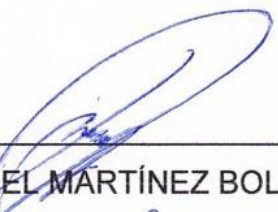
Tesis realizada por **ALBA LEONORILDA SOLIS PÉREZ** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR: _____


DR. DIMAS MEJÍA SÁNCHEZ

CO-DIRECTOR: _____


DR. MISAEL MARTÍNEZ BOLAÑOS

ASESOR: _____


DR. MATEO VARGAS HERNÁNDEZ

ASESOR: _____


DR. LUCIANO MARTÍNEZ BOLAÑOS

Contenido

ÍNDICE CUADROS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
DEDICATORIAS.....	vii
AGRADECIMIENTOS	ix
DATOS BIOGRÁFICOS.....	xi
RESUMEN GENERAL	xii
GENERAL ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. OBJETIVOS	3
1.1.1. Objetivo general	3
1.2. HIPÓTESIS	4
1.3. JUSTIFICACIÓN	4
2. CAPITULO I. HONGOS ENDÓFITOS EN LA AGRICULTURA: CASO CAFETO	5
2.1. Metodología.....	6
2.2. El café en el mundo	6
2.3. El café en México	6
2.4. Origen y distribución de la roya anaranjada	7
2.4.1. Ciclo patológico de la roya anaranjada.....	7
2.5. Control biológico.....	8
2.6. Hongos endófitos	8
2.7. Mecanismos de defensa	11
2.8. Diversidad y distribución de los hongos endófitos tropicales	11
2.8.1. Forma de transmisión	12
2.9. Nuevos enfoques de los hongos endófitos en la agricultura.....	14
2.10. Hongos endófitos en plantas de café.....	15
2.11. Conclusión.....	16
2.12. Literatura citada.....	16
3. CAPITULO II. RESPUESTA PATOGENICA DE CEPAS ENDÓFITAS DE <i>Colletotrichum</i> spp. AISLADAS DE CAFETOS SOBRE FRUTOS DE MANGO.....	24

3.1.	Resumen:	24
3.2.	Abstract.....	24
3.3.	Introducción.....	25
3.4.	Materiales y Métodos.....	26
3.4.1.	Sitio de estudio y muestreo	26
3.4.2.	Aislamiento e identificación	26
3.4.3.	Selección de cepas de <i>Colletotrichum</i> spp	27
3.4.4.	Pruebas de patogenicidad de cepas de <i>Colletotrichum</i> spp	27
3.4.5.	Análisis estadístico.....	28
3.5.	Resultados y Discusión	28
3.5.1.	Aislamiento e identificación	28
3.5.2.	Selección de cepas de <i>Colletotrichum</i> spp.	28
3.5.3.	Pruebas de patogenicidad de cepas de <i>Colletotrichum</i> spp., sobre frutos de mango Ataulfo	30
3.6.	Conclusión.....	33
3.7.	Literatura citada.....	33
4.	CAPITULO III. HONGOS ENDÓFITOS DE CAFETOS PARA EL MANEJO DE <i>Hemileia vastatrix</i> DEL SOCONUSCO, CHIAPAS	38
4.1.	Resumen:	38
4.2.	Abstract.....	38
4.3.	Introducción.....	39
4.4.	Materiales y Métodos.....	40
4.4.1.	Localización del Estudio.....	40
4.4.2.	Sitios de colecta	40
4.4.3.	Colecta de muestras	41
4.4.4.	Proceso de muestras.....	41
4.4.5.	Aislamiento e identificación morfológica.....	41
4.4.6.	Evaluación <i>In vitro</i> de la capacidad antagonista de los aislamientos de los hongos endófitos frente a <i>Hemileia vastatrix</i>	42
4.4.7.	Efectividad de los hongos endófitos aislados frente a <i>Hemileia vastatrix</i>	42

4.4.8.	Identificación molecular	43
4.4.9.	Secuenciación directa del ITS	44
4.4.10.	Alineación de secuencias y análisis filogenético.....	44
4.4.11.	Análisis estadístico.....	44
4.4.11.1.	Diseño experimental	45
4.5.	Resultados y Discusión	45
4.5.1.	Aislamiento de hongos endófitos.....	45
4.5.2.	Diversidad de géneros aislados por sitios.....	46
4.5.3.	Identificación morfológica de los hongos.....	46
4.5.4.	Evaluación <i>In vitro</i> de la capacidad antagonista de los aislamientos de los hongos endófitos frente a <i>Hemileia vastatrix</i>	47
4.5.5.	Identificación molecular	50
4.5.6.	Análisis filogenético.....	51
4.6.	Conclusión.....	53
4.7.	Literatura citada.....	54

ÍNDICE CUADROS

Cuadro 1. Respuesta patogénica de aislados endofíticos de <i>Colletotrichum</i> spp. en frutos de mango.	31
Cuadro 2. Respuesta patogénica de aislados endofíticos de <i>Colletotrichum</i> spp. en frutos de mango	32
Cuadro 3. Hongos endófitos por sitios de muestreo I, II y III	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análisis de conglomeración jerárquica, formando 13 agrupamientos de 67 cepas endófitas de <i>Colletotrichum</i> spp. End (endófito).....	29
Figura 2. Principales géneros identificados morfológicamente	47
Figura 3. Efecto de hongos endófitos en la inhibición de la germinación de uredosporas de <i>Hemileia vastatrix</i> en %. *End (Endófito)	49
Figura 4. Dendograma de los géneros <i>Daldinia</i> , <i>Diaphorte</i> y <i>Colletotrichum</i> con el método de máxima verosimilitud asegurando la estabilidad con 500 bootstrap	52

DEDICATORIAS

A Dios

Por permitir culminar un peldaño más, por darme fortaleza para seguir adelante, he tenido altas y bajas, pero tú siempre estás conmigo y deseo que este sea el final y comienzo de una nueva etapa.

A mis papás Moisés Solís Díaz y Juanita Pérez Matías, porque ustedes son el pilar de mi vida, por sus apoyo incondicional para seguir adelante, porque siempre están conmigo, por sus preocupaciones y ver que siempre este bien, ¡Gracias papá, Gracias Mamá!

A mi hermana Mirna Solís Pérez†, esperaste a que llegara a tu casa y pensé en verte pero ya no fue así, fuiste la mejor hermana que pude tener, siempre al pendiente de mí, todo lo que hacía era interesante para ti...te extraño hermana, pero me quedo con tus hermosos recuerdos y tu enseñanza, sé que estas en un hermoso lugar gozando de dicha y felicidad, descansa en paz hermanita del alma.

A mi hermana Olí, porque también eres muy preocupona, por estar al pendiente de mí, porque eres una hermana extraordinaria, te quiero mucho.

A Isa por apoyarme siempre, por tus hermosas palabras que me alientan a seguir adelante, eres grande hermana.

A mis hermanos Alo y César dos seres maravillosos, cada quien con su forma de ser, inteligentes y capaces son lo mejor que Dios pudo haberme dado.

A mi hermana Aní, gracias hermana por darnos unos sobrinos hermosos que ahora de grandes no se olvidan de nosotros (Vales, Yeimi, José) y nos regalan felicidad cada vez que nos visitan.

A mis sobrinos Ciri, Nicha, Chanita y Fredy, admiro la valentía con la que enfrentan las adversidades de la vida, no es fácil y es de admirarse. Dios los bendiga siempre y los quiero mucho, un abrazo fuerte para ustedes, van a salir adelante. Así será.

A mi sobrino Juan Diego, a mi sobrina Brani y a mi sobrina Akemi Paulina, Dios bendiga sus caminos para que puedan cumplir sus metas y lograr sus sueños. Los quiero mucho.

“Muy cerca de mi ocaso, yo te bendigo, vida, porque nunca me diste ni esperanza fallida, ni trabajos injustos, ni pena inmerecida;

Porque veo al final de mi rudo camino que yo fui el arquitecto de mi propio destino;

Que si extraje las mieles o la hiel de las cosas, fue porque en ellas puse hiel o mieles sabrosas: cuando planté rosales, coseché siempre rosas.

...Cierto, a mis lozanías va a seguir el invierno: ¡más tú no me dijiste que mayo fuese eterno! Hallé sin duda largas las noches de mis penas; mas no me prometiste tan solo noches buenas; y en cambio tuve algunas santamente serenas...

Amé, fui amado, el sol acaricio mi faz.

¡Vida, nada me debes! ¡Vida, estamos en paz!” ☺

Amado Nervo

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca completa para la realización de mis estudios de Maestría

A la Universidad Autónoma Chapingo por permitirme realizar mis estudios de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por darme las facilidades para realizar la fase experimental del tema de investigación, en el Laboratorio de Fitopatología

A los diferentes productores que visité en los ejidos Agua Caliente, Azteca y Benito Juárez San Vicente por facilitar sus parcelas y permitir coleccionar las muestras, ¡muchas gracias!

Al Dr. Dimas Mejía Sánchez, por su paciencia, sabiduría, ánimos, por ayudarme a realizar el trabajo molecular y por su gran apoyo para poder culminar con éxito el presente tema de investigación

Al Dr. Misael Martínez Bolaños por darme oportunidad de trabajar en el laboratorio de Fitopatología y facilitarme materiales para realizar la fase experimental, por su gran aporte de ideas al tema de investigación

Al Dr. Mateo Vargas Hernández por su gran aporte en el tema de la estadística y a sus ideas para poder mejorar el tema de investigación

Al Dr. Luciano Martínez Bolaños por sus sugerencias y opiniones para la mejora del presente trabajo de investigación

Al Dr. Moisés Alonso Báez por su aporte en el ámbito estadístico en este trabajo de investigación, por su sabiduría, por alentarme a seguir adelante y no rendirme, porque lo primero es lo primero y enseñarme que a pesar de las circunstancias en la que nos encontremos la vida siempre es bella!

Al M.C. Antonio Segura Miranda† por estar al pendiente en los trámites académicos durante los cursos impartidos, que descanse en paz maestro.

A Mary eres una mujer muy trabajadora, que siempre está al pendiente de los alumnos, gracias Mary, se te quiere mucho y Dios te bendiga siempre.

A los compañeros de la maestría (Ali, Víctor, Ana María, Erika, Jonathan y Betty) que aunque las condiciones para llevar los cursos no fueron las óptimas, conocí personas muy competitivas y muy trabajadoras, sigan dejando huella, que el campo del conocimiento, apenas empieza.

DATOS BIOGRÁFICOS



Alba Leonorilda Solís Pérez, nació el 17 de enero de 1991 en el ejido Azteca, municipio de Cacahoatán, Chiapas. Realizó sus estudios básicos en la escuela primaria 21 de agosto (1997-2003), el nivel medio básico en la escuela Telesecundaria 1073 (2003-2006), el nivel medio superior lo realizó en el Colegio de Bachilleres de Chiapas (COBACH) Plantel 140 Agustín de Iturbide (2006-2009) cursó sus estudios de nivel superior en la Universidad Autónoma de Chiapas, Facultad de Ciencias Agrícolas Campus IV Huehuetán, Chiapas y se graduó con el título de Ingeniero Agrónomo Tropical (2011-2016). Comenzó sus estudios de la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal en el año 2021 que pertenece al Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo (2021-2022).

RESUMEN GENERAL

¹HONGOS ENDÓFITOS EN CAFÉ PARA EL MANEJO DE *Hemileia vastatrix* (Berk. & Br.) DEL SOCONUSCO, CHIAPAS

La roya del cafeto es causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, una de las estrategias biológicas para controlar enfermedades son los hongos endófitos. En este estudio se aislaron endófitos fúngicos del tejido foliar del cafeto en tres sitios altitudinales del Soconusco, Chiapas. Se recuperaron 117 aislamientos de los cuales 67 cepas se identificaron como *Colletotrichum*, se evaluó el potencial patogénico de estas cepas sobre frutos de mango, las cuales se sometieron a un análisis de conglomeración jerárquica obteniéndose 13 agrupamientos, se tomó una cepa por cada grupo que correspondió a un tratamiento con cuatro repeticiones, como testigo negativo se utilizó discos de Agar-agua y como testigo positivo se utilizó la cepa *Colletotrichum* (6504). Los datos se evaluaron en un diseño completamente al azar mediante el Modelo Lineal Generalizado con distribución Poisson y función de enlace logarítmico, se compararon las medias ajustadas con Tukey al 5% de significancia. De los resultados se tomaron las cepas con patogenicidad nulos, las cuales fueron: end11, end43, end01, end85 y end21. De los aislamientos se identificaron a los géneros *Xylaria*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Pestalotiopsis*, *Stachybotrys*, *Curvularia*, *Diaporthe*, *Daldinia* y *Colletotrichum*. Se evaluó la capacidad antagonista de las cepas endófitas esporuladas frente a las uredosporas de *Hemileia vastatrix*, para conocer la efectividad de cada cepa, se utilizó la fórmula de Abbott, los que se mantuvieron por encima del 50% fueron: la cepa end21, end26, end01, end04, end06, end08, end11, end12, end93 y end72. La cepa end06 correspondió a *Daldinia* sp., la end08 a *Diaphorte* sp., y el resto a *Colletotrichum* spp. Las cepas que no resultaron antagónicas y tuvieron alto grado de patogenicidad fueron end93 y end72, las cepas antagónicas y faltaría evaluar su patogenicidad fueron end04, end06, end08, end12. Las cepas que resultaron antagónicas y tuvieron patogenicidad nulos fueron las cepas end01, end11 y end21.

Palabras clave: Roya anaranjada, control biológico, patógenos, antagonismo, aislamiento.

¹ Tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Alba Leonorilda Solis Pérez

Director de tesis: Dimas Mejía Sánchez

GENERAL ABSTRACT

²ENDOPHYTIC FUNGI IN COFFEE FOR THE MANAGEMENT OF *Hemileia vastatrix* (Berk. & Br.) FROM SOCONUSCO, CHIAPAS.

Coffee leaf rust (CLR) is caused by the fungus *Hemileia vastatrix*. One of the biological strategies to control diseases is endophytic fungi. In this study, fungal endophytes were isolated from coffee leaf tissue at three altitudinal sites in Soconusco, Chiapas. 117 isolates were recovered, of which 67 strains were identified as *Colletotrichum*. The pathogenic potential of these strains on mango fruits was evaluated. They were subjected to a hierarchical conglomeration analysis, obtaining 13 groups. One strain was taken for each group that corresponded to one treatment with four repetitions. Agar-water disks were used as a negative control and the *Colletotrichum* strain (6504) was used as a positive control. Data were evaluated in a completely randomized design using the Generalized Linear Model with Poisson distribution and logarithmic link function. Tukey-adjusted means were compared at 5% significance. From the results, the strains with null pathogenicity were taken. These were labeled end11, end43, end01, end85 and end21. The genera *Xylaria*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Pestalotiopsis*, *Stachybotrys*, *Curvularia*, *Diaporthe*, *Daldinia* and *Colletotrichum* were identified from the isolates. The antagonistic capacity of the sporulated endophytic strains was evaluated against the uredospores of *Hemileia vastatrix* to determine the effectiveness of each strain using the Abbott formula. Those that remained above 50% were the strains: end21, end26, end01, end04, end06, end08, end11, end12, end93, and end72. The end06 strain corresponded to *Daldinia* sp., the end08 to *Diaporthe* sp., and the rest to *Colletotrichum* sp. The strains that were not antagonistic and had a high degree of pathogenicity were end93 and end72. The antagonistic strains and their pathogenicity to be evaluated were end04, end06, end08 and end12. The strains that were antagonistic and had null pathogenicity were end01, end11 and end21.

Keywords: Coffee leaf rust, biological control, pathogens, antagonism, isolation

² Master of Science Thesis in Plant Protection, Department of Agricultural Parasitology, Universidad Autónoma Chapingo

Author: Alba Leonorilda Solís Pérez

Thesis Director: Dr. Dimas Mejía Sánchez

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El café en el mundo se cultiva en más de 80 países y es un cultivo importante tanto económico como social, ya que es generadora de empleos (directos e indirectos) y de divisas para el país. A nivel mundial, el principal productor de café en 2022 fue Brasil con una producción de 62.6 millones de sacos de 60 kg, seguido de Vietnam, Colombia, Indonesia, Etiopía y Uganda. México se posicionó en el lugar número diez con 3.84 millones de sacos de 60 kg, con 2.1% de la producción mundial (USDA, 2022b).

En México, el cultivo de café se cultiva en 14 estados: Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Puebla, Guerrero, Hidalgo, San Luis Potosí, Nayarit, Jalisco, Colima, México, Tabasco, Querétaro y Morelos. Chiapas es el principal productor de café con un volumen de producción de 378,933.64 toneladas por ha ($\text{ton}\cdot\text{ha}^{-1}$) y un aporte al total nacional de 36.7% (SIAP, 2023). De acuerdo a la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), aproximadamente el 35% de la producción de café en México es café arábigo de altura (cultivado por arriba de los 2950 msnm) y el 14% del total de producción es café Robusta (*Coffea canephora*) (USDA, 2022b).

Una de las enfermedades importantes del cultivo que afecta el rendimiento de granos es la roya anaranjada del café, causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, la roya es un parasito obligado cuya principal forma de multiplicación es a través de las uredosporas; las cuales son reniformes, equinuladas sobre su mitad superior y lisas ventralmente (Avelino y Rivas, 2013).

Los métodos de control para disminuir la incidencia de esta enfermedad se lleva a cabo el control cultural, variedades resistentes y el uso de fungicidas; sin embargo, el uso desmedido de estos productos provoca resistencia sobre los organismos que se desea controlar y contaminan el ambiente por lo que se opta por buscar métodos más amigables con el medio ambiente como el control biológico.

Este método implica el uso de organismos en este caso los hongos endófitos (Mejía, 2015). Estos se encuentran en el interior de los tejidos de las plantas, son productores de metabolitos secundarios y son capaces de ayudar a sus hospederos a tolerar condiciones bióticas y abióticas como enfermedades, daños por insectos plaga, alta salinidad y altas temperaturas (Backman y Sikora, 2008; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

Este tipo de hongos son organismos mutualistas que le confieren beneficios a sus hospederos, al suprimir el crecimiento y actividades de organismos patógenos (Mejía, 2015). El aislamiento y estudio de hongos endófitos se ha realizado en plantas medicinales (Gangadevi y Muthumary, 2008), plantas acuáticas (Zheng *et al.*, 2022), hortalizas (Díaz-González *et al.*, 2020), árboles de importancia agrícola como el mango (Vieira *et al.*, 2014), cacao (Mejía *et al.*, 2008), café (Vega *et al.*, 2010) y otros cultivos.

Estudios realizados en *Coffea* spp., se han identificado una amplia diversidad de hongos endófitos, Santamaría & Bayman (2005) reportaron aislamientos de *Botryosphaeria*, *Colletotrichum*, *Guignardia* y *Xylaria* en Puerto Rico; Vega *et al.*, (2010) identificaron *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Xylariaceae* en Hawái, México, Puerto Rico y Colombia; Bongiorno *et al.* (2016) identificaron *Colletotrichum*, *Trichoderma*, *Schizophyllum*, *Mycosphaerella*, *Cladosporium* y *Cercospora* en Brasil. El género comúnmente aislado en tejido foliar de café es el hongo endófito *Colletotrichum* (Araujo *et al.*, 2001), este género ha llamado la atención ya que se ha asociado a hongos patógenos y causan la enfermedad de antracnosis que afecta a cultivos como el café, también se ha encontrado como hongos saprobios (Cao *et al.*, 2019). Algunos autores indican que la colonización endófitica pudiera considerarse una importante ruta para el desarrollo de enfermedades; sin embargo, se han encontrado especies de *Colletotrichum* spp., como endófitos, con otro estilo de vida en el cual el microorganismo está activo dentro del tejido vegetal y establece una interacción simbiótica sin causarle daño aparente y sin que haya una expresión de síntomas (Hyde & Soyong, 2008). Los hongos endófitos se reportan en el género *Colletotrichum* spp., como

mejoradores en el rendimiento de las plantas (Díaz-González *et al.*, 2020) como inhibidor mitótico (Gangadevi & Muthumary, 2008), como biocontroladores (Casas *et al.*, 2021).

Tanto en la zona templada como en la zona tropical se pueden encontrar diversidad de microorganismos endófitos; sin embargo, en la zona tropical los estudios realizados hasta ahora son muy pocos, no han sido explorados minuciosamente y es probable que allí se encuentre la mayor diversidad endófito en el mundo (Arnold *et al.*, 2000).

Los hongos endófitos se han aislado de plantas de café en países como Colombia, Hawái (Vega *et al.*, 2010), Puerto Rico (Santamaría y Bayman, 2005), y el uso de estos hongos para controlar roya del cafeto ha tenido buenos resultados en Perú (Mamani-Huayhua *et al.*, 2021). Son pocos los estudios realizados en México sobre el uso de hongos endófitos como alternativa de control biológico y para este caso, que inhiba al hongo *Hemileia vastatrix*, conlleva a realizar el siguiente trabajo de investigación.

Se realizaron aislamientos de especies endófitas de tejido foliar del cafeto, por lo que el objetivo del primer artículo fue evaluar el potencial patogénico de cepas endófitas identificadas como *Colletotrichum* spp., sobre un hospedero alternativo que fue frutos de mango Ataulfo. En estudios previos realizados en otros países determinaron especies endófitas con potenciales antagonistas por lo cual el objetivo del segundo estudio fue evaluar el potencial antagonista de cepas endófitas en las zonas cafetaleras de Chiapas, para hallar al menos un hongo endófito que inhiba a *Hemileia vastatrix* causante de la enfermedad roya anaranjada del cafeto.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

Aislar hongos endófitos con potencial antagonista en cafetos para contrarrestar a *Hemileia vastatrix* (Berk & Br). del Soconusco, Chiapas.

1.2. HIPÓTESIS

Los hongos endófitos aislados no tienen capacidad antagonista hacia *Hemileia vastatrix* Berk & Br. del Soconusco, Chiapas.

Al menos un hongo endófito aislado tiene capacidad antagonista hacia el desarrollo de *Hemileia vastatrix* Berk & Br. del Soconusco, Chiapas.

El sitio altitudinal no influye sobre la diversidad fúngica endófito de cafetales en la región Soconusco, Chiapas.

El sitio altitudinal influye sobre la diversidad fúngica endófito de cafetales en la región Soconusco, Chiapas.

1.3. JUSTIFICACIÓN

En México no se han estudiado a los hongos endófitos como alternativa de control biológico sobre el hongo *Hemileia vastatrix* en plantas de café. Los estudios realizados sobre aislamientos de hongos endófitos en cafetos, está lo reportado en Veracruz por Saucedo-García *et al.* (2014) y en Chiapas por Vega *et al.* (2010); sin embargo en cuanto a pruebas de antagonismo de hongos endófitos sobre *Hemileia vastatrix* en plantas de café no se han realizado estudios, hace falta conocer la importancia de estos organismos y saber aprovecharlos como método de control biológico. Esto conllevó a realizar el siguiente trabajo de investigación en donde se realizaron aislamientos de hongos endófitos a partir de tejido foliar de café en tres sitios altitudinales del Soconusco en Chiapas para hallar cepas con potencial antagonista, que inhiba la germinación de las uredosporas de *Hemileia vastatrix* causante de la enfermedad roya anaranjada del cafeto. Es importante y necesario ampliar el conocimiento sobre los hongos endófitos partiendo de diferentes sitios de muestreo con diferentes variedades de cafetos, considerando las diferentes regiones y el manejo de la plantación.

2. CAPITULO I. HONGOS ENDÓFITOS EN LA AGRICULTURA: CASO CAFETO

Los hongos endófitos se encuentran en el interior de los tejidos de las plantas, son productores de metabolitos secundarios y son capaces de ayudar a sus hospederos a tolerar condiciones bióticas y abióticas como enfermedades, daños por insectos plaga, alta salinidad y altas temperaturas (Backman y Sikora, 2008; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

Este tipo de hongos son organismos mutualistas que le confieren beneficios a sus hospederos, al suprimir el crecimiento y actividades de organismos patógenos (Mejía, 2015). El aislamiento y estudio de hongos endófitos se ha realizado en plantas medicinales (Gangadevi y Muthumary, 2008), plantas acuáticas (Zheng *et al.*, 2022), hortalizas (Díaz-González *et al.*, 2020), árboles de importancia agrícola como el mango (Vieira *et al.*, 2014), cacao (Mejía *et al.*, 2008), café (Vega *et al.*, 2010) y otros cultivos.

El uso de los hongos endófitos como agentes de control biológico ha cobrado interés en cultivos de importancia económica y social como lo es el café arábigo, como una herramienta para el control de fitopatógenos de gran importancia como lo es la enfermedad roya anaranjada del café, causada por el hongo *Hemileia vastatrix*. La roya causa defoliación de la planta, disminuye la actividad fotosintética y por ende la producción de granos (Schieber y Zentmyer, 1984).

Los hongos endófitos se han aislado de plantas de café en países como Colombia, Hawái (Vega *et al.*, 2010), Puerto Rico (Santamaría y Bayman, 2005), y el uso de estos hongos para controlar roya del cafeto ha tenido buenos resultados en Perú (Mamani-Huayhua *et al.*, 2021). En México los estudios realizados sobre aislamientos de hongos endófitos solo está lo reportado en Veracruz por Saucedo-García *et al.* (2014) y en Chiapas por Vega *et al.* (2010), en cuanto a pruebas de antagonismo de hongos endófitos en plantas de café no se han realizado estudios, hace falta conocer la importancia de estos organismos y saber aprovecharlos como método de control biológico. En el presente trabajo

se realizó una revisión bibliográfica con el objetivo de mostrar la importancia de este grupo de microorganismos para el sistema café arábigo-roya anaranjada.

2.1. Metodología

Se obtuvo información de ELSEVIER, Agris FAO, Google Scholar, Redalyc, SciELO, MDPI, PubMed, Springer Link, BioOne. Para seleccionar los artículos revisados se tomaron en cuenta las de tipo agrícolas, medicinales, bioquímicos, ambiental y geográfico.

2.2. El café en el mundo

El aromático grano del café, se cultiva en más de 80 países y es la segunda bebida más vendida en el mundo. El principal productor de café en 2022 fue Brasil con una producción de 62.6 millones de sacos de 60 kg, seguido de Vietnam, Colombia, Indonesia, Etiopía y Uganda. México se posicionó en el lugar número diez con 3.84 millones de sacos de 60 kg, con 2.1% de la producción mundial (USDA, 2022b). En cuanto a exportación, Brasil fue el principal exportador de café en ese mismo año con 36.6 millones de sacos de 60 kg y en cuanto a importación la Unión Europea fue el principal importador con 44.5 millones de toneladas de 60 kg, seguido de Estados Unidos, Japón, Filipinas, Canadá, Rusia y China (USDA, 2022a).

2.3. El café en México

México presenta una superficie sembrada de café de 698,035.69 ha y una superficie cosechada de 651,920.40 ha; un volumen de producción de 1,031,761.89 ton. El cultivo de café se cultiva en 14 estados: Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Puebla, Guerrero, Hidalgo, San Luis Potosí, Nayarit, Jalisco, Colima, México, Tabasco, Querétaro y Morelos. Chiapas es el principal productor de café con un volumen de producción de 378,933.64 toneladas por ha ($\text{ton}\cdot\text{ha}^{-1}$) y un aporte al total nacional de 36.7% (SIAP, 2023). De acuerdo a la Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), aproximadamente el 35% de la producción de café en México es café arábigo de altura (cultivado por arriba de los 2950 msnm) y el 14% del total de producción es de café Robusta (*Coffea canephora*) (USDA, 2022b).

2.4. Origen y distribución de la roya anaranjada

La roya anaranjada es causada por el hongo (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome), el cual es un parásito obligado, el género *Hemileia* tiene más de 50 especies, de ellas dos especies pueden afectar al café: *H. vastatrix* y *H. coffeicola*. La principal forma de multiplicación de la roya es a través de las uredosporas; las cuales se caracterizan por ser reniformes, equinuladas sobre su mitad superior y lisa ventralmente (Avelino y Rivas, 2013). Fernandes *et al.* (2009) indican que las teliosporas y basidiosporas de la roya anaranjada, son genética y morfológicamente inestables es decir que no tienen ninguna función y que son solo vestigios.

La roya (*H.vastatrix*) se observó por primera vez en 1861, en café silvestre, cerca del Lago Victoria en África Oriental; posteriormente en 1869 se encontró en Ceilán (ahora Sri Lanka) (Schieber y Zentmyer, 1984; McCook, 2006; Avelino y Rivas, 2013); posteriormente se dispersó a otras partes del mundo.

En México, la roya se detectó por primera vez en el año 1981, su llegada al país fue por Chiapas en el ejido Felipe Carrillo Puerto, del municipio de Tapachula (Fraire, 1983; McCook, 2009) y posteriormente se distribuyó a los diferentes estados productores de café, donde hasta el ciclo productivo 2012-2013, había convivido con las plantaciones de café con efectos de bajo impacto pero desde estos años la roya ha incrementado su impacto (Hernández-Martínez y Velázquez-Premio, 2016).

Desde el primer reporte de la roya anaranjada, se han reportado más de 49 razas de este Fitopatógeno, siendo la raza II, la que presenta mayor incidencia de enfermedad y la de mayor distribución a nivel mundial (Gichuru *et al.*, 2012).

2.4.1. Ciclo patológico de la roya anaranjada

El ciclo de CLR (roya anaranjada del cafeto) desde la uredospora hasta la esporulación, se divide en etapas: 1) primero se lleva a cabo la diseminación, que consiste en la liberación de la uredospora a partir del esporóforo y se deposita sobre la hoja; 2) seguido de esto, continua la germinación que marca el inicio del

proceso infeccioso, la penetración del hongo que le permite establecer relaciones tróficas entre el hongo y el hospedero y la colonización de las hifas que inducen a la presencia de los primeros síntomas (lesiones cloróticas); 3) finalmente se lleva a cabo la fase de la esporulación que consiste en la producción de nuevas uredosporas infecciosas. Los principales factores que favorecen la dispersión de las uredosporas son: lluvia (no intensa, porque puede generar lavado de uredosporas), el viento, la presencia de insectos y movilidad de personas; mientras que para que se dé la germinación se requieren: temperaturas de 22°C, obscuridad, agua libre durante todo el proceso hasta la penetración y esto se lleva a cabo en un lapso de 24 a 48 horas (Avelino y Rivas, 2013).

2.5. Control biológico

El control biológico se puede definir como el uso de un organismo para suprimir las actividades y poblaciones de otro organismo y se ha utilizado para manejar insectos-plaga, patógenos y malas hierbas (Pal y McSpadden, 2006), el control biológico es la manifestación de interacciones entre la planta (huésped), el patógeno, el agente de control biológico (antagonista) y la comunidad microbiana. El control biológico se caracteriza porque tiene soluciones a largo plazo, amigables con el medio ambiente (Mejía, 2015). En el caso particular del cafeto se ha evaluado el control biológico como estrategia de su manejo ecológico y se han encontrado hongos micoparasitos con potencial para el control biológico de la roya en regiones cafetaleras distintas al sitio de origen de *H. vastatrix*, un ejemplo es *Lecanicillium lecanii* (Avelino y Rivas 2013). En café y cacao se utiliza el control biológico aumentativo, el cual implica la detección de enemigos naturales del organismo que se quiere controlar en sitios diferentes a su lugar de origen y el posterior aumento de los niveles del mismo en áreas seleccionadas, para que los mismos supriman las actividades o poblaciones del organismo a ser controlado (Mejía, 2015).

2.6. Hongos endófitos

El microbioma vegetal es el total de microorganismos que habitan los tejidos internos (endófitos) y externos (ectofíticos) de una planta, estos incluyen a los

microhongos y bacterias, que van desde patógenos a mutualistas (Mejía, 2015). El término endófito se conoce desde el siglo XIX y fue propuesto por Henrich Anton de Bary en 1866 (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013). Rodríguez *et al.* (2008) definen endófito como un microorganismo que vive durante todo o parte de su ciclo de vida dentro de los tejidos internos de las plantas vivas, sin ocasionar ningún síntoma o efecto negativo, es decir viven en los espacios inter e intracelulares de las plantas. Los hongos endófitos habitan en el apoplasto de la célula, en los tejidos vasculares y en algunos casos el interior celular de las raíces, tallos y hojas de las plantas (Fontana *et al.*, 2021) pueden ser facultativos, es decir colonizan las plantas en ciertas etapas de su vida u obligados que viven en las plantas durante todo su ciclo de vida.

Hay evidencia de la existencia de la simbiosis planta-hongo endófito desde hace varios años (Carroll, 1995). Los primeros registros de la presencia de hongos endófitos, provienen del año 1898 con los registros de *Neotyphodium coenophialum* en los pastos *Lolium temulentum*, *L. arvense*, *L. linicolum* y *L. remotum* (Sánchez- Fernández *et al.*, 2013).

Los hongos endófitos han mostrado un gran potencial para su uso agronómico y médico, como controladores biológicos y sustancias bioactivas (Mejía *et al.*, 2008). La interacción con sus hospederos es compleja, ya que puede ser mutualista y antagonista. Para el primer caso los endófitos le confieren a la planta gran potencial adaptativo frente a condiciones adversas que generen estrés, ya sean de tipo abiótico (salinidad, acidez, sequía y alta temperatura) o biótico (plagas y patógenos) (Abello y Kelemu, 2006; Nadeem *et al.*, 2014). Entre los mecanismos de regulación propuestos para conferir tolerancia a sequia se encuentran el aumento del tamaño de las raíces y las hojas y la regulación de la apertura y cierre de los estomas, acumulación de osmolitos y la activación del sistema de protección anti-oxidación (Ek-Ramos, 2020).

Dentro de las plantas se produce una relación de antagonismo balanceado, el cual puede variar de acuerdo a factores ambientales y por la etapa de desarrollo de ambos organismos; de tal manera que, cuando los factores de virulencia del

hongo y la defensa de la planta están en equilibrio se establece una relación endófito y cuando se presenta la senescencia de la planta o se encuentra bajo estrés, el balance se va hacia el hongo y es ahí cuando se expresa en forma de patógeno, induciendo síntomas de una enfermedad (Sánchez- Fernández *et al.*, 2013).

Los hongos endófitos que habitan en varios compartimentos de las plantas promueven ampliamente el crecimiento de las plantas a través de mecanismos directos e indirectos (Waqas *et al.*, 2012). En el mecanismo directo los organismos endófitos regulan diversas hormonas vegetales como la citoquinina, etileno y auxinas; además, mejoran la disponibilidad de nutrientes del suelo, la solubilización de fósforo, hierro, la producción de sideróforos y la fijación de nitrógeno. El mecanismo indirecto se refiere a que los organismos endófitos previenen el daño a las plantas al liberar enzimas, antibióticos, cianuro de hidrógeno y compuestos volátiles que inhiben las actividades de los patógenos e inducen resistencia sistémica (Segaran y Sathivelu, 2019). También modulan las fitohormonas del hospedero, como los ácidos jasmonicos o salicílico y desintoxicación de metabolitos de defensa constitutivos del hospedero (Schulz *et al.*, 2015).

Estudios realizados por Suebrasri *et al.* (2020) indican que los organismos endófitos producen metabolitos promotores del crecimiento de las plantas, como las enzimas (proteasa, xilanasas, amilasa y celulasa) y ácido indol-3-acético. En la relación con su hospedero, el endófito induce el incremento de la tasa de fotosíntesis y la transpiración, además protege al hospedero contra patógenos mediante la inducción de las respuestas de defensa sistémicas y la síntesis de metabolitos con actividad biológica, que repelen o propician la muerte de los organismos plaga (Fontana *et al.*, 2021). Algunos pueden producir nanopartículas metálicas que tienen una alta actividad contra varios patógenos (Naik, 2020).

Algunos géneros de hongos endófitos utilizados como agentes de control biológico de enfermedades de plantas son: *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Cordana*, *Curvularia*, *Guignardia* y *Trichoderma* (Silva

et al., 2012; Cui *et al.*, 2021); sin embargo existen géneros de hongos que son fitopatógenos y que pueden comportarse como endófitos como es el caso de *Colletotrichum* y sus especies *C. tofieldiae* (Hiruma *et al.*, 2016), *C. siamense* (Munasinghe *et al.*, 2017). *C. gloeosporioides* (Rabha *et al.*, 2014).

2.7. Mecanismos de defensa

La resistencia en las plantas puede ser definida como la habilidad del hospedero, para prevenir la colonización y desarrollo del patógeno, esta respuesta implica mecanismos de defensa de la planta de tipo bioquímico o estructural, los hongos endófitos emplean diversos mecanismos en el control de fitopatógenos induciendo la resistencia a través de la expresión génica (Adeleke *et al.*, 2022a). En forma adicional, la presencia de estos microorganismos también pueden ayudar a las plantas debido a que producen importantes metabolitos secundarios, como compuestos anticancerígenos (El-Bialy y El- Bastawisy, 2020), antifúngicos, antidiabéticos e inmunosupresores que inhiben el desarrollo de los fitopatógenos (Adeleke y Babalola, 2021). Algunos compuestos como los terpenoides, policetidos, esteroides, quinonas, flavonoides, alcaloides y péptidos se han extraído de endófitos (Latz *et al.*, 2018) y son reconocidos por la planta huésped.

Las proteínas ricas en Cisteína se secretan como resultado de los procesos de habitabilidad endofíticos y patógenos para aumentar la compatibilidad de la planta hospedante, al inducir respuestas fisiológicas y de defensa (Ku *et al.*, 2020). Algunos estudios mencionan que el estrés ambiental, los cambios climáticos o la senescencia de la planta pueden facilitar la conversión de endófitos a patógenos y también juegan un papel de patógenos a endófitos (Cui *et al.*, 2021).

2.8. Diversidad y distribución de los hongos endófitos tropicales

Los bosques templados y tropicales presentan una gran biodiversidad de plantas y estas parecen albergar una cantidad significativa de hongos endófitos (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013); sin embargo, la composición de especies endófitas es muy diferente entre la zona templada y el trópico. De igual manera,

las comunidades de los hongos endófitos varían de acuerdo a los estratos dentro del dosel del bosque (Gamboa-Gaitán, 2006).

Arnold y Herre (2003), mencionan que todas las plantas albergan hongos endófitos dentro de sus tejidos y que las plantas tropicales tienen el potencial de desarrollar simbiosis endófitas. Estos microorganismos son una fuente rica de metabolitos secundarios y presentan una alta diversidad, estructura espacial y afinidad de hospedante entre endófitos foliares (Santamaría y Bayman, 2005; Gamboa-Gaitán, 2006). Uno de los taxones endófitos más comunes en los trópicos es el de la familia *Xylariaceae* y se pueden encontrar en raíz, tallos, hojas, flores y frutos (Petrini *et al.*, 1995). En cuanto a la distribución de los hongos endófitos en los tejidos vegetales, es posible encontrar diferentes especies endófitas en cada uno de los tejidos de una hoja, como en el parénquima, haces vasculares y dermis (Rodríguez, 1994). En la rizósfera los endófitos pueden infiltrarse fácilmente desde el entorno externo del suelo hacia las raíces de las plantas y colonizarla (Ghaffari *et al.*, 2019).

Los hongos endófitos aislados con mayor frecuencia incluyen las especies de *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Fusarium* y *Xylaria* (Araujo *et al.*, 2001). En taxones con amplio rango de distribución como *Colletotrichum* y *Phomopsis*, pueden existir numerosas cepas morfológicamente variables. En especies como *Gynoxis oleifolia* (*Asteraceae*), se reportan especies endófitas que son exclusivas de la raíz y otras que habitan la corteza y las *hojas* (Gamboa-Gaitán, 2006). Sánchez-Fernández *et al.* (2013) estimaron que debe haber 1.3 millones de especies de hongos endófitos por descubrir, se han realizado varios estudios en las zonas templadas y en las zonas tropicales; sin embargo, los estudios aún son muy limitados especialmente en las plantas leñosas.

2.8.1. Forma de transmisión

La mayoría de los hongos endófitos pertenecen al Phylum Ascomycota aunque también se han encontrado en Basidiomycota, Zygomycota y Oomycota (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013). Estos hongos nunca abandonan a su huésped, se transmiten verticalmente de padres a hijos a través de semillas

(Selosse y Schardl, 2007); el endófito infecta el ovulo de la semilla en desarrollo y permanece inactivo hasta la germinación (Oliveira *et al.*, 1996; Lugtenberg *et al.*, 2016). Otra forma de transmisión es la transmisión horizontal, en la cual los endófitos se transmiten a través de esporas del suelo o del aire (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013) y comienza cuando los hongos reconocen al huésped potencial, para posteriormente penetrarlo a través de la epidermis o por heridas naturales y luego viene la germinación de esporas.

Los hongos endófitos se clasifican como Clavicipitaceos y no Clavicipitaceos. Los hongos endófitos Clavicipitaceos están asociados con pastos; pertenecen filogenéticamente a la familia de los hipocreales, ayudan a proteger las plantas hospedantes contra los insectos que se alimentan de ellas y su principal característica es que son simbioses biotrofos obligados y se transmiten de manera vertical y horizontal (Arredondo *et al.*, 2020).

Los hongos endófitos no Clavicipitaceos colonizan las plantas vasculares, helechos, coníferas y angiospermas (Rodríguez *et al.*, 2009). Una de las características más interesantes de los hongos endófitos No-Clavicipitaceos, es la amplia diversidad de especies que se han logrado aislar e identificar. De igual manera, se han clasificado en tres, principalmente con base en el tipo de tejido vegetal que colonizan: a) tejidos aéreos y subterráneos, y se transmiten de manera vertical y horizontal; b) los que únicamente colonizan tejidos aéreos, y se transmiten de manera horizontal y c) los que solo colonizan tejidos subterráneos y se transmiten de manera horizontal (Ek-Ramos, 2020).

Se han reportado que los No clavicipitaceos colonizan tejidos aéreos y subterráneos, se transmiten de manera vertical y horizontal, confieren tolerancia a valores tóxicos de pH, salinidad o temperatura, incluso se ha propuesto que estos microorganismos, son los responsables de la supervivencia de las plantas en condiciones extremas (Rodríguez *et al.*, 2009).

2.9. Nuevos enfoques de los hongos endófitos en la agricultura

Los enfoques científicos, tienen un enfoque moderno sostenible en los sistemas agrícolas: la formulación de bioinoculantes y el uso de pesticidas (Adeleke *et al.*, 2022b). Los metabolitos secundarios de hongos endófitos se están utilizando para el desarrollo de los agroquímicos, nematocidas, fungicidas, insecticidas, y herbicidas.

Los hongos endófitos producen y liberan muchos compuestos efectores como los antibióticos, toxinas y metabolitos fungitoxicos, contra patógenos de las plantas; además inhiben a los patógenos a través de la producción de celulasa, glucanasa, quitinasa y lactonas (Goates y Mercier, 2009).

Algunos estudios realizados sobre los beneficios de los hongos endófitos son los realizados por Clay *et al.* (1993) donde mencionan que en *Spodoptera frugiperda* presentó alta mortalidad, cuando fueron alimentadas con *Festuca arundinacea* que contenían el hongo endófito (*Acremonium* spp), Mejía *et al.* (2008) mencionan que del grupo de los hongos endófitos como *Colletotrichum gloeosporioides* y *Clonostachys rosea*, tuvieron efecto sobre *Phytophthora* sp y *Moniliophthora roreri* en plantas de cacao. *C. gloeosporioides* también ha mostrado efecto antagonista sobre *Alternaria alternata* en la planta medicinal *Cornus officinalis* (Zhao *et al.*, 2020). El hongo endófito *Piriformospora indica* aislado de una micorriza arbuscular, fue capaz de inducir tolerancia al estrés salino en plántulas de cebada (Waller *et al.*, 2005), este mismo hongo mejoró la calidad de frutos de naranjos y las propiedades del suelo en China (Cheng *et al.*, 2022). Por otro lado el hongo endófito *Acremonium alternatum* controla el daño causado por la polilla *Plutella xylostella* en *Phaseolus vulgaris* e induce resistencia contra *Leveillula taurica* en tomates (Kasselaki *et al.*, 2006). *Penicillium indica* puede regular la producción de fitohormonas y contribuye al crecimiento de las raíces en cultivos como la cebada y el tabaco. El hongo endófito *Acremonium alternatum* controla el daño causado por la polilla *Plutella xylostella* en frijoles (Lu *et al.*, 2022). Ek-Ramos *et al.* (2013) señalo que el hongo *Phomopsis* (endófito de algodón) reduce la actividad herbívora de la oruga en la

planta de algodón. Un ejemplo más sobre la interacción de los hongos endófitos hacia las plantas es *Piriformospora indica*, que es capaz de inducir resistencia contra *Fusarium oxysporum* en *Musa* spp., esto al aumentar las enzimas antioxidantes (Cheng *et al.*, 2020), en otro estudio *Fusarium oxysporum* de la cepa EF119 actuó como agente de biocontrol para las plantas de tomate contra oomicetos como *Phytophthora infestans* (Kim *et al.*, 2007). Rabha *et al.* (2014) mencionan el efecto antagonista de *C. gloeosporioides* aislado de *Camellia sinensis*, contra los patógenos del té *Pestalotiopsis theae* y *Colletotrichum camelliae* (Douanla-Meli *et al.*, 2013).

Algunos endófitos utilizados como biofertilizantes son las especies del género *Epichloë* (Kauppinen *et al.*, 2016); en condiciones de alta salinidad, el endófito *Epichloë bromicola*, aumenta la tolerancia de la cebada silvestre (*Hordeum brevisubulatum*) al estrés al aumentar la capacidad de la germinación y el crecimiento de las semillas (Wang *et al.*, 2019).

2.10. Hongos endófitos en plantas de café

Los primeros estudios de hongos endófitos en café fueron reportados por Rayner en 1948 y desde entonces se realizaron muchos más; sin embargo los estudios referentes a antagonismo son pocos. En *Coffea* spp. los hongos endófitos se transmiten horizontalmente (Rodríguez *et al.*, 2009) y se han aislado algunos hongos endófitos a partir de frutas, hojas, raíces y semillas.

Los estudios realizados en *Coffea* spp. han permitido identificar una amplia diversidad de hongos endófitos. Santamaría y Bayman (2005) reportaron aislamientos de *Botryosphaeria*, *Colletotrichum*, *Guignardia* y *Xylaria* en Puerto Rico a partir de tejidos foliares. Vega *et al.* (2010) identificaron a *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium* y miembros de la familia *Xylariaceae* en Hawái, México, Puerto Rico y Colombia. Bongiorno *et al.* (2016) identificaron a *Colletotrichum*, *Trichoderma*, *Schizophyllum*, *Mycosphaerella*, *Cladosporium* y *Cercospora* en Brasil. En la especie *Coffea arábica* los géneros más comunes que se han aislado son: *Colletotrichum* spp., *Xylaria* spp., y *Guignardia* (Santamaría y Bayman, 2005). En un estudio realizado por Lu *et al.* (2022) aislaron hongos endófitos en

plantas de café en China y el género más abundante fue *Colletotrichum* spp., otro estudio realizado por Oliveira *et al.* (2014) en Brasil en donde realizaron aislamientos y encontraron una diversidad de hongos endófitos entre las más abundantes fueron *Colletotrichum gloeosporioides* y *Phyllosticta capitalensis*.

El uso de hongos endófitos como agentes de control biológico en café es reducido; Mamani-Huayhua *et al.* (2021) reportaron el uso de cepas de hongos endófitos para reducir la incidencia y severidad de la roya anaranjada del café (*Hemileia vastatrix*); en forma similar Kapeua-Ndacnou *et al.* (2023) reportaron el aislamiento del género *Clonostachys* y su potencial como antagonista sobre roya anaranjada.

La protección de enfermedades ocurre al suprimir y reducir los niveles de infección (Fontana *et al.*, 2021). Un dato importante sobre los hongos endófitos es que muchos no pueden ser identificados por aspectos morfológicos ya que algunos no esporulan o no hay especies descritas (Petrini *et al.*, 1995) por lo cual es necesario el uso de las técnicas moleculares que permiten detectar cantidades de hongos endófitos que difícilmente pueden ser encontradas con los métodos tradicionales de aislamiento.

2.11. Conclusión

Los microorganismos endófitos presentan un potencial para la bioprotección de las plantas, sin causar un impacto negativo al ambiente que busca un desarrollo de agricultura sostenible. En el cultivo de café, existen pocos estudios al respecto, por lo cual es necesario impulsar investigaciones con énfasis para el manejo de la roya del café.

2.12. Literatura citada

- Abello JF y Kelemu S. 2006. Hongos endófitos: Ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología agropecuaria, 7(2), 55-57. <https://www.redalyc.org/pdf/4499/449945021006.pdf>
- Adeleke BS and Babalola OO. 2021. Pharmacological Potential of Fungal Endophytes Associated with Medicinal Plants: A Review. Journal of Fungi. 7(2), 147. doi: [10.3390/jof7020147](https://doi.org/10.3390/jof7020147)

- Adeleke BS, Ayilara MS, Akinola SA and Babalola OO. 2022a. Biocontrol mechanisms of endophytic fungi. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32 (46) <https://doi.org/10.1186/s41938-022-00547-1>
- Adeleke BS, Fadiji AE, Ayilara MS, Igiehon ON, Nwachukwu BC and Babalola OO. 2022b. Strategies to Enhance the Use of Endophytes as Bioinoculants in Agriculture. *Horticulturae*, 8(6), 498. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8060498>
- Araújo WL, Maccheroni WJr, Aguilar-Vildoso CI, Barroso PA, Saridakis HO and Azevedo JL. 2001. Variability and Interactions between Endophytic Bacteria and Fungi Isolated from Leaf Tissues of Citrus Rootstocks. *Canadian Journal Microbiology*, 47(3), 229–236. DOI: [10.1139/w00-146](https://doi.org/10.1139/w00-146)
- Arnold AE and Herre EA. 2003. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Micología*, 95(3), 388-398. <https://www.jstor.org/stable/3761880>
- Arredondo BHC (Ed), Tamayo MF (Ed), Rodríguez del BLA (Ed). 2020. *Fundamento y práctica del control biológico de plagas y enfermedades*. Estado de México, México: Editorial del Colegio de Postgraduados.
- Avelino J y Rivas G. 2013. La roya anaranjada del cafeto. Versión electrónica, 6-13. Recuperado de <http://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01071036>
- Backman AP and Sikora AR. 2008. Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control*, 46 (1), 1-3. Doi:10.1016/j.biocontrol.2008.03.009
- Bongiorno VA, Rhoden SA, García A, Polonio JC, Azevedo JL, Pereira JO and Pamphile JA. 2016. Genetic diversity of endophytic fungi from *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 in organic crops. *Ann. Microbiol*, 66(2), 855–865. DOI: [10.1007/s13213-015-1168-0](https://doi.org/10.1007/s13213-015-1168-0)
- Carroll G. 1995. Forest Endophytes: Pattern and Process. *Canadian Journal of Botany*, 73(1), 1316-1324. <https://doi.org/10.1139/b95-393>
- Cheng C, Li D, Qi Q, Sun X, Anue MR, David BM, Zhang Y, Hao X, Zhang Z and Lai Z. 2020. The Root Endophytic Fungus *Serendipita Indica* mejora la resistencia del banano a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* Tropical Raza 4. *European Journal of Plant Pathology*, 156, 87–100. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-019-01863-3>
- Cheng XF, Xie MM, Li Y, Liu BY, Wu QS and Kuca K. 2022. Effects of field inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and endophytic fungi on fruit quality and soil properties of Newhall navel orange. *Applied Soil Ecology*, 170 (1-2), 104308. DOI: [10.1016/j.apsoil.2021.104308](https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104308)
- Clay K, Marks S and Cheplick GP. 1993. Effects of Insect Herbivory and Fungal Endophyte Infection on Competitive Interactions among Grasses. *Ecology*, 74(6), 1767-1777. <https://doi.org/10.2307/1939935>

- Cui R, Lu X, Chen X, Malik WA, Wang D, Wang J, Wang S, Guo L, Chen Ch, Wang Xia, Wang X, Dai M and Ye W. 2021. A novel raffinose biological pathway is observed by symbionts of cotton=*Verticillium dahliae* to improve salt tolerance genetically on cotton. Journal Agronomy and Crop Science, 207(1), 956–969. Doi: 10.1111/jac.12556
- Díaz-González S, Marín P, Sánchez R, Arribas C, Kruse J, González-Melendi P, Brunner F and Sacristán S. 2020. Mutualistic Fungal Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Ct0861 Colonizes and Increases Growth and Yield of Maize and Tomato Plants. Agronomy, 10(10), 1493. Doi: [10.3390/agronomy10101493](https://doi.org/10.3390/agronomy10101493)
- Douanla-Meli C, Langer E and Mouafo FT. 2013. Fungal endophyte diversity and community patterns in healthy and yellowing leaves of Citrus limón. Fungal Ecology, 6(3), 212-222. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.01.004>
- Ek-Ramos MJ. 2020. Endófitos microbianos para el control de plagas y enfermedades agrícolas en Arredondo, B.H.C. (Ed), Tamayo, M.F. (Ed), Rodríguez, del B.L.A. (Ed). *Fundamento y práctica del control biológico de plagas y enfermedades*. (1ra ed., pp.373-405). Editorial del Colegio de Postgraduados.
- Ek-Ramos MJ, Zhou W, Valencia CU, Antwi JB, Kalns LL, Morgan GD, Kerns DL and Sword GA. 2013. Spatial and Temporal Variation in Fungal Endophyte Communities Isolated from Cultivated Cotton (*Gossypium hirsutum*). PLoS ONE, 8(6), e66049. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066049>.
- El-Bialy HA and El-Bastawisy HS. 2020. Elicitors stimulate paclitaxel production by endophytic fungi isolated from ecologically altered *Taxus baccata*. Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 13(1), 79-87. <https://doi.org/10.1080/16878507.2019.1702244>
- Fernandes RdC, Evans HC and Barreto RW. 2009. Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. Tropical Plant Pathology, 34(2), 108-113. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762009000200005>
- Fontana DC, de Paula S, Torres AG, de Souza VHM, Pascholati SF, Schmidt D and Neto DD. 2021. Endophytic Fungi: Biological Control and Induced Resistance to Phytopathogens and Abiotic Stresses. Pathogens, 10(5), 570. Doi: [10.3390/pathogens10050570](https://doi.org/10.3390/pathogens10050570)
- Fraire VG. 1982. Coffee Rust in Mexico. Plant Disease, 67(4)450. DOI: 10.1094/PD-67-450
- Gamboa-Gaitan MA. 2006. Hongos endofitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. Acta Biol. Colombia, 11, 3-20. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=319028580001>
- Gangadevi V and Muthumary J. 2008. Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal

- plant, *Justicia gendarussa*. Mycologia Balcanica, 5, 1-4. doi.org/10.5281/zenodo.2548404
- Ghaffari MR, Mirzaei M, Ghabooli M, Khatabi B, Wu Y, Zabet-Moghaddam M, Mohammadi-Nejadf G, Haynes PA, Hajirezaei MR, Sepehri M and Salekdeh GH. 2019. Root endophytic fungus *Piriformospora indica* improves drought stress adaptation in barley by metabolic and proteomic reprogramming. Environmental and Experimental Botany, 157, 197–210. DOI: [10.1016/j.envexpbot.2018.10.002](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.10.002)
- Gichuru EK, Ithiru JM, Silva MC, Pereira AP and Varzea VMP. 2012. Additional physiological races of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) identified in Kenya. Tropical Plant Pathology, 37(6), 424-427. DOI: [10.1590/S1982-56762012000600008](https://doi.org/10.1590/S1982-56762012000600008)
- Goates BJ and Mercier J. 2009. Effect of biofumigation with volatiles from *Muscodor albus* on the viability of *Tilletia* spp. Teliospores. Canadian Journal Microbiology, 55(2), 203-6. DOI: [10.1139/w08-104](https://doi.org/10.1139/w08-104)
- Hernández- Martínez G y Velázquez-Premio T. 2016. Análisis integral sobre la roya del café y su control. Revista internacional de desarrollo regional sustentable, 1(1), 92-99. <file:///C:/Users/sams/Downloads/12-63-1-PB.pdf>
- Hiruma K, Gerlach N, Sacristán S, Nakano RT, Hacquard S, Kracher B, Neumann U, Ramírez D, Bucher M, O'Connell RJ and Schulze-Lefert P. 2016. Root Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. Cell. 165(2), 464-474. Doi: [10.1016/j.cell.2016.02.028](https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.028).
- Kapeua-Ndacnou M, de Abreu LM, de Macedo DM, da Nóbrega TF, Pereira CM, Evans HC and Barreto RW. 2023. Assessing the Biocontrol Potential of *Clonostachys* Species Isolated as Endophytes from *Coffea* Species and as Mycoparasites of *Hemileia* Rusts of Coffee in Africa. Journal of Fungi, 9(2):248. Doi: [10.3390/jof9020248](https://doi.org/10.3390/jof9020248)
- Kasselaki AM, Shaw MW, Malathrakis NE and Haralabous J. 2006. Control of *Leveillula taurica* in Tomato by *Acremonium alternatum* is by Induction of Resistance, not Hyperparasitism. European Journal of plant Pathology. 115(2), 263-267. DOI: [10.1007/s10658-006-9010-y](https://doi.org/10.1007/s10658-006-9010-y)
- Kauppinen M, Saikkonen K, Helander M, Pirttilä AM and Wäli PR. 2016. *Epichloë* grass endophytes in sustainable agriculture. Nature Plants, 2, 15224. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.224>
- Kim H.-Y, Choi GJ, Lee HB, Lee S-W, Lim HK, Jang KS, Son SW, Lee SO, Cho KY, Sung ND and Kim J-C. 2007. Some Fungal Endophytes from Vegetable Crops and Their Anti-Oomycete Activities against Tomato Late Blight. Lett. Appl. Microbiol, 44(3), 332–337. Doi: [10.1111/j.1472-765X.2006.02093.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02093.x).
- Ku Y, Cheng S, Gerhardt A, Cheung M, Contador CA, Poon LW and Lam H. 2020. Secretory peptides as bullets: Effector peptides from pathogens against

- antimicrobial peptides from soybean. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (23), 9294. Doi: [10.3390/ijms21239294](https://doi.org/10.3390/ijms21239294)
- Latz MA, Jensen B, Collinge DB and Jørgensen HJ. 2018. Endophytic fungi as biocontrol agents: Elucidating mechanisms in disease suppression. *Plant Ecology and Diversity*, 11(5-6), 555–567. <https://doi.org/10.1080/17550874.2018.1534146>
- Lu L, Karunarathna SC, Hyde KD, Suwannarach N, Elgorban AM, Stephenson SL, Al-Rejaie S, Jayawardena RS and Tibpromma S. 2022. Endophytic Fungi Associated with Coffee Leaves in China Exhibited In Vitro Antagonism against Fungal and Bacterial Pathogens. *Journal of Fungi*, 8(7):698. DOI: [10.3390/jof8070698](https://doi.org/10.3390/jof8070698)
- Lugtenberg BJJ, Caradus JR and Johnson LJ. 2016. Fungal endophytes for sustainable crop production. *FEMS Microbiology Ecology*. 92(12), 194. Doi: [10.1093/femsec/fiw194](https://doi.org/10.1093/femsec/fiw194)
- Mamani-Huayhua G, Leon-Ttacca B, Palao-Iturregui LA y Borja-Loza YR. 2021. Biocontrol de la roya amarilla del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) con cepas de *Trichoderma* sp. Endófito. *Cultivos Tropicales*, 42(4) 13p. <https://www.redalyc.org/journal/1932/193270002001/html/>
- McCook S. 2006. Global rust belt: *Hemileia vastatrix* and the ecological integration of world coffee production since 1850. *Journal of Global History*, 1(02), 177-195. DOI: <https://doi.org/10.1017/S174002280600012X>
- McCook S. 2009. La Roya del café en Costa Rica: Epidemias, innovación y medio ambiente, 1950-1995. *Revista de Historia*, 59-60, 99-117. Recuperado de [file:///C:/Users/sams/Downloads/3471-Article%20Text-7591-1-10-20120124%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/sams/Downloads/3471-Article%20Text-7591-1-10-20120124%20(1).pdf)
- Mejía CL. 2015. Microbianas y control biológico como alternativa de manejo de la roya anaranjada del cafeto. *En Memorias del Seminario Científico Internacional. Manejo Agroecológico de la Roya*, pp.47. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i5137s.pdf>
- Mejía CL, Rojas IE, Maynard Z, Bael VS, Arnold EA, Hebbar P, Samuels JG, Robbins N and Herre AE. 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Teobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, 46(1), 4-14. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.012>
- Munasinghe V, Kumar NS, Jayasinghe L and Fujimoto Y. 2017. Indole-3-Acetic Acid Production by *Colletotrichum siamense*, An Endophytic Fungus from Piper nigrum Leaves. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 7(6), 475-479. DOI: [10.1080/22311866.2017.1408429](https://doi.org/10.1080/22311866.2017.1408429)
- Nadeem SM, Ahmad M, Zahir ZA, Javaid A and Ashraf M. 2014. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances*, 32(2), 429–448. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.005>

- Naik BS. 2020. Biosynthesis of silver nanoparticles from endophytic fungi and their role in plant disease management. *Microbial Endophytes*, 307-321. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819654-0.00012-0>
- Oliveira JA, Castro P y Collar J. 1996. El hongo endófito de raigrás inglés. *Agricultura*, 767, 483-485. Recuperado de https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_Agri%2FAgri_1996_767_483_485.pdf
- Oliveira RRV, Souza RG, Lima TEF and Cavalcanti MAQ. 2014. Endophytic fungal diversity in coffee leaves (*Coffea arabica*) cultivated using organic and conventional crop management systems. *Mycosphere*, 5(4), 523-530. Doi 10.5943/mycosphere/5/4/4.
- Pal KK and McSpadden GB. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor 2, 1117-1142. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.'
- Petrini O, Petrini LE and Rodrigues KF. 1995. Xylariaceous endophytes: an exercise in biodiversity. *Fitopatología Brasileira*, 20 (4), 531-539. Recuperado de <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BR9604862>
- Rabha AJ, Naglot A, Sharma GD, Gogoi HK Veer V. 2014. In Vitro Evaluation of Antagonism of Endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* Against Potent Fungal Pathogens of *Camellia sinensis*. *Indian Journal of Microbiology*, 54(3), 302-309. doi: [10.1007/s12088-014-0458-8](https://doi.org/10.1007/s12088-014-0458-8)
- Rodrigues KF. 1994. The Foliar Endophytes of the Amazonian *Palm Euterpe oleracea*. *Mycologia*, 86 (3), 376-385. <https://doi.org/10.2307/3760568>
- Rodríguez RJ, White JrJF, Arnold AE and Redman RS. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2), 314-330. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x
- Sánchez- Fernández RE, Sánchez-Ortiz BL, Sandoval-Espinosa YKM, Ulloa-Benítez A, Armendáriz-Guillen B, García-Méndez MC y Macías-Rubalcava ML. 2013. Hongos Endófitos: Fuente Potencial de Metabolitos Secundarios Bioactivos con utilidad en Agricultura y Medicina. *Revista Especializada en Ciencias Biológicas*, 16(2), 132-146. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72084-9)
- Santamaría J and Bayman P. 2005. Fungal Epiphytes and Endophytes of Coffee Leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology*, 50, (1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0002-1>
- Saucedo-García A, Anaya AL, Espinosa-García FJ and González MC. 2014. Diversity and communities of foliar endophytic fungi from different agroecosystems of *Coffea arabica* L. in two regions of Veracruz, Mexico. *PLoS One*, 9(6)84-54. Doi: 10.1371/journal.pone.0098454
- Schieber E and Zentmyer GA. 1984. Coffee rust in the Western Hemisphere. *Plant disease*, 68(2), 89-93. DOI: 10.1094 / PD-68-89

- Schulz B, Haas S, Junker C, Andrée N and Schobert M. 2015. Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. *Current Science*, 109(1), 39-45. <https://www.jstor.org/stable/24905689>
- Segaran G and Sathivelu M. 2019. Fungal endophytes: a potent biocontrol agent and a bioactive metabolites reservoir. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21,101284. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101284>
- Selosse M and Schardl C. 2007. Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission? An evolutionary perspective. *New Phytologist*, 173(3)452-458. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01978.x>
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2023. Recuperado de https://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/
- Silva HSA, Tozzi JPL, Terrasan CRF and Bettiol W. 2012. Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. *Biological control*, 63(1), 62-67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.06.005>
- Suebrasri T, Harada H, Jogloy S, Ekprasert J and Boonlue S. 2020. Auxin-producing fungal endophytes promote growth of sunchoke. *Rhizosphere*, 16,100271. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100271>
- USDA United States Department of Agriculture. 2022a.Coffee: World Markets and Trade. Recuperado de <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/coffee.pdf>
- USDA United States Department of Agriculture. 2022b. Report Name: Coffee Annual. Recuperado de <https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Coffee%20Annual%20Mexico%20City%20Mexico%20MX2022-0031.pdf>.
- Vega FE, Simpkins A, Aime MC, Posada F, Peterson SW, Rehner SA, Infante F, Castillo A and Arnold AE. 2010. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. *Fungal Ecology*, 3(3), 122-138 <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2009.07.002>
- Vieira WAS, Michereff SJ, de Moraes MA, Hyde KD and Camara MPS. 2014. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. *Fungal Diversity*, 67, 181–202. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0293-6>
- Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Hückelhoven R, Neumann C, Wettstein DV, Franken P and Kogel KH. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(38), 13386-13391. Doi: 10.1073/pnas.0504423102.
- Wang Z, Li CH and White J. 2019. Effects of *Epichloë* endophyte infection on growth, physiological properties and seed germination of wild barley under

saline conditions. Journal of Agronomy and Crop Science, 206(1), 43-51.
<https://doi.org/10.1111/jac.12366>

- Waqas M, Khan AL, Kamran M, Hamayun M, Kang S-M, Kim Y-H and Lee I-J. 2012. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. Molecules, 17(9), 10754-10773. DOI: [10.3390/molecules170910754](https://doi.org/10.3390/molecules170910754)
- Zhao X, Hu Z, Hou D, Xu H and Song P. 2020. Biodiversity and Antifungal Potential of Endophytic Fungi from the Medicinal Plant *Cornus officinalis*. Symbiosis, 8(3), 223-233. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13199-020-00696-7>
- Zheng H, Yu Z, Jiang X, Fang L and Qiao M. 2022. Endophytic Colletotrichum Species from Aquatic Plants in Southwest China. Journal of fungi, 8(1), 87. <https://doi.org/10.3390/jof8010087>

3. CAPITULO II. RESPUESTA PATOGENICA DE CEPAS ENDÓFITAS DE *Colletotrichum* spp. AISLADAS DE CAFETOS SOBRE FRUTOS DE MANGO

Pathogenic response of endophytic strains of *Colletotrichum* spp. Coffee plants isolated on mango fruits

3.1. Resumen:

Los hongos endófitos son microorganismos que viven dentro del tejido vegetal sin afectar a su hospedero. En este estudio se obtuvieron 117 aislamientos de hongos endófitos de plantas de café; el género con mayor predominancia fue *Colletotrichum* con 67 aislamientos. Dentro de este género existen diferentes especies reportadas como fitopatógenos, por ello se evaluó su potencial patológico frutos de mango Ataulfo. Con base en sus características de morfología de colonia, se agruparon mediante un análisis de conglomeración jerárquica obteniéndose 13 grupos, se seleccionó un aislamiento por cada grupo. De cada uno de los aislamientos, se tomaron discos de crecimiento micelial (0.5 cm de diámetro) y se inocularon sobre la superficie de los frutos de mango; se utilizaron cuatro repeticiones por tratamiento. Como testigo negativo se utilizaron discos de Agua-Agar (0.5 cm de diámetro) y como control positivo se utilizaron discos de la cepa 6504 (*Colletotrichum gloeosporioides*), identificada y reportada como patógeno en el fruto de mango. El estudio se realizó bajo un diseño experimental completamente al azar y los datos se analizaron mediante el Modelo Lineal con distribución Poisson y función de enlace logarítmico, se compararon las medias ajustadas con el método de Tukey al 5% de significancia. Los aislamientos end11, end43, end01, end85 y end21 no mostraron patogenicidad en los frutos de mango inoculados; de ellos, end11, end01 y end21 son señaladas por mostrar antagonismo a *H. vastatrix* en un estudio previo.

Palabras clave: cepas, conglomeración, patogenicidad, aislamiento, antagonismo

3.2. Abstract

Endophytic fungi are microorganisms that live within plant tissue without affecting their host. In this study, 117 isolates of endophytic fungi from coffee plants were obtained. The genus with the greatest predominance was *Colletotrichum* with 67 isolates. Within this genus there are different species reported as phytopathogenic, for this reason the pathogenic potential of Ataulfo mango fruits was evaluated. Based on their colony morphology characteristics, they were grouped by means of a hierarchical conglomeration analysis, obtaining 13 groups. One isolate was selected for each group. Mycelial growth discs (0.5 cm in diameter) were taken from each of the isolates and inoculated on the surface of the mango fruits. Four replicates per treatment were used. Agua-Agar discs (0.5 cm in diameter) were used as a negative control and strain 6504 (*Colletotrichum gloeosporioides*) discs, identified and reported as a pathogen in mango fruit, were used as a positive control. The study was carried out under a completely

randomized experimental design and the data was analyzed using the Linear Model with Poisson distribution and logarithmic link function. The adjusted means were compared with Tukey's method at 5% significance. The end11, end43, end01, end85 and end21 isolates did not show pathogenicity in the inoculated mango fruits; of them, end11, end01 and end21 are reported to show antagonism to *H. vastatrix* in a previous study.

Keywords: strains, endophytes, pathogenicity, isolation, antagonism.

3.3. Introducción

El cafeto es uno de los cultivos importantes en México ya que 511,000 productores y sus familias dependen económicamente de la cosecha del café (SADER, 2023). Una de las enfermedades importantes de este cultivo es la roya anaranjada, causada por el hongo (*Hemileia vastatrix*) que provoca la caída de las hojas y disminuye la producción de granos (Avelino y Rivas, 2013). Para controlar la enfermedad se emplean prácticas culturales, uso de variedades resistentes y uso de los productos fungicidas (Arneson, 2000); sin embargo se necesitan métodos eficientes y amigables con el medio ambiente como el control biológico, el cual implica el uso de organismos, como los hongos endófitos (Mejía, 2015).

Los hongos endófitos son parte de la comunidad microbiana que se encuentran internamente asociados a tejidos sanos de las plantas (Carroll, 1995). Existen reportes de su presencia en zonas templadas y tropicales, siendo esta última zona de menor exploración y con ello mayor probabilidad de encontrar mayor diversidad de estos microorganismos en el mundo (Arnold *et al.*, 2000).

Se ha reportado que los organismos endófitos muestran interacciones simbióticas con la planta huésped, como protección ante plagas y enfermedades (Abello y Kelemu, 2006), tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios, promueven el crecimiento de las plantas y reducen el efecto de hongos Fitopatógenos (Waller *et al.*, 2005) por lo que pueden ser importantes agentes de control biológico.

En el cultivo de café, se han aislado diversos hongos endófitos (Vega *et al.*, 2010; Santamaría y Bayman, 2005 y Lu *et al.*, 2022), dentro de los cuales el género *Colletotrichum* es el más común (Araujo *et al.*, 2001). Al género *Colletotrichum* se le reconoce principalmente como Fitopatógeno, causal de la antracnosis que afecta a diferentes cultivos tropicales y también se ha encontrado en hongos saprofitos (Cao *et al.*, 2019).

Aunque la colonización endófitas pudiera considerarse una importante ruta para el desarrollo de enfermedades, algunas especies endófitas de *Colletotrichum* se han encontrado con otro estilo de vida, en el cual el microorganismo está activo dentro del tejido vegetal y establece una interacción simbiótica sin causarle daño aparente y sin que haya una expresión de síntomas (Hyde y Soyong, 2008). Los hongos endófitos del género *Colletotrichum* se reportan como mejoradores en el rendimiento de las plantas (Díaz-González *et al.*, 2020), inhibidores mitóticos (Gangadevi y Muthumary, 2008) y como biocontroladores (Casas *et al.*, 2021).

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad patogénica de aislamientos endófitos de *Colletotrichum* spp., obtenidos de hojas de café y probados en frutos de mango variedad Ataulfo.

3.4. Materiales y Métodos

3.4.1. Sitio de estudio y muestreo

En los meses de enero- junio del año 2022, se obtuvieron 117 aislamientos de hongos endófitos a partir de hojas de café, las colectas se realizaron en tres sitios altitudinales (1625, 1400, 590 msnm) de la región Soconusco, Chiapas, México. Las muestras se procesaron en el laboratorio de Fitopatología del Campo Experimental Rosario Izapa perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) con sede en Tuxtla Chico, Chiapas.

3.4.2. Aislamiento e identificación

Los aislamientos obtenidos de las hojas de café se identificaron mediante las características macroscópicas que presentaron las colonias (color del micelio, textura, color de la colonia, por enfrente y por el reverso de la placa) y por

características microscópicas de estructuras vegetativas y reproductivas; se utilizaron claves taxonómicas (Ellis, 1976; Barnett y Hunter, 1998 y Ellis *et al.*, 2007) para su identificación.

3.4.3. Selección de cepas de *Colletotrichum* spp

La selección de cepas de *Colletotrichum* a utilizar en el presente estudio, se realizó por medio de un conglomerado jerárquico en el software estadístico InfoStat, 2022, en donde se consideraron valores cualitativos: color del frente (CF), reverso (CR) y centro de la placa (CC), Textura del micelio (T), masa conidial (MC), esporulación conidial (EC) y Bordes de la colonia (B).

3.4.4. Pruebas de patogenicidad de cepas de *Colletotrichum* spp

Para realizar las pruebas de patogenicidad de las cepas de *Colletotrichum* spp. se adaptó la metodología descrita por Nieto-Ángel *et al.* (2019). Todos los frutos mostraron inicios de cambio de coloración verde-amarillo, que corresponde a la escala 801 de la BBCH (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemische Industrie) (Rajan *et al.*, 2011), al momento de ser cosechados. Los frutos se llevaron a laboratorio donde se lavaron con solución jabonosa, después se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio 1.5% por 2 minutos y posterior triple lavado en agua esterilizada durante 1 minuto por cada ocasión (Pinzón *et al.* 2013).

Los frutos se colocaron sobre sanitas esterilizadas y se dejaron secar a temperatura ambiente. Sobre la parte media distal de la cascara de cada fruto se realizaron cuatro heridas (0.5 mm de profundidad, dos en cada extremo) con el uso de una aguja esterilizada y sobre cada una de ellas se colocó un disco (0.5 cm de diámetro) de crecimiento micelial de una de las cepas de *Colletotrichum* spp. Como testigo negativo se utilizaron discos de agua-agar y como testigo positivo se utilizaron discos de crecimiento micelial de la cepa 6504 de *Colletotrichum* spp., previamente evaluada como patógena en frutos de mango. Cada cepa inoculada correspondió a un tratamiento y se consideraron cuatro repeticiones; el experimento se repitió dos veces y se evaluó mediante un diseño completamente al azar. Los frutos inoculados se colocaron en charolas plásticas

aconditionadas con sanitas húmedas esterilizadas. Los frutos se incubaron a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) con periodos de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, por un periodo de 10 días. La patogenicidad de los aislamientos se determinó a través de la evaluación diaria del crecimiento radial de las lesiones en las zonas inoculadas.

3.4.5. Análisis estadístico

La severidad de las cepas endófitas se analizó mediante el Modelo Lineal Generalizado, previo ajuste a una distribución exponencial; se utilizó como función de distribución la Poisson estándar y como función de enlace logarítmico (Link=Log), posteriormente se realizó la comparación de las medias ajustadas por mínimos cuadrados (LSMeans, Tukey, $\alpha=0.05$), con el uso del programa SAS versión 9.4 (SAS, 2022).

3.5. Resultados y Discusión

3.5.1. Aislamiento e identificación

De un total de 600 incubaciones de tejidos realizados, se observaron 431 tejidos con crecimiento miceliar, de las cuales se obtuvieron 117 aislamientos y de estas 67 cepas correspondieron al género *Colletotrichum* spp., el cual fue el género con mayor predominancia. Resultados similares fueron reportados por Santamaría y Bayman (2005), Vega *et al.* (2010), Oliveira *et al.* (2014), Bongiorno *et al.* (2016), quienes señalan a *Colletotrichum* como un hongo frecuentemente aislado como endófito en plantas de café. Este género también se ha reportado de manera frecuente como endófito en plantas de *Acaí palm* (Peters *et al.*, 2020) y *Phaseolus vulgaris* (Gonzaga *et al.*, 2014).

3.5.2. Selección de cepas de *Colletotrichum* spp.

En el análisis de conglomerado jerárquico se obtuvieron 13 agrupamientos y de cada uno de ellos se seleccionó un aislamiento, las cuales fueron la end93, end106, end111, end79, end77, end72, end89, end21, end116, end43, end11, end85 y end01 (Figura 1).

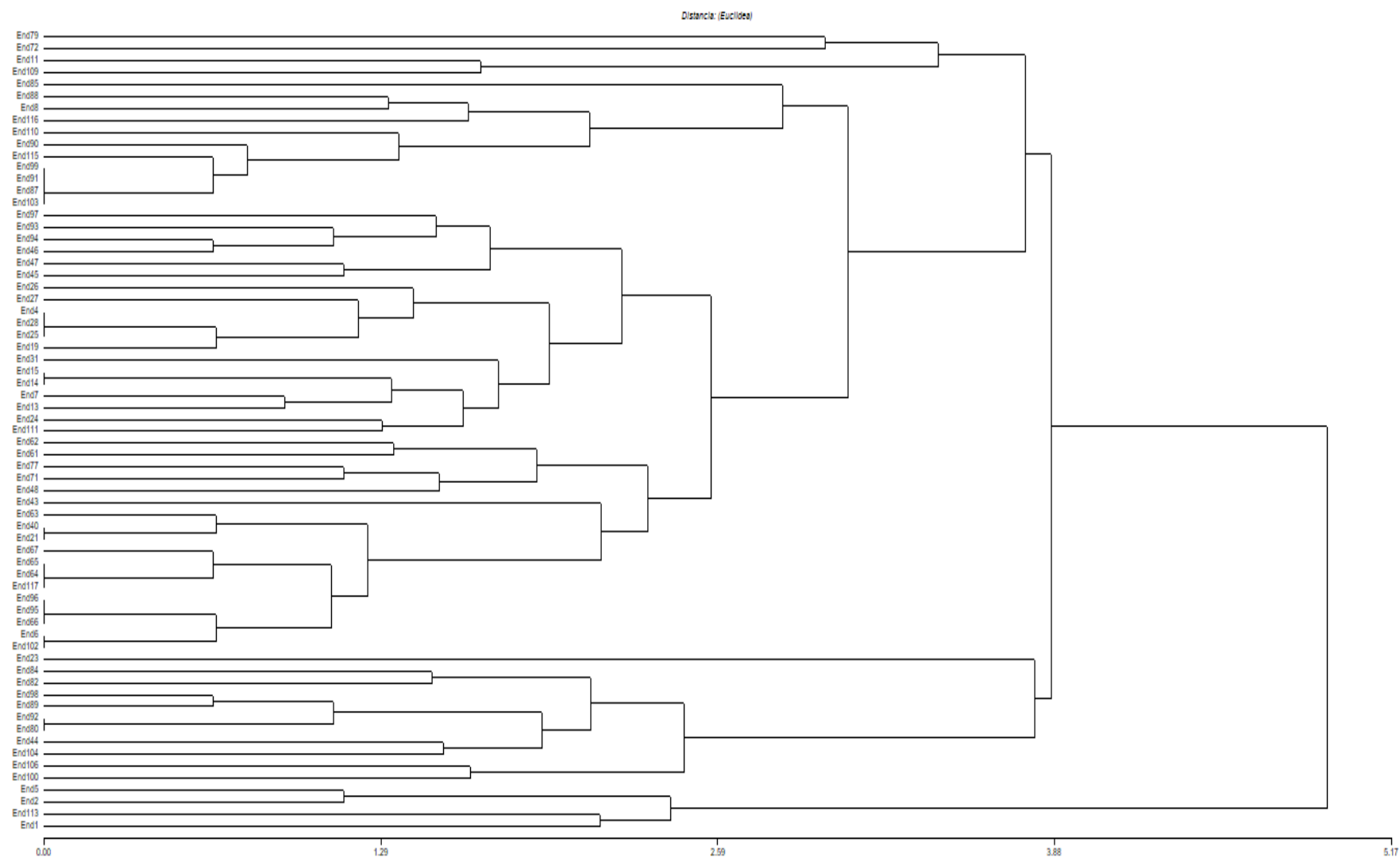


Figura 1. Análisis de conglomeración jerárquica, formando 13 agrupamientos de 67 cepas endófitas de *Colletotrichum* spp. End (endófito)

3.5.3. Pruebas de patogenicidad de cepas de *Colletotrichum* spp., sobre frutos de mango Ataulfo

El desarrollo de las lesiones o manchas fue visible después de las 72 h del proceso de inoculación de los frutos; las lesiones fueron de color café oscuro, con bordes más o menos circulares y ligeramente hundidos. Durante el primer experimento, los tratamientos que generaron los mayores diámetros de lesión correspondieron al Control positivo y las cepas end93, end106 y end111, mientras que los tratamientos con menor tamaño de lesión generada fueron el testigo negativo y la end11, end85 y end01 (Cuadro 1). En el segundo experimento los tratamientos que generaron mayor tamaño de lesión fueron end72, end89, end116 y el Testigo positivo; los tratamientos que mostraron el menor tamaño de lesión fueron la end85, end21, end01, end43, end11 y el Testigo negativo (Cuadro 2). La variabilidad de respuesta de los aislamientos endófitos de *Colletotrichum* observados en el presente estudio es similar a lo reportado por Zheng *et al.* (2022), quienes señalan respuestas de infección de 30-70% en aislamientos endófitos de *Colletotrichum* obtenidos de plantas acuáticas y evaluados en frutos de tomate, fresa, uva, mandarina y arándano; de igual manera Azuddin *et al.* (2022) y Azuddin *et al.* (2023) reportaron diferente capacidad de respuesta patogénica de aislamientos endófitos de *Colletotrichum* al ser inoculados en hojas de mango (Azuddin *et al.* 2022) y frutos de chile y tomate (Azuddin *et al.*, 2023). Savatin *et al.* (2014) mencionan que las heridas aceleran la entrada de los aislamientos endófitos en el huésped, lo que demuestra en este estudio el crecimiento acelerado de algunas cepas endófitas sobre el fruto de mango. Sin embargo, existen también reportes de aislamientos endófitos de *Colletotrichum* obtenidos de *Eupatorium triplinerve* y que no manifestaron síntomas después del proceso de inoculación en hojas de albahaca, mango, ayapana, chile, tomate y caña de azúcar (Mukherjee *et al.*, 2022). En el presente estudio los aislamientos end11, end43, end01 y end85 mostraron el menor desarrollo de lesiones en los puntos de inoculación de los frutos de mango en los dos experimentos, este comportamiento podría mostrar la naturaleza no patógena del hongo endófito.

Cuadro 1. Respuesta patogénica de aislados endofíticos de *Colletotrichum* spp. en frutos de mango.

Experimento 1 (diámetro de lesión en mm)									
Endófito	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9
End93	1.12	1.55	1.7	2.55	6.52	14.5	21.27	32.25	38.75 a*
End106	1.1	1.45	1.8	4.57	8	17	21.52	29.52	34.27 ab
End111	1.15	1.27	1.47	4.52	6.9	12	18.52	27.25	34.25 ab
T(+)	1.12	1.12	1.45	7.85	11.5	18	22.52	28.87	33.02 ab
End79	0.87	1.02	1.12	1.6	3.02	3.55	10.75	18.12	22.75 bc
End77	0.95	1.2	1.4	1.77	4.27	7.77	14.25	17.52	21.37 bc
End72	1.17	1.3	1.35	1.47	2.32	5.5	8.77	13.62	17.12 cd
End89	1.02	1.05	1.17	1.45	1.65	4.02	5.27	8.77	10.75 de
End21	0.85	1.05	1.12	1.25	1.3	3.55	5.07	7.55	9.82 de
End116	1	1.2	1.45	1.6	1.65	2.27	5.05	7.65	9.15 de
End43	0.95	1.22	1.27	1.27	1.52	5.82	5.82	5.82	5.82 ef
End11	0.92	0.92	0.95	1.15	1.2	1.87	2.17	2.2	2.2 f
End85	1.05	1.1	1.25	1.57	1.57	2	2.02	2.02	2.02 f
End01	0.95	1.07	1.07	1.15	1.2	1.77	1.8	1.8	1.8 f
T (-)	0.95	0.95	0.95	0.95	0.97	0.97	1.25	1.25	1.25 f

^z Comparaciones de medias ajustadas por mínimos cuadrados entre los hongos endófitos.

* Valores de medias ajustadas con la misma letra no fueron estadísticamente diferentes, método de Tukey (*= $p \leq 0.05$). T (-) Testigo negativo (Agua-Agar) T (+) Testigo positivo (cepa 6504).

Cuadro 2. Respuesta patogénica de aislados endofíticos de *Colletotrichum* spp. en frutos de mango

Experimento 1 (diámetro de lesión en mm)										
Endófito	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
End72	0.82	1.2	3.22	5.07	10.22	16.22	23.97	29.97	35.75	42.25 a*
End89	0.95	1.45	2	4.07	8.77	11.52	16.27	21.5	31.25	41.25 a
End116	0.87	0.92	1.17	1.72	3	7.45	12.72	18.72	24.47	31.25 ab
Tpos	0.82	0.9	1.2	3.22	7.72	10.75	14	17.02	19	21 bc
End93	0.77	0.9	0.95	1.2	2.27	3.3	4.55	12.57	14.3	17.82 c
End111	0.65	0.77	0.85	0.85	1.15	3.82	6.7	8.45	8.72	12.22 cd
End106	0.6	0.72	0.75	0.95	2.42	4.92	6.92	8.42	9.7	11.75 cd
End79	0.55	0.62	0.7	0.72	0.82	0.82	0.85	2.12	4	6.72 de
End77	0.82	0.85	0.87	0.92	1.3	1.37	1.65	2.65	3.65	4.65 de
End11	0.85	0.9	0.95	0.95	1.87	2.25	2.47	3	3	3.5 e
End43	0.75	0.97	1	1.37	1.37	1.62	1.9	2.25	2.5	2.87 e
End01	0.9	0.92	0.95	0.95	0.95	1.77	1.8	1.85	2.57	2.82 e
End21	0.9	0.97	0.97	1.35	1.35	1.5	1.5	1.5	1.52	1.52 e
End85	0.75	0.75	0.8	0.8	0.85	0.9	0.9	0.92	0.95	1 e
Tneg	0.82	0.9	1.2	3.22	7.72	10.75	14	17.02	19	21 e

^zComparaciones de medias ajustadas por mínimos cuadrados entre los hongos endófitos.

^{*}Valores de medias ajustadas con la misma letra no fueron estadísticamente diferentes, método de Tukey (*= $p \leq 0.05$). T (-) Testigo negativo (Agua-Agar) T (+) Testigo positivo (cepa 6504).

El género *Colletotrichum* spp., puede tener una vida endófito en el cual no se visualizan síntomas de enfermedad; sin embargo, pueden llegar a manifestarse de manera patógena y también de manera saprófita (Vieira *et al.*, 2014). Un ejemplo de esto es *Colletotrichum gloeosporioides* una especie reportada como patógena pero que se han aislado de manera saprófita en limón y papaya, también se han aislado de manera endófito en varias plantas (Gautam, 2014). En su comportamiento endofítico, *Colletotrichum* spp., compete por espacio y nutrientes, además de presentar un rápido crecimiento, por lo cual se infiere que

por esta razón se encuentra más fácilmente y con mayor abundancia dentro de los tejidos de las plantas (Peters *et al.*, 2020).

En el presente estudio, de las 13 cepas endófitas de *Colletotrichum* spp., que fueron evaluadas, nueve cepas tuvieron valores altos de patogenicidad y variaron de 4 mm a 42 mm y cinco (end11, end43, end01, end85 y end21) mostraron la lesión de menor tamaño, asociada solo a daño físico causado por la herida.

Con base en los resultados, se deduce que existe un gran potencial del inóculo oculto y algunas cepas pueden llegar a convertirse en fitopatógenos, esto se puede deber a cambios en la fenología de la planta o en el ambiente (Quintero-Mercado *et al.*, 2019). Para el caso de las cepas que mostraron nulo o reducido efecto fitopatógeno, se considera necesario realizar nuevas pruebas de patogenicidad en hospederos adicionales y en las hojas del hospedero original, además de realizar estudios de antagonismo y de capacidad de producción de compuestos secundarios que permitan entender su comportamiento y con ello su posible uso como agentes de control biológico.

3.6. Conclusión

Los aislamientos de *Colletotrichum* evaluados mostraron diferente grado de agresividad en los frutos de mango inoculados; los aislamientos no patogénicos (end11, end43, end01, end85 y end21) se pueden utilizar en estudios posteriores de pruebas de antagonismo y podrían seleccionarse para programas de control biológico.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada durante mi estudio de Maestría en Ciencias Protección Vegetal.

3.7. Literatura citada

Abello JF y Kelemu S. 2006. Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología agropecuaria, 7: 55-57. <https://www.redalyc.org/pdf/4499/449945021006.pdf> (consulta, enero, 2023)

- Araújo WL, Maccheroni WJr, Aguilar-Vildoso CI, Barroso PA, Saridakis HO and Azevedo JL. 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal Microbiology*. 47(3), 229–236. DOI: [10.1139/w00-146](https://doi.org/10.1139/w00-146)
- Arneson PA. 2000. Coffee rust. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0718-02. Updated 2011.
- Arnold AE, Maynard Z, Gilbert GS, Coley PD and Kursar, T.A. 2000. “Are tropical fungal endophytes hiperdiverse?” *Ecology Letters*, 3 (4) 267-274. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2000.00159.x>
- Avelino J y Rivas G. 2013. La roya anaranjada del cafeto. Versión electrónica, 6-13. <http://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01071036> (consulta, marzo, 2023).
- Azuddin NF, Mohamad Noor Azmy MS and Zakaria, L. 2023. Molecular identification of endophytic fungi in lawn grass (*Axonopus compressus*) and their pathogenic ability. *Scientific Reports*. 13, 4239. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31291-7>
- Azuddin NF, Mohd MH, Rosely NFN, Mansor A, Zakaria L. 2022. Evaluation of the pathogenicity of endophytic fungi isolated from spines of rattan (*Calamus castaneus*) against other plant hosts. *Journal of Applied Microbiology*. 133 (5), 3228-3238. Doi: 10.1111/jam.15777
- Barnett HL and Hunter BB. 1998. Ilustred genera of imperfect fungi. Fourth edition. St. Paul, Minnesota. USA. APS PRESS.218
- Bongiorno VA, Rhoden SA, García A, Polonio JC, Azevedo JL, Pereira JO, Pamphile JA. 2016. Genetic diversity of endophytic fungi from *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 in organic crops. *Ann Microbiol*. 66, 855-865. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1168-0>.
- Cao XR, Xu XM, Che HY, West JS and Luo DQ. 2019. Characteristics and distribution of *Colletotrichum* species in coffee plantations in Hainan, China. *Plant Pathology*. 68 (6), 1146-1156. <https://doi.org/10.1111/ppa.13028>
- Carroll G. 1995. Forest endophytes: pattern and process. *Canadian Journal of Botany*. 73(1), 1316-1324. <https://doi.org/10.1139/b95-393>
- Casas LL, Pereira JO, Costa-Neto PQ, Silva JF, Almeida LN, Bianco RA and Azebedo JL. 2021. Endophytic *Colletotrichum siamense* for biocontrol and resistance induction in guarana seedlings. *International Journal of Microbiology*. (4), 1-8. Doi.org/10.1155/2021/1925226
- Díaz-González S, Marín P, Sánchez R, Arribas C, Kruse J, González-Melendi P, Brunner F and Sacristán S. 2020. Mutualistic fungal endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Ct0861 colonizes and increases growth and yield of maize and tomato plants. *Agronomy*. 10(10), 1493. Doi: [10.3390/agronomy10101493](https://doi.org/10.3390/agronomy10101493)

- Ellis D, Davis S, Alexiou H, Handke R, Bartley R. 2007. Descriptions of medical fungi. 2nd ed. Adelaide: Nexus Print Solutions. Disponible en: https://www.academia.edu/27582963/DESCRIPTIONS_OF_MEDICAL_FUNGI_SECOND_EDITION (consultado en enero, 2023)
- Ellis MB. 1976. More dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 507p.
- Gangadevi V and Muthumary J. 2008. Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*. Mycologia Balcanica. 5, 1-4. Doi.org/10.5281/zenodo.2548404
- Gautam AK. 2014. *Colletotrichum gloeosporioides*: biology, pathogenicity and management in India. Journal Plant Physiol Pathol. 2(2), DOI: [10.4172/2329-955X.1000125](https://doi.org/10.4172/2329-955X.1000125)
- Gonzaga LL, Costa LEO, Santos T.T, Araujo EF and Queiroz MV. 2014. Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. Journal of Applied Microbiology. 118(2), 485-496. doi:10.1111/jam.12696
- Hyde K and Soyong K. 2008. The fungal endophyte dilemma. Fungal Diversity. 33.163-173. <https://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/33-9.pdf>
- Lu L, Karunarathna SC, Hyde KD, Suwannarach N, Elgorban AM, Stephenson SL, Al-Rejaie S, Jayawardena RS and Tibpromma S. 2022. Endophytic fungi associated with coffee leaves in China exhibited *In Vitro* antagonism against fungal and bacterial pathogens. Journal of Fungi. 8(7):698. DOI: [10.3390/jof8070698](https://doi.org/10.3390/jof8070698)
- Mejía CL. 2015. Microbianas y control biológico como alternativa de manejo de la roya anaranjada del cafeto. En Memorias del Seminario Científico Internacional. Manejo Agroecológico de la Roya. pp.47 disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i5137s.pdf> (consultado el 19 de agosto del 2021).
- Mukherjee D, Pramanik K, Mandal S and Mandal NC. 2022. Augmented growth of Cd-stressed rice seedlings with the application of phyto stimulating, root-colonizing, Cd-tolerant, leaf-endophytic fungi *Colletotrichum* spp. isolated from *Eupatorium triplinerve*. J Hazard Mater. 438(5), 129508. DOI: [10.1016/j.jhazmat.2022.129508](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129508)
- Nieto-Ángel D, Almaraz-Sánchez A, Ayala-Escobar V, Orozco-Santos M and Lara-Viveros FM. 2019. Primer reporte de *Colletotrichum coccodes* en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) en México. Revista Fitotecnia Mexicana. 42 (3), 195-200. <https://doi.org/10.35196/rfm.2019.3.195>
- Oliveira RJV, Souza RG, Lima TEF and Cavalcanti MAQ. 2014. Endophytic fungal diversity in coffee leaves (*Coffea arabica*) cultivated using organic and conventional crop management systems. Mycosphere. 5(4):523–530.7 <https://doi.org/10.1111/jam.15777>

- Peters LP, Prado LS, Silva FIN, Souza FSC and Carvalho CM. 2020. Selection of endophytes as antagonists of *Colletotrichum gloeosporioides* in açai palm. Biological control. 150, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104350>
- Pinzón GYA, Lizette BS and Buitrago HG. 2013. Diagnóstico molecular diferencial de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* en ñame (*Dioscorea* sp). Revista Colombiana de Biotecnología. 15(1), 52-60. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v15n1/v15n1a6.pdf> (consultado en marzo, 2023).
- Quintero-Mercado A, Dangon-Bernier F and Páez-Redondo A. 2019. Aislamientos endófitos de *Colletotrichum* spp. A partir de hojas y ramas de mango (*Mangifera indica* L.) cultivar Azúcar en el municipio de Ciénaga, Magdalena, Colombia. Revista académica Colombiana. 43(166) ,65-77. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/racefn/v43n166/0370-3908-racefn-43-166-65.pdf> (consultado en febrero, 2023).
- Rajan S, Tiwari D, Singh VK, Saxena P, Singh S, Reddy YTN, Upreti KK, Burondkar MM, Bhagwan A and Kennedy R. 2011. Application of extended BBCH scale for phenological studies in mango (*Mangifera indica* L.). Journal of Applied Horticulture. 13 (2), 108-114. Disponible en: <http://horticultureresearch.net/pdf/Application%20of%20extended%20BBCH%20Scale%20for%20phenological.pdf> (consultado en enero, 2023)
- SADER, Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. 2023. Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/se-suma-mexico-a-acuerdo-internacional-que-fortalece-al-sector-cafetalero-prioritariamente-al-de-pequena-escala> (Consultado el 23-05-23)
- Santamaría J and Bayman P. 2005. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). Microbial Ecology 50, (1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0002-1>
- Savatin DV, Gramegna G, Modesti V and Cervone F. 2014. Wounding in the plant tissue: The defense of a dangerous passage. Front. Plant Sci. 5, 470. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00470>
- Vega FE, Simpkins A, Aime MC, Posada F, Peterson SW, Rehner SA, Infante F, Castillo A and Arnold AE. 2010. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. Fungal Ecology. 3(3), 122-138 <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2009.07.002>
- Vieira WAS, Michereff SJ, de Moraes MA, Hyde KD and Camara MPS. 2014. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. Fungal Diversity. 67, 181–202. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0293-6>
- Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Hückelhoven R, Neumann C, Wettstein DV, Franken P and Kogel KH. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to

salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. Proc Natl Acad Sci USA. 102(38), 13386-13391. Doi: 10.1073/pnas.0504423102.

Zheng H, Yu Z, Jiang X, Fang L and Qiao M. 2022. Endophytic *Colletotrichum* species from aquatic plants in southwest China. Journal of fungi.8 (1) ,87. <https://doi.org/10.3390/jof8010087>

4. CAPITULO III. HONGOS ENDÓFITOS DE CAFETOS PARA EL MANEJO DE *Hemileia vastatrix* DEL SOCONUSCO, CHIAPAS

Endophytic fungi of coffee plants for the management of *Hemileia vastatrix* from Soconusco, Chiapas

4.1. Resumen:

La roya del cafeto es causada por el hongo *Hemileia vastatrix* y para su manejo una de las estrategias es el uso de herramientas biológicas como los hongos endófitos. En este estudio se aislaron endófitos fúngicos del tejido foliar del cafeto en tres sitios altitudinales de la región del Soconusco, Chiapas, México. Con el objetivo de encontrar cepas con capacidad antagonista a *Hemileia vastatrix*, se obtuvieron 117 aislamientos fúngicos de los cuales se identificaron a los géneros *Xylaria*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Pestalotiopsis*, *Stachybotrys*, *Curvularia*, *Diaporthe*, *Daldinia* y *Colletotrichum*; las cepas que no desarrollaron estructuras reproductivas, se consideraron como *Mycelia sterilia*. *Colletotrichum* fue el género con mayor frecuencia (58.97%) de aislamiento. La mayor diversidad fúngica (44%) se obtuvo a los 1625 msnm (ejido Agua Caliente). En pruebas de antagonismo contra *H. vastatrix*, las cepas de *Daldinia* sp., (End06), *Diaphorte* sp., (End08) y *Colletotrichum* spp. (End01, End04, End11, End12, End21, End26, End72 y End93) mostraron eficacia biológica superior al 50%.

Palabras claves: endófitos, aislamientos, roya del cafeto, antagonismo, eficacia biológica

4.2. Abstract

Coffee leaf rust (CLR) is caused by the fungus *Hemileia vastatrix* and for its management one of the strategies is the use of biological tools such as endophytic fungi. In this study, fungal endophytes were isolated from coffee leaf tissue at three altitudinal sites in Soconusco region, Chiapas, Mexico. In order to find strains with antagonistic capacity to *Hemileia vastatrix*, 117 isolates were obtained, of which the genera *Xylaria*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Pestalotiopsis*, *Stachybotrys*, *Curvularia*, *Diaporthe*, *Daldinia* and *Colletotrichum* were identified. The strains that did not develop reproductive structures were considered as *Mycelia sterilia*. *Colletotrichum* was the genus with the highest frequency (58.97%) of isolation. The greatest fungal diversity (44%) was obtained at 1625 msnm (Agua Caliente common land). In antagonism tests against *H. vastatrix*, the strains of *Daldinia* sp., (End06), *Diaphorte* sp., (End08) and *Colletotrichum* spp. (End01, End04, End11, End12, End21, End26, End72 and End93) showed biological efficacy greater than 50%.

Keywords: endophytes, isolates, coffee leaf rust, antagonism, biological efficacy.

4.3. Introducción

El café es uno de los productos agrícolas más importantes a nivel mundial, se cultiva en 80 países y es la segunda bebida más vendida en el mundo, México representó el 2.1% de la producción mundial de café en 2022 y se posicionó en el lugar número diez con 3.84 millones de 60 kg (USDA, 2022). Los estados productores de café en México son: Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Puebla, Guerrero, Hidalgo, San Luis Potosí, Nayarit, Jalisco, Colima, México, Tabasco, Querétaro y Morelos, de ellos Chiapas ocupó el primer lugar con una producción de 378,933.64 toneladas que representó el 36.7% de la producción nacional (SIAP, 2023). La roya anaranjada, causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, es la principal enfermedad que afecta directamente al tejido foliar del cafeto y causa defoliación, baja su actividad fotosintética y por ende su producción (Mejía, 2015).

El manejo de la roya anaranjada se basa en diferentes actividades como: uso de variedades resistentes, prácticas culturales (podas, regulación de sombra, deshierbes, control de malezas) y uso de productos fungicidas a base de cobre como el oxiclورو de cobre y derivados de la familia de los triazoles (Avelino y Rivas, 2013); sin embargo, el uso desmedido de estos productos, tienen un impacto negativo en el ambiente y por consiguiente, la resistencia de los patógenos a los fungicidas (Mejía, 2015). Debido a lo anterior, se considera necesario el encontrar e implementar nuevas alternativas de manejo, que sean amigables con el medio ambiente. En los cafetos se encuentran una diversidad de organismos como los hongos endófitos, ya que los mismos se usan como controladores biológicos para actuar como antagonicos hacia patógenos y el uso de estos microorganismos contribuye a regular su impacto negativo. Los endófitos se encuentran en el interior de los tejidos de las plantas, son productores de metabolitos secundarios y ayudan a sus hospederos a tolerar condiciones bióticas y abióticas como las enfermedades, daños por insecto plaga, alta salinidad, altas temperaturas (Backman y Sikora, 2008; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013); también son mejoradores en el rendimiento de las plantas (Díaz-González *et al.*, 2020), actúan como inhibidor mitótico (Gangadevi y Muthumary, 2008) y como biocontroladores (Casas *et al.*, 2021). Se han

evaluado como inhibidores de la germinación del hongo *H. vastatrix*, que causa la roya anaranjada del cafeto (Mamani *et al.*, 2021).

En el género *Coffea* spp, se han identificado una amplia diversidad de hongos endófitos: Santamaría y Bayman (2005) reportaron aislamientos de *Botryosphaeria*, *Colletotrichum*, *Guignardia* y *Xylaria* en Puerto Rico, Vega *et al.* (2010) identificaron a *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium* y a hongos de la familia *Xylariaceae* en Hawái, México, Puerto Rico y Colombia; Bongiorno *et al.* (2016) identificaron *Colletotrichum*, *Trichoderma*, *Schizophyllum*, *Mycosphaerella*, *Cladosporium* y *Cercospora* en Brasil; sin embargo, son pocos los estudios realizados sobre los organismos biocontroladores de enfermedades, aunque existe un potencial de encontrar más enemigos naturales y en México no se han estudiado a los hongos endófitos como alternativa para el control biológico sobre el hongo *H. vastatrix*, sobre la base de estos antecedentes, se realizó el siguiente trabajo de investigación, en donde estudios previos determinaron especies endófitas con potenciales antagonistas, por lo cual el objetivo de esta investigación se centró en aislar hongos endófitos de las zonas cafetaleras de Chiapas y evaluar su potencial antagonista hacia el hongo *H. vastatrix*.

4.4. Materiales y Métodos

4.4.1. Localización del Estudio

El estudio se desarrolló en el municipio de Cacahoatán, Chiapas (15° 06' 45'' LN 92° 11' 05'' LO). Las muestras se colectaron de enero-marzo del 2022. Las plantaciones se ubicaron en un rango altitudinal que oscilaron desde 500 a 1600 metros sobre el nivel del mar (msnm).

4.4.2. Sitios de colecta

Las colectas se realizaron en tres sitios altitudinales en el Municipio de Cacahoatán, Chiapas y estos fueron: ejido Agua Caliente (1625 msnm), ejido Azteca (1400 msnm) y ejido Benito Juárez San Vicente (590 msnm). El estudio comprendió un periodo aproximado de un año.

4.4.3. Colecta de muestras

Por cada sitio de colecta, se eligieron dos parcelas de café arábigo (*Coffea arabica*) y/o café robusta (*C. canephora*): una del tipo rustico y otra del tipo policultivo tradicional. La primera se refiere a plantaciones de café que se cultivan bajo la sombra de árboles nativos sin usar productos químicos, y la segunda de plantaciones de café que combinan árboles de bosque y especies frutales introducidos que, incluye control de arvenses, podas, se puede presentar una fertilización por ciclo y no presentan control fitosanitario (Moguel y Toledo, 1999; Saucedo-García *et al.*, 2014; Manson *et al.*, 2008).

Al interior de cada parcela se seleccionaron escogieron 10 plantas asintomáticas por el método de muestreo en zigzag (INIFAP, 2012), de cada planta se tomaron 6 hojas (1-2 años de edad): 2 de las ramas primarias del tercio inferior, 2 del tercio medio y 2 del tercio superior (Arnold y Herre 2003; Saucedo-García *et al.*, 2014; Rubini *et al.*, 2005). Las muestras se trasladaron al laboratorio de Fitopatología del Instituto Nacional de investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), para su procesamiento.

4.4.4. Proceso de muestras

Las hojas se lavaron con agua-jabón y se secaron sobre sanitas esterilizadas; en campana de flujo laminar, de cada hoja se obtuvo un fragmento de 0.5 x 0.5 cm. Las fracciones de hoja se desinfestaron con hipoclorito de sodio al 0.5% durante 2 minutos, posterior paso en etanol al 70% por 2 minutos y triple lavado en agua destilada esterilizada (Arnold y Herre, 2003). Los tejidos se secaron sobre sanitas esterilizadas, se colocaron en placas Petri con medio Papa Dextrosa Agar (PDA) suplementadas con 50 ppm de tetraciclina y penicilina, y se incubaron durante 7 días a 22°C (Santamaría y Bayman, 2005; Rubini *et al.*, 2005).

4.4.5. Aislamiento e identificación morfológica

Las colonias fúngicas obtenidas de los tejidos incubados se transfirieron a PDA Para los aislamientos se utilizó el medio PDA y medio de avena (OAT) para inducir el desarrollo de estructuras reproductivas (Chen *et al.*, 2013). Los aislamientos se agruparon con base en las características fenotípicas de la

colonia (color del frente y reverso de la placa y aspecto). Para la identificación morfológica de los microorganismos se realizaron preparaciones temporales y elaboraron microcultivos (en agua-agar) de cada aislamiento, se observaron a microscopio, se tomaron fotografías y se identificaron con ayuda de las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998), Ellis (1976) y Ellis *et al.* (2007).

4.4.6. Evaluación *In vitro* de la capacidad antagonista de los

aislamientos de los hongos endófitos frente a *Hemileia vastatrix*

Se colectaron hojas de café arábigo con presencia de pústulas de roya anaranjada en el vivero del Campo Experimental Rosario Izapa del INIFAP. En laboratorio, las uredosporas de *H. vastatrix* se colectaron por medio del raspado de las pústulas de roya y se colocaron en microtubos (2 ml). Para evaluar la capacidad antagonista de los aislamientos endófitos, se adaptó la metodología de Shiomi *et al.* (2006); Larran *et al.* (2016). Para ello, se realizaron suspensiones (2.0×10^4 y 3.0×10^4) de uredosporas de *H. vastatrix* en agua destilada. Posteriormente, en un portaobjetos con cavidad cóncava se colocaron 120 μ L de la suspensión de uredosporas del hongo patógeno y 120 μ L de las esporas del hongo endófito; el portaobjeto se colocó dentro de una placa Petri con una sanita húmeda en el fondo y se incubó durante 24 h. Después del periodo de incubación, cada portaobjeto se observó con ayuda de un microscopio compuesto en el objetivo de 40X y de cada interacción o tratamiento se observaron 100 uredosporas, para determinar el porcentaje de esporas germinadas en cada tratamiento (Sanjuán *et al.*, 2017).

4.4.7. Efectividad de los hongos endófitos aislados frente a *Hemileia vastatrix*

El porcentaje de efectividad de los hongos endófitos para inhibir la germinación de las uredosporas de *H. vastatrix* se calculó acorde a la fórmula de Abbott (Abbott, 1925).

$$\text{Eficacia} = \left[1 - \left(\frac{N_t}{N'_t} \right) \right] * 100$$

Donde:

Nt=número de individuos en lote tratado, después de t días

$N \cdot t$ = número de individuos en lote testigo, después de t días

De acuerdo con la NOM-032-FITO-1995 modificada en agosto de 2015, en esta se especifica que para ser considerado un producto biológico la efectividad debe ser mayor o igual al 50%.

4.4.8. Identificación molecular

La extracción de ADN se realizó a partir del crecimiento de los hongos endófitos con efecto antagónico a *Hemileia vastatrix*. Las cepas se cultivaron en caldo nutritivo y se incubaron durante siete días posteriormente, la extracción de ADN se realizó con base en el método propuesto por Aljanabi y Martínez, 1997 modificado por López- Gómez, 2022 (comunicación personal), el cual consistió en tomar un tubo Eppendorf y se colocó 50 μ L del Buffer de extracción (0.4M de NaCl, 10mM de Tris-HCl pH 8.0 y 2mM de EDTA Ph 8.0) y junto con esto 100 mg de micelio del hongo endófito aislado, se procedió a macerar y homogeneizar por 30 s, posteriormente se le agregaron 350 μ L más del buffer de extracción y se procedió a mezclarlo con vortex por 30 s, se le adicionó 40 μ L de SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) al 20% y se homogeneizó por 10 s en vortex posteriormente, se procedió a incubar a 60°C por 45 min y se mezcló con vortex cada 5 min; después se le adicionaron 300 μ L de NaCl 5M, se homogeneizó 30 s en vortex, se centrifugó a 13000 rpm por 30 min a 10 °C, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, se le adicionaron 750 μ L de isopropanol frio y 75 μ L de acetato de sodio (3M pH 5.2), se mezcló por inversión suavemente posteriormente el tubo se incubó a -20°C por 30 min, y se centrifugó a 13000 rpm por 30 min a 4°C, se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 μ L de etanol al 70% por una ocasión y se centrifugó a 12000 rpm por 20 min a 4°C, se dejó que la pastilla se secara completamente, se disolvió la pastilla seca en 50 μ L de agua libre de nucleasas en baño maría a 45°C, hasta disolver las pastillas por espacio de 24 horas posteriormente, se visualizó el ADN por electroforesis en gel, para esto se preparó gel de agarosa al 1%, se tiño con 5 μ L del colorante Gel Green marca (PROMEGA FRANCE) y 10 μ L del ADN, se procedió a visualizarlo en el gel y se sometió a 90 volts por 40 minutos; pasado este tiempo se procedió a analizar el

gel en el fotodocumentador marca (DNR-MINIBIS-PRO) con ayuda de la aplicación (Gel capture).

4.4.9. Secuenciación directa del ITS

Una vez que se realizó la extracción de ADN, se procedió a realizar la amplificación molecular (PCR), para esto se utilizó el kit Taq Polimerasa marca (PROMEGA FRANCE) bajo las siguientes condiciones propuestas por Pinzón *et al.* (2013), GoTaq Flexi Buffer (1x), MgCl₂ (1.5 mM), dNTP (0.2 mM), iniciadores universales ITS1 e ITS4 (0.3 µM), 1 unidad de Taq Polimerasa, 50 ng/µL en concentración de ADN, agua grado PCR. Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, 35 ciclos de amplificación (desnaturalización por 1 minuto a 95°C, anillamiento por 30 s a 52.6°C y extensión por 1 min 30s a 72°C) y un ciclo de extensión final por 6 minutos a 72°C, la purificación se realizó con el protocolo Wizard® *Plus* SV Minipreps DNA Purification System (PROMEGA, USA) siguiendo las instrucciones indicadas por la empresa, y posteriormente se enviaron a Macrogen, Korea para realizar la secuenciación.

4.4.10. Alineación de secuencias y análisis filogenético

Las secuencias fueron editadas en Chromas y comparadas por alineamiento básico local (BLAST) en el banco de genes (GenBank) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) con otras disponibles. Para realizar el análisis filogenético se utilizó el software Mega 11, se insertaron las secuencias endófitas y se seleccionaron otras secuencias con los mismos genes tomadas del BLAST, y se alinearon con el algoritmo ClustalW, la matriz que se obtuvo se empleó para realizar el árbol filogenético basados en los algoritmos de Máxima verosimilitud (ML) (Tamura *et al.*, 2011) y mediante el método Bootstrap con 500 repeticiones.

4.4.11. Análisis estadístico

Se realizó el análisis de varianza a los datos del total de organismos endófitos aislados entre sitios y entre sistemas de cultivo con el paquete estadístico InfoStat versión 2022.

4.4.11.1. Diseño experimental

El diseño experimental fue en parcelas divididas, con parcelas grandes arregladas como bloques al azar; donde los tratamientos fueron los sitios de muestreo y los sistemas de cultivo y las repeticiones fueron el número de organismos endófitos que crecieron por tejido dentro de la placa, se realizó una comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey con un nivel de probabilidad de $p \leq 0.05$.

4.5. Resultados y Discusión

4.5.1. Aislamiento de hongos endófitos

A partir de los muestreos realizados en la región del Soconusco, Chiapas, México, se obtuvieron 117 aislamientos de hongos endófitos. La cantidad de aislamientos estuvo directamente relacionada con los sitios de muestreo, los cuales presentaron diferencias estadísticas significativas ($Tukey \leq 0.05$). En ese sentido el sitio III presentó 60 aislamientos, el sitio I presentó 39 aislamientos y el sitio II presentó 18 aislamientos (Cuadro 3). El sitio III fue donde se encontró la mayor cantidad de hongos endófitos aislados y corresponde a una zona trópico-húmedo. En la zona tropical se pueden encontrar mayor abundancia de hongos endófitos y aún no han sido estudiados a profundidad, diversos autores como Gamboa-Gaitán (2005); Vega *et al.* (2010); Arnold y Herre (2003), mencionan que en diferentes sitios de muestreo se pueden encontrar abundantes especies de hongos endófitos. No hubo diferencias significativas entre plantaciones por sistemas de cultivo, ya que tanto los sistemas de policultivo como el rustico en los tres sitios de muestreo fueron similares (Cuadro 3), los dos sistemas de cultivo difieren en sus prácticas agrícolas, pero ambos sistemas de manejo no afectan la abundancia de los hongos endófitos. Este estudio coincide con los estudios reportados por Saucedo-García *et al.* (2014) donde mencionan que no encontraron diferencias significativas entre diferentes sistemas de cultivo en el cafeto.

4.5.2. Diversidad de géneros aislados por sitios

La mayor diversidad de géneros aislados se presentó tanto en la zona templada (sitio I) como en la zona tropical (sitio III) en donde se presentaron índices del 44 y 38%, respectivamente; mientras que el sitio II, presentó una diversidad de géneros de endófitos del 18% (Cuadro 3), las diferencias entre la cantidad de géneros aislados entre sitios de muestreo, se pueden deber a condiciones ambientales como lo menciona Santamaría y Bayman (2005), una mayor cantidad de sitios de muestreos ayudarán a dilucidar los factores que influyen en la diversidad de géneros aislados, algunos factores que mencionan Saucedo-García *et al.* (2014) son la ubicación geográfica y los sistemas de cultivo.

Cuadro 3. Hongos endófitos por sitios de muestreo I, II y III

Sitios de muestreo	Aislamientos Medias	Diversidad de géneros aislados	Sistemas de cultivo	
III	6.59 a*	38 %	Rustico	3.89 a*
I	3.25 b	44%	Policultivo	3.88 a
II	1.82 c	18%		

^z *Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes. Prueba de Tukey, Alfa≤0.05
DMS=0.73219. DMS=0.49659

4.5.3. Identificación morfológica de los hongos

Acorde a la identificación de los aislamientos realizados en el cultivo de café en la región del Soconusco, Chiapas, México, los principales géneros fueron: *Colletotrichum* spp., *Xylaria* sp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* sp., con valores del 58.97%, 6.84%, 4.27% y 5.13% respectivamente, para *Pestalotiopsis* spp., *Stachybotrys* sp. y *Curvularia* sp. con 0.85% (Figura 2). En estudios similares a lo reportado por Santamaría y Bayman (2005); Vega *et al.* (2008) también se aislaron estos géneros como endófitos en plantas de café. Otros estudios reportados por Saucedo-García *et al.* (2014) en donde los géneros más comunes que se aislaron también en plantas de café fueron *Colletotrichum* y *Xylaria*, también en otra investigación que coincide con nuestros resultados, realizada por Arnold y Herre (2003) encontraron que el mayor porcentaje de hongos endófitos

aislados correspondieron al género *Colletotrichum* spp., otro estudio similar reportado por Kurose *et al.* (2012) reportaron aislamientos de hongos endófitos de las hojas de *Fallopia japónica* y fue *Colletotrichum* spp. quien obtuvo el promedio más alto entre los aislamientos, los organismos que no lograron desarrollar estructuras reproductivas correspondieron al 20.51% y se agruparon dentro de *Mycelia sterilia* similar a como los agrupó Kurose y colaboradores.

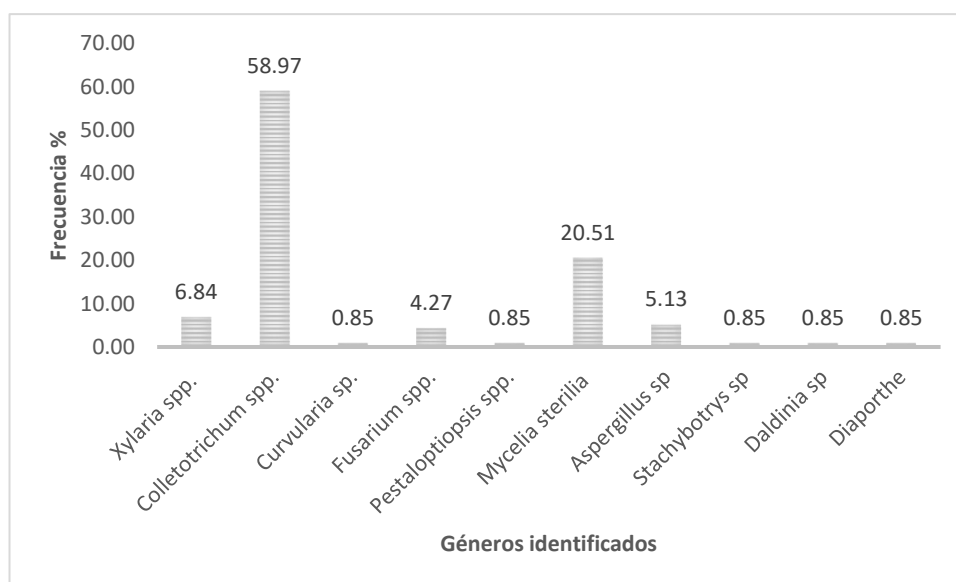


Figura 2. Principales géneros identificados morfológicamente

4.5.4. Evaluación *In vitro* de la capacidad antagonista de los aislamientos de los hongos endófitos frente a *Hemileia vastatrix*

Los hongos endófitos aislados que se consideraron como efectivos son los que se mantuvieron por arriba del 50%. En el sitio I, los hongos endófitos que resultaron efectivos fueron los denominados con la clave end21 (76.92%) y end26 (68.37%) (Figura 3), en la misma grafica se observa el sitio II en donde las cepas que resultaron efectivas fueron la end01 (78.30%), end12 (73.12%), end11 (63.89%), end04 (56.25%), end06 (55.86%) y end08 (52.61%), el mayor porcentaje lo obtuvo la end01 y el menor porcentaje corresponde a la end08, en el sitio III, las cepas que resultaron efectivas fueron la end93 (65.54%) y end72 (53.40%). Estas cepas resultaron efectivas, ya que al realizar las pruebas de

antagonismo frente a *Hemileia vastatrix* fueron menores la cantidad de uredosporas germinadas con respecto a su testigo, cabe destacar que estos organismos endófitos mencionados correspondieron al género *Colletotrichum* spp., *Daldinia* sp. y *Diaphorte* sp. Los resultados obtenidos coinciden con lo realizado en Costa Rica por Escudero *et al.* (2023) en donde realizaron aislamientos de hongos endófitos en plantas de café, entre las especies identificadas se encontró a *Daldinia eschscholzii*, esta especie se tomó en cuenta para pruebas de antagonismo *in vitro* contra el hongo *Mycena citricolor*. En otro estudio similar a lo reportado por Lu *et al.* (2022) en donde se realizaron aislamientos de hongos endófitos a partir de tejido foliar de café e identificaron a *Daldinia* sp. y *Diaphorte* sp. estas especies mostraron fuerte actividad antagónica contra los patógenos (*Alternaria alternata*, *Penicillium digitatum*, *Pseudomonas syringae* y *Salmonella enterica* subesp. Entérica). La especie *Daldinia* sp. mostró los mejores efectos inhibidores del 74.67% contra *Penicillium digitatum* y 60.42% frente a *Salmonella entérica*. Los resultados aquí expuestos coinciden con otros estudios realizados por Khruengsai *et al.* (2021) en donde se aisló *Daldinia* sp. de plantas de *Barleria prionitis* en Tailandia y mostró 80.3% de inhibición contra el hongo causante de Antracnosis en fresa *Colletotrichum acutatum*. El género *Diaphorte* aislado como hongo endófito de plantas de *Azadirachta indica* (neem) mostró actividad antifúngica contra varios hongos patógenos como: *Aspergillus niger*, *Botrytis cinérea*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Fusarium avenaceum*, *F. moniliforme*, *Ophiostoma minus* y *Penicillium islandicum* (Chutulo y Chalannavar, 2018).

Estudios realizados por Larran *et al.* (2016) probaron hongos endófitos sobre la enfermedad *Drechslera tritici-repentis* en trigo y redujeron la germinación de las esporas del patógeno en un 52% y en otro estudio similar a lo reportado por Anwaar *et al.* (2019) evaluaron hongos endófitos entre ellos *Colletotrichum* para el control de la roya del trigo (*Puccinia recóndita*) y concluyeron que redujo la severidad de la enfermedad en un 60%.

En otros estudios, se aisló una cepa de *Colletotrichum* de la planta de té (*Camellia sinensis*) y mostró su mayor actividad antagónica contra *Pestalotiopsis theae* y *Colletotrichum camelliae* en un 64% y 37% respectivamente (Rabha *et al.*, 2014). Los hongos endófitos asintomáticos actúan como antagonistas de los hongos como las royas; así en otro estudio reportado por Currie *et al.* (2019) demostraron que la presencia del organismo endófito *Colletotrichum acutatum* interfirió con la germinación de la roya *Puccinia Komarovii* observándose ausente sobre la maleza *Impatiens glandulifera*. En otro estudio fue aislado como endófito el género *Colletotrichum* en *Phaseolus vulgaris* y este se reportó como el más abundante, los autores infieren a que puede ser porque estos crecen muy rápido y son altamente competitivos, también mencionan que los hongos que son patógenos para una especie pueden colonizar otras especies de manera endófito (Gonzaga *et al.*, 2015).

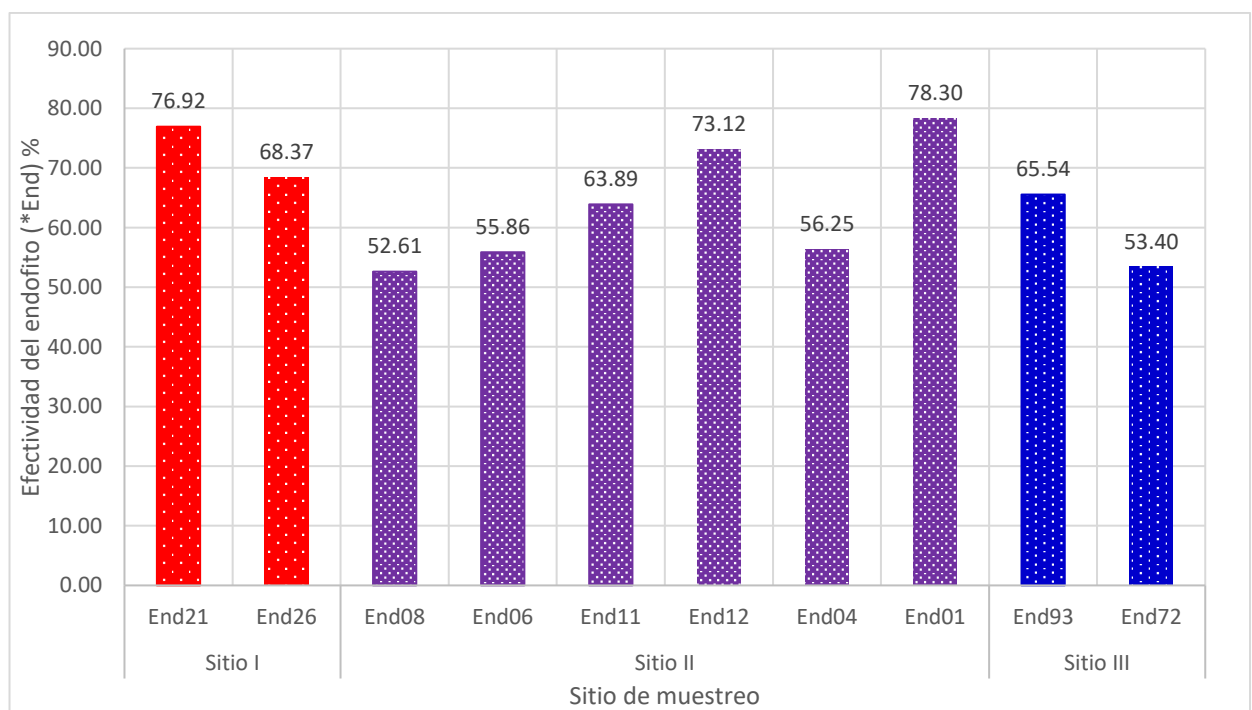


Figura 3. Efecto de hongos endófitos en la inhibición de la germinación de uredosporas de *Hemileia vastatrix* en %. *End (Endófito)

4.5.5. Identificación molecular

Los hongos endófitos que resultaron antagónicos a *Hemileia vastatrix* fueron end21, end26, end08, end06, end11, end12, end04, end01. En cuanto a las cepas end72 y end93 resultaron con bajo porcentaje de germinación de uredosporas por lo que estuvieron por encima del 50% de efectividad; sin embargo en las pruebas de patogenicidad estas cepas resultaron con alto potencial patogénico por lo que no se consideraron para la secuenciación. La amplificación de los productos de PCR de las regiones ITS del ADN ribosomal de los hongos endófitos aislados, generó fragmentos de 700 pb con los iniciadores ITS1 e ITS4. El análisis de BLAST con 100% de identidad y de cobertura, y tomando en cuenta las características morfológicas indican que end21 correspondió a *Colletotrichum gigasporum*, este resultado coincide con lo reportado por Liu *et al.* (2014) donde esta misma especie se aisló como endófito en *Coffea arabica* en Colombia, y en Vietnam, también se aislaron como endófitos en hojas de *Serjania laruotteana* (da Silva *et al.*, 2021), end04 se identificó como *Colletotrichum siamense* y end26 como *Colletotrichum gloeosporioides*, end11 se identificó como *Colletotrichum brevisporum*, y se ha aislado como hongo endófito en plantas de *Lycium chinense* en el sureste de Europa, Asia y Corea (Paul *et al.*, 2014), end12 se identificó como *Colletotrichum karstii* y se ha aislado como endófitos de una amplia gama de plantas en todo el mundo (Damm *et al.*, 2012), end01 de acuerdo al BLAST se idéntico con el género *Colletotrichum* sp.; sin embargo no se identificó con especie. La cepa end06 con el 100% de identidad y cobertura se identificó como *Daldinia eschscholtzii*, esta especie es considerada de naturaleza endófito (Barbosa-Reséndiz *et al.*, 2020). *Daldinia eschscholtzii* también se ha aislado como endófito en plantas de Guaraná en Brasil (Santos *et al.*, 2020), end08 con 99.71% de identidad y 100% de cobertura se identificó como *Diaporthe brasiliensis*, esta especie se ha aislado como endófito en manzano, durazno, peral y arándano (Sessa *et al.*, 2018), existe una amplia gama de hongos incluidos patógenos y saprobios que pueden ser endófitos como por ejemplo *Diaphorte* que se aisló como endófito de *Azadirachta indica* (neem) y tuvo actividad antifúngica contra varios hongos patógenos

(Grabka *et al.*, 2022). Otro estudio realizado en hojas de *Serjania laruotteana*, aislaron una diversidad de hongos endófitos entre ellas a los géneros *Colletotrichum* y *Diaphorthe* (da Silva *et al.*, 2021).

4.5.6. Análisis filogenético

El análisis filogenético de la secuencia del aislado 06 formó un clado que se relaciona con *Daldinia* sp, por un lado y con *Daldinia eschscholtzii* por otro (Figura 4). La estabilidad se aseguró con 500 réplicas bootstrap mediante el método de máxima verosimilitud, esto se realizó para todos los casos. En la misma figura se observó el árbol filogenético del hongo endófito 08 que se situó con 87% en el clado de la especie *Diaporthe brasiliensis*, también se observó a la cepa end01 con un soporte de 100% formó un clado con el género *Colletotricum* sp., la cual no se identificó con especie (ON155182), end11 con un soporte de bootstrap del 100%, formó un clado con la especie *Colletotrichum brevisporum*, end12 formó un clado con *Colletotrichum karsti*, end21 formó un clado con *Colletotrichum gigasporum*, end26 con *Colletotrichum gloeosporioides* y end04 con un 100% de soporte con *Colletotrichum siamense*.

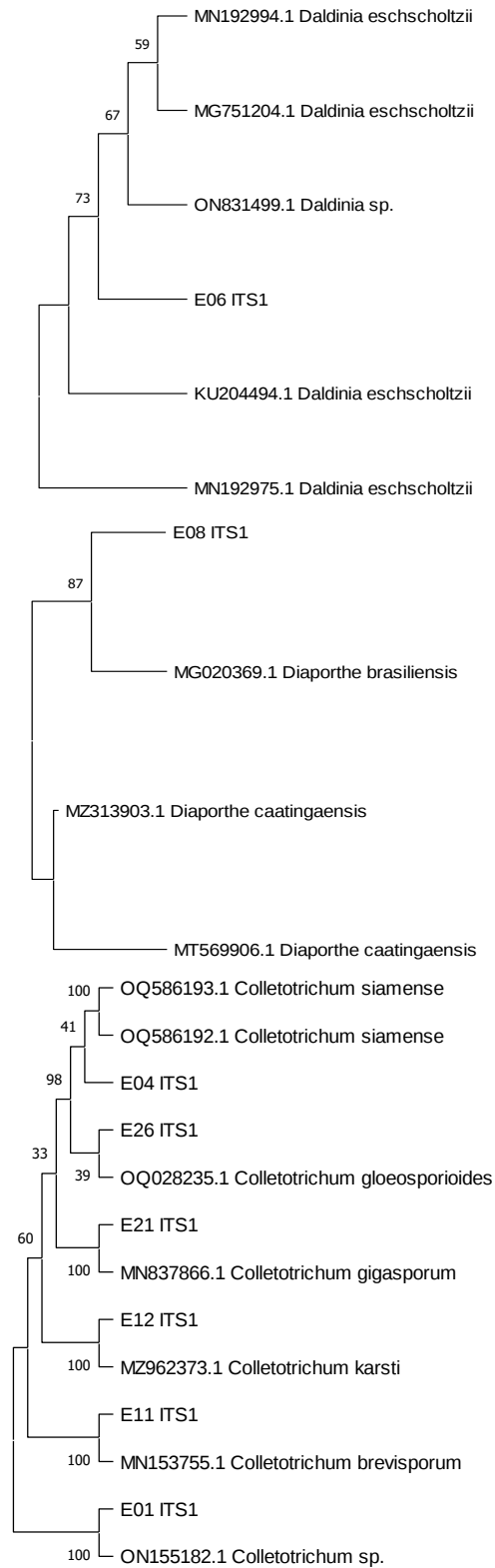


Figura 4. Dendrograma de los géneros *Daldinia*, *Diaporthe* y *Colletotrichum* con el método de máxima verosimilitud asegurando la estabilidad con 500 bootstrap

Hay tres modos de acción de los hongos endófitos; pueden ser supresoras, hongos sinérgicos u hongos no efectivos o neutrales, lo que indica que entendiendo su potencial de interacción con el patógeno puede tener éxito o fracaso como agente de control biológico (Kurose *et al.*, 2012).

Con base en este estudio se puede deducir que las pruebas de antagonismo que se realizaron son un primer estudio y son tomados en cuenta al momento de elegir a las cepas como agentes de control biológico. Estudios posteriores deberán enfocarse en realizar pruebas de antagonismo con plantas de café en campo y en realizar un trabajo más exhaustivo con mayor cantidad de muestras en diferentes sitios del estado de Chiapas y también hace falta realizar estudios sobre los tipos de metabolitos secundarios que pueden contener las cepas que resultaron efectivas; esto es, para tener una información más detallada sobre la manera en cómo influyeron de manera antagónica sobre el hongo *Hemileia vastatrix*.

4.6. Conclusión

Con base en los estudios revelados en la literatura especializada y la investigación realizada sobre las pruebas de antagonismo se puede concluir que:

- La diversidad y abundancia de hongos endófitos aislados estuvo directamente relacionada con el tipo de agroecosistema del cultivo de café. El ambiente tropical (sitio III) presentó la mayor cantidad de hongos endófitos, mientras que en el ambiente templado (sitio I) presentó la mayor diversidad de géneros. Algunas cepas de hongos endófitos mostraron una alta efectividad de antagonismo (50%) sobre la germinación *in vitro* de *H. vastatrix*.
- Las cepas end93 y end72 fueron antagónicas, pero en los estudios sobre pruebas de patogenicidad (No publicado) resultaron con alto potencial patogénico.

- Las cepas end26, end08, end06, end12 y end04, resultaron altamente antagonicas; sin embargo, estas cepas tuvieron esporulación tardía por lo que faltaría realizar las pruebas de patogenicidad.
- Las cepas end21, end11 y end01 resultaron con bajo potencial patogénico (No publicado) y altamente antagonicos a *Hemileia vastatrix*, estas cepas pasarían a ser estudiadas con plantas de café en campo.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada durante mi estudio de la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal.

4.7. Literatura citada

- Avelino J and Rivas G. 2013. La roya anaranjada del cafeto. Versión electrónica, 6-13. Disponible en: <http://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01071036> (Consultado el 15-03-23).
- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18(2), 265-267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Anwaar AH, Ali S, Sahi ST and Siddiqui MT. 2019. Evaluating the antagonistic role of fungal endophytes against leaf rust of wheat caused by *Puccinia recondite* *International Journal of Agriculture and Biology*, 21(2), 333-337. DOI: 10.17957/IJAB/15.0898
- Arnold AE and Herre EA. 2003. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Micología*. 95(3), 388-398. <https://doi.org/10.1080/15572536.2004.11833083>
- Backman AP and Sikora AR. 2008. Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control*. 46(1), 1-3. Doi:10.1016/j.biocontrol.2008.03.009
- Barbosa-Resendiz A, Valenzuela R, Sánchez-Flores M, Bautista-Hernández S, Cobos-Villagrán A, Perez-Valdespino A, Espinoza-Mellano MdelR, Martínez-Pineda M, Raymundo T. 2020. El género *Daldinia* (Sordariomycetes, Ascomycota) en México. *Acta Botánica Mexicana*. 127:e1600. <https://doi.org/10.21829/abm127.2020.1600>
- Barnett HL and Hunter BB. 1998. Ilustred genera of imperfect fungi. Fourtrh edition. St. Paul, Minnesota. USA. APS PRESS.218
- Bongiorno VA, Rhoden SA, García A, Polonio JC, Azevedo JL, Pereira JO, Pamphile JA. 2016. Genetic diversity of endophytic fungi from *Coffea*

arabica cv. IAPAR-59 in organic crops. Ann. Microbiol. 66(2), 855–865. DOI:[10.1007/s13213-015-1168-0](https://doi.org/10.1007/s13213-015-1168-0)

- Casas LL, Pereira JO, Costa-Neto PQ, Silva JF, Almeida LN, Bianco RA and Azebedo JL. 2021. Endophytic *Colletotrichum siamense* for biocontrol and resistance induction in guarana seedlings. International Journal of Microbiology. (4), 1-8. doi.org/10.1155/2021/1925226
- Chen J, Zhang LC, Xing YM, Wang YQ, Xing XK, Zhang DW, Liang HQ, Guo SX. 2013. Diversity and Taxonomy of Endophytic Xylariaceous Fungi from Medicinal Plants of *Dendrobium* (Orchidaceae). PLOS ONE 8(3): e58268. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058268>
- Chutulo EC and Chalannavar RK. 2018. Endophytic mycoflora and their bioactive compounds from *Azadirachta Indica*: A Comprehensive Review. J Fungi. 4(2), 42. Doi: [10.3390/jof4020042](https://doi.org/10.3390/jof4020042)
- Currie AF, Gange AC, Razak NAB, Ellison CA, Maczey N and Wood SV. 2019. Endophytic fungi in the invasive weed *Impatiens glandulifera*: a barrier to classical biological control? Weed Research. 60(1), 50–59. <https://doi.org/10.1111/wre.12396>
- Da Silva Ribeiro A, Polonio JC, Dos Santos Oliveira JA, Ferreira AP, Alves LH, Mateus NJ, Mangolin CA, de Azevedo JL, Pamphile JA. 2021. Retrotransposons and multilocus sequence analysis reveals diversity and genetic variability in endophytic fungi-associated with *Serjania laruotteana* Cambess. Braz J Microbiol. 52(4), 2179-2192. Doi: [10.1007/s42770-021-00605-0](https://doi.org/10.1007/s42770-021-00605-0)
- Damm U, Cannon PF, Woudenberg JH, Johnston PR, Weir BS, Tan YP, Shivas RG and Crous PW. 2012. The *Colletotrichum boninense* species complex. Stud Mycol. 73(1):1-36. Doi: [10.3114/sim0002](https://doi.org/10.3114/sim0002)
- Diario Oficial de la Federación (DOF). Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-032-FITO-1995. 2015. Disponible en: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5403310&fecha=11/08/2015#gsc.tab=0 (Consultado el 01 de octubre del 2022).
- Díaz- González S, Marín P, Sánchez R, Arribas C, Kruse J, González- Melendi P, Brunner F and Sacristán S. 2020. Mutualistic fungal endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Ct0861 colonizes and increases growth and yield of maize and tomato plants. Agronomy. 10 (10) 14-93. Doi: [10.3390/agronomy10101493](https://doi.org/10.3390/agronomy10101493)
- Ellis D, Davis S, Alexiou H, Handke R, Bartley R. 2007. Descriptions of medical fungi. 2nd ed. Adelaide: Nexus Print Solutions. Disponible en: https://www.academia.edu/27582963/DESCRIPTIONS_OF_MEDICAL_FUNGI_SECOND_EDITION (consultado en enero, 2023)
- Ellis MB. 1976. More dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.507p.

- Escudero-Leyva E, Granados-Montero MDM, Orozco-Ortiz C, Araya-Valverde E, Alvarado-Picado E, Chaves-Fallas JM, Aldrich-Wolfe L, Chaverri P. 2023. The endophytobiome of wild Rubiaceae as a source of antagonistic fungi against the American Leaf Spot of coffee (*Mycena citricolor*). Journal of Applied Microbiology. 134(5) lxad090. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxad090>
- Gamboa-Gaitán MA, Laureano S and Bayman P. 2003. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? Mycopathologia, 156, 41–45. <https://doi.org/10.1023/A:1021362217723>
- Gangadevi V and Muthumary J. 2008. Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*, Micología Balcánica. 5, 1-4. doi.org/10.5281/zenodo.2548404
- Gonzaga LL, Costa LEO, Santos TT, Araujo EF and Queiroz MV. 2014. Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. Journal of Applied Microbiology. 118(2), 485-496. doi:10.1111/jam.12696
- Grabka R, d'Entremont TW, Adams SJ, Walker AK, Tanney JB, Abbasi PA and Ali S. 2022. Fungal endophytes and their role in agricultural plant protection against pests and pathogens. Plants, 11(3), 384. Doi: [10.3390/plants11030384](https://doi.org/10.3390/plants11030384)
- INIFAP, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 2012. Muestreo de Suelos y preparación de muestras. Ficha técnica N° 23. Disponible en: <http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/935.pdf> (Consultado 22 de diciembre del 2021).
- Khruengsai S, Pripdeevech P, Tanapichatsakul C, Srisuwannapa C, D'Souza PE, Panuwet P. 2021. Antifungal properties of volatile organic compounds produced by *Daldinia eschscholtzii* MFLUCC 19-0493 isolated from *Barleria prionitis* leaves against *Colletotrichum acutatum* and its post-harvest infections on strawberry fruits. PeerJ. 9(2):e11242 doi: [10.7717/peerj.11242](https://doi.org/10.7717/peerj.11242)
- Kurose D, Furuya N, Tsuchiya K and Tsushima. 2012. Endophytic fungi associated with *Fallopia japonica* (Polygonaceae) in Japan and their interactions with *Puccinia polygoni-amphibii* var. *Tovariae*, a candidate for classical biological control. British Mycological Society. 116(7), 785-791. doi:10.1016/j.funbio.2012.04.011
- Larran S, Simón MR, Moreno MV, Siurana, SMP, Perello A. 2016. Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot disease. Biological Control, 92, 17-23. DOI:10.1016/j.biocontrol.2015.0902
- Liu F, Cai L, Crous PW and Damm U. 2014. The *Colletotrichum gigasporum* species complex. Persoonia. 33, 83-97. Doi: [10.3767/003158514X684447](https://doi.org/10.3767/003158514X684447)

- López-Gómez P. 2022. Investigador del Programa de Biotecnología del Campo Experimental Rosario Izapa. INIFAP-CIRPAS. Comunicación personal.
- Lu L, Karunarathna SC, Hyde KD, Suwannarach N, Elgorban AM, Stephenson SL, Al-Rejaie S, Jayawardena RS, Tibpromma S. 2022. Endophytic fungi associated with coffee leaves in China exhibited *In Vitro* antagonism against fungal and bacterial pathogens. J Fungi. 8(7), 698. DOI: [10.3390/jof8070698](https://doi.org/10.3390/jof8070698)
- Mamani-Huayhua G, Leon-Ttacca B, Palao-Iturregui LA and Borja-Loza YR. 2021. Biocontrol de la roya amarilla del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) con cepas de *Trichoderma* sp. endófito. Cultivos Tropicales. 42(4) 13p. <https://www.redalyc.org/journal/1932/193270002001/html/>
- Manson RH, Hernández-Ortiz V, Gallina S. and Mehltreter K. (editores). 2008. Agroecosistemas cafetaleros de Veracruz: biodiversidad, manejo y conservación. Instituto de Ecología A.C. (INECOL) e Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT) México, 348 p. disponible en: https://inecol.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1005/162/1/1245_2008-10121.pdf (consultado el 10-02-23).
- Mejía CL. 2015. Microbianas y control biológico como alternativa de manejo de la roya anaranjada del cafeto. In: Memorias del Seminario Científico Internacional. Manejo Agroecológico de la Roya. pp.47 disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i5137s.pdf> (Consultado el 19 de agosto del 2021).
- Moguel P and Toledo VM. 1999. Biodiversity conservation in traditional coffee systems of México. Conservation Biology, 13(1) 11-21. <https://www.jstor.org/stable/2641560>
- Paul NC, Lee HB, Lee JH, Shin KS, Ryu TH, Kwon HR, Kim YK, Youn YN, Yu SH. 2014. Endophytic fungi from *Lycium chinense* Mill and characterization of two new Korean records of *Colletotrichum*. International Journal of Molecular Sciences. 15(9), 15272-15286. Doi: [10.3390/ijms150915272](https://doi.org/10.3390/ijms150915272)
- Pinzón GYA, Lizette BS, Buitrago HG. 2013. Diagnóstico molecular diferencial de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* en ñame (*Dioscorea* sp.). Revista Colombiana de Biotecnología. 15(1), 52-60. <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v15n1/v15n1a6.pdf>
- Rabha AJ, Naglot A, Sharma GD, Gogoi HK and Veer V. 2014. *In Vitro* evaluation of antagonism of endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* against potent fungal pathogens of *Camellia sinensis*. Indian J Microbiol, 54(3), 302-9. Doi: [10.1007/s12088-014-0458-8](https://doi.org/10.1007/s12088-014-0458-8)
- Rubini MR, Silva-Ribeiro RT, Pomella AW, Maki CS, Araújo WL, Dos Santos DR and Azevedo JL. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*, causal agent of Witches' Broom Disease. International Journal of Biological Sciences, 1(1), 24-33. Doi: [10.7150/ijbs.1.24](https://doi.org/10.7150/ijbs.1.24)

- Sanchez- Fernandez RE, Sanchez-Ortiz BL, Sandoval-Espinosa, YKM, Ulloa-Benitez A, Armendariz-Guillen B, Garcia-Mendez MC and Macias-Rubalcava ML. 2013. Hongos Endófitos: Fuente Potencial de Metabolitos Secundarios Bioactivos con utilidad en Agricultura y Medicina. Revista Especializada en Ciencias Biológicas, 16(2), 132-146. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72084-9)
- Sanjuán HK, Rivera-Coto G, Villalobos-Moya K, Orozco-Rodríguez R, Orozco-Cayasso S. 2017. Pruebas *in vitro* de hongos antagonistas para combatir la roya de mora en Costa Rica. Agronomía costarricense, 41(1), 19-32. <http://dx.doi.org/10.15517/rac.v41i1.29746>
- Santamaría J and Bayman P. 2005. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). Microbial Ecology, 50(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0002-1>
- Santos C, Santos da Silva BN, Amorim Ferreira E Ferreira AFT, Santos C, Lima N, Silva Bentes JLD. 2020. Fungal endophytic community associated with Guarana (*Paullinia cupana* Var. *Sorbilis*): Diversity driver by Genotypes in the Centre of Origin. J Fungi. 6(3), 123. Doi: [10.3390/jof6030123](https://doi.org/10.3390/jof6030123)
- Saucedo-García A, Anaya AL, Espinosa-García FJ, González MC. 2014. Diversity and communities of foliar endophytic fungi from different agroecosystems of *Coffea arabica* L. in two regions of Veracruz, Mexico. PLoS One. 9(6)84-54. Doi: [10.1371/journal.pone.0098454](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098454)
- Sessa L, Abreo E and Lupo S. 2018. Diversity of fungal latent pathogens and true endophytes associated with fruit trees in Uruguay. 166 (9), 633-647. <https://doi.org/10.1111/jph.12726>
- Shiomi HF, Silva HSA, Melo ISD, Nunes FV and Bettiol W. 2006. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. Scientia Agrícola, 63 (1), 32-39. doi.org/10.1590/S0103-90162006000100006
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2023. Disponible en: https://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/ (Consultado el 15-02-23)
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, Molecular Biology and Evolution. 28(10), 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- USDA, United States Department of Agriculture. 2022. Report Name: Coffee Annual. Disponible en: https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Coffee%20Annual_Mexico%20City_Mexico_MX2022-0031.pdf. (Consultado el 15-02-23)
- Vega FE, Posada F, Aime MC, Peterson SW, Rehner SA. 2008. Fungal endophytes in green coffee sedes. Mycosystema. 27(1), 75-84. Disponible

en: <file:///C:/Users/sams/Downloads/IND44066322.pdf> (Consultado el 13-01-23).

Vega FE, Simpkins A, Aime MC, Posada F, Peterson SW, Rehner SA, Infante F, Castillo A, Arnold AE. 2010. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, México and Puerto Rico. *Fungal Ecology*. 3(3), 122-138 <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2009.07.002>