



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp. CON POTENCIAL PARA
EL MANEJO DE *Paramyothecium roridum* [(Tode) L. Lombard y
Crous] EN VIVEROS DE CAFETOS

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

Presenta:

SILVERIO JARQUÍN CORDERO

Bajo la supervisión de:

DIRECTOR: DR. DIMAS MEJÍA SÁNCHEZ



APROBADA



Chapingo, Estado de México, mayo de 2022

La presente tesis, titulada: **Cepas nativas de *Trichoderma* spp. con potencial para el manejo de *Paramyrothecium roridum* [(Tode) L. Lombard y Crous] en viveros de cafetos**, realizada por el alumno: **Silverio Jarquín Cordero**, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

COMITÉ ASESOR

DIRECTOR:



DR. DIMAS MEJÍA SÁNCHEZ

ASESOR:



DR. CLEMENTE VILLANUEVA VERDUZCO

ASESOR:



DR. MIGUEL ÁNGEL SERRATO CRUZ

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	v
DEDICATORIAS	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
DATOS BIOGRÁFICOS.....	viii
RESUMEN GENERAL.....	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
JUSTIFICACIÓN.....	3
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
HIPÓTESIS.....	4
LITERATURA CITADA	5
CAPÍTULO I. ENFERMEDADES FUNGOSAS DEL CAFETO.....	7
1.1. Origen y distribución del cafeto (<i>Coffea arabica</i> L.)	7
1.2. Importancia del cafeto.....	7
1.3. Enfermedades del cafeto causadas por hongos.....	8
1.3.1. Importancia de la mancha foliar causada por <i>Paramyrothecium roridum</i> en el cultivo del cafeto	10
1.3.2. Agente causal de la mancha foliar	11
1.3.3. Rango de hospedantes	12
1.3.4. Síntomas de la enfermedad	13
1.3.5. Condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad	15
1.3.6. Cualidades de <i>Paramyrothecium roridum</i>	15
1.3.7. Manejo integral de <i>Paramyrothecium roridum</i>	17
2.0. LITERATURA CITADA	23
CAPÍTULO II.- CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE <i>Paramyrothecium roridum</i> PARA VERIFICACIÓN COMO AGENTE CAUSAL DE LA MANCHA FOLIAR DE CAFETO EN MÉXICO.....	30

2.1.	RESUMEN	30
2.2.	ABSTRACT	31
2.3.	INTRODUCCIÓN	32
2.4.	MATERIALES Y METODOS	33
2.4.1.	Obtención del agente causal de la mancha foliar	33
2.4.1.1.	Material vegetal	33
2.4.1.2.	Aislamiento y purificación del patógeno	33
2.4.2.	Pruebas de patogenicidad	34
2.4.3.	Identificación morfológica del patógeno.....	34
2.4.4.	Identificación molecular	35
2.4.4.1.	Extracción de ADN	35
2.4.4.2.	Amplificación por PCR	36
2.4.4.3.	Análisis de las secuencias	36
2.4.4.4.	Análisis filogenético.....	36
2.5.	RESULTADOS.....	37
2.5.1.	Aislamiento del patógeno.....	37
2.5.2.	Pruebas de patogenicidad	37
2.5.3.	Identificación morfológica	38
2.5.4.	Identificación molecular	40
2.6.	DISCUSIÓN	42
2.7.	CONCLUSIONES	46
2.8.	LITERATURA CITADA.....	47
CAPÍTULO III. POTENCIAL ANTAGÓNICO <i>in vitro</i> DE DIFERENTES AISLADOS NATIVOS DE <i>Trichoderma</i> spp. CONTRA <i>Paramyrothecium roridum</i>		51
3.1.	RESUMEN	51
3.2.	ABSTRACT	52
3.3.	INTRODUCCIÓN	53
3.4.	MATERIALES Y METODOS	54
3.4.1.	Obtención de especies nativas de <i>Trichoderma</i> spp.	54

3.4.2.	Colecta de muestras de suelo	54
3.4.3.	Aislamiento, purificación e identificación morfológica de <i>Trichoderma</i> spp.....	55
3.4.4.	Identificación molecular	56
3.4.4.1.	Extracción de ADN	56
3.4.4.2.	Amplificación por PCR	57
3.4.4.3.	Análisis de secuencias	58
3.4.4.4.	Análisis filogenético.....	58
3.4.5.	Evaluación del antagonismo <i>in vitro</i> por técnica de cultivo dual ..	58
3.4.5.1.	Días al primer contacto entre hifas.....	59
3.4.5.2.	Clasificación del antagonismo	59
3.4.5.3.	Porcentaje de inhibición	60
3.5.	RESULTADOS.....	60
3.5.1.	Aislamiento, purificación e identificación morfológica de <i>Trichoderma</i> spp.....	60
3.5.2.	Identificación molecular	65
3.5.3.	Días al primer contacto entre hifas	66
3.5.4.	Clasificación del antagonismo	67
3.5.5.	Porcentaje de inhibición.....	67
3.6.	DISCUSIÓN	70
3.7.	LITERATURA CITADA.....	76
3.8.	CONCLUSIONES GENERALES.....	81

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Sitios de colecta para obtener aislados nativos de <i>Trichoderma</i> spp	61
Cuadro 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>P. roridum</i> debido a cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales enfermedades fúngicas del café en México	9
Figura 2. Síntomas en plántulas de cafeto a 3 ddi.	38
Figura 3. Crecimiento del aislado a los 14 dds en medio de cultivo PDA incubado a 25 ± 2 °C	39
Figura 4. Características de aislados a 40x	39
Figura 5. Amplificación del producto PCR en gel de agarosa al 1 %.	40
Figura 6. Árbol filogenético de la secuencia correspondiente al punto color anaranjado (PRMF12) del aislado de <i>P. roridum</i>	41
Figura 7. Ubicación en México de los sitios de colecta de las muestras de suelo para obtener especies nativas de <i>Trichoderma</i>	55
Figura 8. Características de las colonias de los 18 aislamientos nativos de <i>Trichoderma</i> spp.	63
Figura 9. Características morfológicas de cepas representativas del género <i>Trichoderma</i>	64
Figura 10. Amplificación del producto PCR en gel de agarosa al 1 %.	65
Figura 11. Árbol filogenético de las secuencias de <i>Trichoderma</i>	66
Figura 12. Confrontaciones duales de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp., contra <i>P. roridum</i>	69

DEDICATORIAS

A Dios, por darme la oportunidad de vivir una experiencia más en mi vida profesional y personal, otorgándome el regalo del momento oportuno para realizar mis estudios de Maestría En Ciencias En Protección Vegetal. Tus tiempos son perfectos mi Dios.

A mis padres, Melita y Silverio, por ser la guía en mi vida, por las enseñanzas que me han compartido, los aprendizajes transmitidos y los sabios consejos que me han dado, base de este logro ¡este triunfo también se los dedico a ustedes!

A mi esposa, **Yasmin**, por creer en mí y estar siempre en los momentos difíciles

A mis hermanas, Violeta, Teresa, Carmen, Rosa Isela y a mi hermano Jonathan, por el apoyo que siempre me brindan, su amistad, cariño y los ánimos que me dan para ser mejor cada día.

A mis sobrinos, Alan, Erick, Anette, Fanny, Yanin y Fátima, por el cariño que siempre me demuestran y que en un futuro no muy lejano mis logros los inspire a cumplir sus metas.

A mis compañeros de Maestría, generación 62, por coincidir en esta etapa de formación académica y aprender de ellos en lo profesional como personal.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de Maestría.

A mi alma mater, la **Universidad Autónoma Chapingo** y a todos los que conforman el programa de **Maestría en Ciencias en Protección Vegetal** por todo el apoyo otorgado.

Al **Dr. Dimas Mejía Sánchez**, por dirigir este proyecto de investigación, orientándome y transmitiéndome sus conocimientos en todo momento, por su paciencia y amistad.

Al **Dr. Roney Solano Vidal**, por todo su apoyo, disponibilidad de tiempo, palabras de aliento y animo que siempre me brindó y por su amistad sincera.

Al **Dr. Clemente Villanueva Verduzco**, por todo su apoyo, sugerencias y observaciones aportados a fin de mejorar este trabajo de investigación.

Al **Dr. Miguel Ángel Serrato Cruz**, por su tiempo, observaciones y entusiasmo para contribuir en la finalización de este proyecto de investigación de la mejor manera.

Al **MC. Antonio Segura Miranda**, por su apoyo, observaciones y por estar siempre al pendiente de la realización de este proyecto de investigación.

A la **Ing. Erida Yasmin**, por compartirme sus conocimientos de biología molecular en el trabajo de laboratorio, por su paciencia y ánimo que siempre me brindó.

Este trabajo tiene el propósito de contribuir a los proyectos PRONACES en área de Soberanía Alimentaria y Conservación del Medio Ambiente.

DATOS BIOGRÁFICOS



Silverio Jarquín Cordero

Nació el 29 de agosto de 1993, en la comunidad de “Santa Cruz Bamba”, perteneciente al municipio de Tehuantepec, en el estado de Oaxaca. Realizó sus estudios de nivel básico en la escuela primaria “José María Morelos y Pavón” (1999-2005); el nivel medio básico en la escuela Telesecundaria de la misma comunidad (2005-2008).

Los estudios de medio superior los realizó en la Universidad Autónoma Chapingo, ubicada en el municipio de Texcoco de Mora, Estado de México (2008-2011); Cursó los estudios de nivel superior en el Departamento de Fitotecnia, de la misma Universidad (2011-2015) graduándose con el título de Ingeniero Agrónomo especialista en Fitotecnia. Del año 2017 al 2019 trabajo en la empresa exportadora de banano orgánico “Tropical Organic Growers” ubicada en el estado de Colima, México, donde desempeñó el puesto de supervisor de campo. Comenzó sus estudios de Maestría en Ciencias en el año 2020 en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Fue integrante de la generación 62, culminando sus estudios en el año 2022.

RESUMEN GENERAL

CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp. CON POTENCIAL PARA EL MANEJO DE *Paramyrothecium roridum* [(Tode) L. Lombard y Crous] EN VIVEROS DE CAFETOS

Se identificó a *Paramyrothecium roridum* como agente causal de la mancha foliar en plántulas de cafeto. La cepa patogénica se aisló de hojas con síntomas de manchas foliares y necrosis de tallo en plántulas proveniente del estado de Chiapas. Se aislaron cepas nativas de *Trichoderma* spp. de regiones productoras de café en el estado de Hidalgo, Puebla y Veracruz, México. Los objetivos de esta investigación fueron caracterizar *Trichoderma* spp. en ecosistemas silvestres y agroecosistemas, mediante aspectos genotípicos y fenotípicos para evaluar su eficacia *in vitro* contra *P. roridum*. *Trichoderma* spp. se aisló directamente de suelo mediante el método de dilución de esporas en cajas Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar. Dieciséis cepas se identificaron morfológicamente como *Trichoderma* spp. y 2 cepas (T8=MB y T15=CH1) identificadas morfológica y molecularmente como *Trichoderma harzianum*. La identificación filogenética se realizó mediante marcadores moleculares ITS1 e ITS4. Se evaluó la capacidad antagónica de cada cepa mediante la técnica de cultivos duales, analizando las variables: días al primer contacto entre hifas, clasificación de antagonismo y porcentaje de inhibición. Se utilizó un experimento completamente al azar con cinco repeticiones. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de comparación múltiple de medias (Tukey $\alpha=0.05$). En general las cepas tuvieron contacto hifal a los 4 días después de la siembra con excepción al T8(MB) que tuvo contacto a los 3 días. Doce cepas presentaron clasificación de antagonismo tipo II y 6 cepas mostraron antagonismo tipo I. En el porcentaje de inhibición el T3 (16.59%) y T12 (17.52%) fueron los mejores. Este es el primer reporte de control biológico en México usando *Trichoderma* spp. contra *P. roridum*.

Palabras clave: *Trichoderma* spp., *Paramyrothecium roridum*, identificación, Mancha foliar, Cafeto.

ABSTRACT

NATIVE STRAINS OF *Trichoderma* spp. WITH POTENTIAL FOR THE MANAGEMENT OF *Paramyrothecium roridum* [(Tode) L. Lombard y Crous] IN COFFEE TREE NURSERIES

Paramyrothecium roridum was identified as the causal agent of leaf spot in coffee seedlings. The pathogenic strain was isolated from leaves with symptoms of leaf spots and stem necrosis in seedlings from the state of Chiapas. Native strains of *Trichoderma* spp. from coffee-producing regions in the state of Hidalgo, Puebla, and Veracruz, México were isolated. The objectives of this research were to characterize *Trichoderma* spp. in wild ecosystems and agroecosystems through genotypic and phenotypic aspects to evaluate its in vitro efficacy against *P. roridum*. *Trichoderma* spp. was isolated directly from the soil by spore dilution method in Petri boxes with Potato Dextrose Agar culture medium. Sixteen strains were morphologically identified as *Trichoderma* spp. and 2 strains (T8=MB and T15=CH1) were identified morphologically and molecularly as *Trichoderma harzianum*. Phylogenetic identification was performed using molecular markers ITS1 and ITS4. The antagonistic capacity of each strain was evaluated using the dual culture technique, analyzing the variables: days to first contact between hyphae, antagonism classification, and inhibition percentage. A completely randomized experiment with five replicates was produced. The data obtained were subjected to an analysis of variance and a multiple comparison test of means (Tukey $\alpha=0.05$). In general, the strains had hyphal contact at 4 days after sowing, with the exception of T8(MB) which had contact at 3 days. Twelve strains presented type II antagonism classification and 6 strains showed type I antagonism. In the percentage of inhibition, T3 (16.59%) and T12 (17.52%) were the best. This is the first report of biological control in Mexico using *Trichoderma* spp. against *P. roridum*.

Keywords: *Trichoderma* spp., *Paramyrothecium roridum*, identification, Leaf spot, Coffee tree.

INTRODUCCIÓN GENERAL

En México el cultivo del cafeto es generador de empleos directos, indirectos y de divisas para el país y contribuye a la conservación de la biodiversidad, aporte económico, social, cultural y ecológico (Rojo, 2014; FIRA, 2017; CEDRSSA, 2020).

A nivel internacional, Brasil es el principal productor de café con 3 700 231 t, seguido de Vietnam (1 763 476 t), Colombia (833 400 t), Indonesia (773 409 t) y Etiopía (584 790 t). México ocupa el lugar número 12 por su producción de 175 555 t y el sexto lugar por la superficie cosechada con 636 004 ha (FAOSTAT, 2020; Elms, 2021).

En México se tienen establecidas aproximadamente 711 708 ha de cafeto, distribuidas en 484 municipios de 14 entidades federativas, siendo los principales Estados productores; Chiapas (384 937 t), Veracruz (229 997 t), Puebla (146 163 t), Oaxaca (85 663 t), Guerrero (38 960 t) e Hidalgo (29 268 t) que en conjunto concentran aproximadamente el 96 % del total de la producción (Elms, 2021; SIAP, 2021).

A nivel nacional el sector cafetalero enfrenta una serie de desafíos en el proceso de producción, entre éstos destacan el cambio climático, deficiente manejo agronómico, escasa técnica de producción implementada por los pequeños productores, edad de las plantaciones y el efecto de plagas, entre otros (Fabienne y Jacques, 2014; ICO, 2018; CEDRSSA, 2019).

Hay importantes enfermedades que causan estragos en las fincas cafetaleras de todo el mundo, entre éstas destacan la roya (*Hemileia vastatrix*), la antracnosis (*Colletotrichum kahawae*) y la traqueomicosis (*Fusarium xylarioides*). A nivel de plántulas existen enfermedades que afectan al cultivo de cafeto, por ejemplo, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Pythium* y el cancro o mancha foliar, causado por *Paramyrothecium roridum* (Tode) L. Lombard y Crous (Rojo, 2014).

Entre las principales medidas de manejo fitosanitario destaca el uso de fungicidas, variedades resistentes y acompañamiento de prácticas culturales al cultivo. También se han empleado hongos antagonistas como *Lecanicillium lecanii*, *Trichoderma harzianum*, *T. koningii*, *Beauveria bassiana* y la bacteria *Burkholderia cepacia* (Rojo, 2014; ICO, 2018).

En viveros y huertos cafetaleros ubicados en Puebla, Veracruz y Chiapas, se han observado síntomas similares a las reportadas por Pelayo *et al.* (2017), considerando que este patógeno se inicia en el semillero y se desarrolla en las plántulas. Los cafetos infectados muestran síntomas de canchales en las partes bajas de los tallos y pudrición de la raíz pivotante, causa necrosis de tallo y mancha foliar; particularmente durante lluvias continuas, produce una pérdida de plántulas de hasta el 33 % (Ranjini y Raja, 2019; Rodríguez, 2019). Por consiguiente, esta enfermedad está afectando a viveros de los estados mencionados, surgiendo la necesidad de identificar al agente causal y buscar estrategias de manejo amigables con el ambiente como el uso de agentes antagonistas nativos.

Se han realizado pocas evaluaciones *in vitro* de fungicidas y agentes biológicos para el manejo de esta enfermedad; las primeras pruebas se realizaron en Puerto Rico e India (Mercado y Rodríguez, 2001; Daivasikamani, 2013). En India se reporta resultados sobre la eficacia de agentes biológicos nativos aislados de suelo (*Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*) para el control *in vitro* de *P. roridum* (Ranjini y Raja, 2019).

Actualmente, la información en el uso de agentes biológicos en México es escasa, por lo que se requiere el empleo más extensivo del control biológico y para ello es necesario la obtención de agentes biocontroladores más eficaces de los que existen actualmente, agentes nativos que sean capaces de competir con los fitopatógenos dentro de un mismo nicho ecológico (Andrews, 2002).

JUSTIFICACIÓN

El proceso de producción agrícola del cafeto en México se ve afectado por enfermedades causadas por hongos patógenos, principalmente debido a las condiciones ambientales en las que se desarrolla este cultivo; en este sentido, se destaca el primer informe de la mancha foliar en cafeto (Variedad Oro Azteca) provocada por *P. roridum*, que Pelayo *et al.* (2017) observan en un vivero ubicado en la región de la Candelaria, Loxicha, Oaxaca. En visitas a viveros y huertos cafetaleros ubicados en Puebla, Veracruz y Chiapas, se han observado síntomas similares a las reportadas por Pelayo *et al.* (2017); por consiguiente, se infiere que esta enfermedad, de confirmarse que *P. roridum* es el agente causal, podría estar afectando a viveros de los Estados mencionados.

En México el uso de variedades como Costa Rica 95, Marsellesa y Oro Azteca introducidas a campo como tolerantes/resistentes para el manejo fitosanitario de la roya del cafeto, implica la formación de viveros en grandes superficies a nivel nacional. *P. roridum* se ha observado en viveros de la variedad Oro Azteca y de no generar métodos de manejo correctos, la situación podría constituir un problema serio para los productores a nivel de vivero y campo. Hasta el año 2020, el manejo implementado para las enfermedades de raíz en cafeto ha estado enfocado al complejo: *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Fusarium* spp., por lo que con esta investigación se busca generar métodos de manejo dirigidos al agente causal de la mancha foliar a fin de prevenir pérdidas considerables en viveros y la muerte de plántulas establecidas en campo. Con base a lo anterior y la falta de trabajo en México sobre evaluaciones del manejo biológico de este patógeno, resalta la importancia del presente estudio que busca aportar información útil como parte del esquema de manejo integral del cultivo.

OBJETIVO GENERAL

- 1) Caracterizar *Trichoderma* spp. en ecosistemas silvestres y agroecosistemas, mediante aspectos genotípicos y fenotípicos para evaluar su eficacia *in vitro* contra *Paramyrothecium roridum*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Verificar la identidad del agente causal de la mancha foliar y necrosis en plántulas de cafeto variedad Oro Azteca.
- 2) Caracterizar *Trichoderma* spp. mediante aspectos morfológicos y moleculares para determinar especies con potencial antagónico contra *Paramyrothecium roridum*.
- 3) Evaluar en condiciones *in vitro* la capacidad antagónica de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Paramyrothecium roridum*

HIPÓTESIS

- 1) Mediante métodos de identificación morfológica y empleo de marcador molecular por ITS se confirmará que muestras de hojas con mancha foliar y tallos necrosados de plántulas de cafeto tienen como agente causal de la enfermedad a *P. roridum*
- 2) Al menos una especie de *Trichoderma* spp. tendrá capacidad antagónica contra *P. roridum*
- 3) Ninguna especie de *Trichoderma* spp. tendrá capacidad antagónica contra *P. roridum*

LITERATURA CITADA

- Andrews, J. H. (2002). Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology* 30:603-635.
- CEDRSSA. (2019). Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. <http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/94Caf%C3%A9%20-Producci%C3%B3n%20y%20Consumo.pdf>. (Consulta, febrero 2021).
- CEDRSSA. (2020). Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. Investigación; Los apoyos directos a los productores de café y sus resultados. http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/44Appoyo_productores_Cafe.pdf (Consulta, marzo 2021).
- Daivasikamani, S., Shyam, S., Ranjini, A. P., Sudhakar, B. S. and Jayarama. (2013). Screening of fungicides against *Myrothecium roridum* causing stem necrosis and leaf spot disease of coffee seedlings. *Journal of Coffee Research* 41(1/2): 92-101.
- Elms, R. (2021). México: Coffee Annual Report GAIN Report Number MX2021-0027 (USDA Foreign Agricultural Service). 12 p.
- Fabienne, R. and Jacques, A. (2014). Impact of field pests and diseases on coffee quality. *Specialty Coffee*. 171 p.
- FAOSTAT. (2020). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>. (Consulta, marzo 2022).
- FIRA. (2017). Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. Panorama agroalimentario. Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial del café. México. 25 p.
- Mercado, W. I. y Rodríguez, R. P. (2001). Fungicidas para el manejo del cancro y la pudrición de raíz de los cafetos. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 85(3-4):187-195.
- Organización Internacional del Café (ICO). (2018). Identificación de los desafíos del sector cafetero en países seleccionados de Centroamérica y México, 15ª reunión del Comité de Proyectos, Ciudad de México, México. <http://www.ico.org/documents/cy2017-18/pj-120e-retos-centro-america-mexico.pdf>. (Consulta, marzo 2022).
- Pelayo, S. G., Yañez, M. M. J., and Solano, V. R. (2017). First report of leaf spot on *Coffea arabica* caused by *Paramyrothecium roridum* in Mexico. *Plant Disease Notes* 101(6). <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-16-1588-PDN>.
- Ranjini, A. P. and Raja, N. (2019). Efficacy of biocontrol agents on *Myrothecium roridum*, the stem necrosis and leaf spot pathogen of coffee seedlings. *Journal of Biopesticides* 12(1):109-113.
- Rodríguez, R. P. (2019). Enfermedades del Cafeto. Ecos del café. 8 p. <https://academic.uprm.edu/mmonroig/id52.htm>. (Consulta, marzo 2022).
- Rojo, J. E. (2014). Café I (*G. Coffea*). Departamento de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal) Facultad de Biología, Universidad Complutense. Madrid. *Serie Botánica* 7(2): 113-132.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2021).
http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.
(Consulta, marzo 2021).

CAPÍTULO I. ENFERMEDADES FUNGOSAS DEL CAFETO

1.1. Origen y distribución del cafeto (*Coffea arabica* L.)

El cafeto (*Coffea arabica* L.) es originario de Etiopía en donde se encuentra el mayor acervo genético del mundo (Moat *et al.*, 2017; Mulatu *et al.*, 2022). La distribución del cafeto a nivel mundial se logró gracias al movimientos de germoplasma, iniciando con la introducción de semilla a Yemen traídas de los bosques del suroeste de Etiopía, donde posteriormente el cultivo se expandió para satisfacer la demanda creciente en Moca y el Cairo a fines del siglo XV. A principios del siglo XVI se extendió por Medio Oriente, Norte de África, Europa, Indonesia y América. De Indonesia, a través de Europa, la variedad Typica llegó a América en 1723. La segunda variedad fue Bourbon, que llegó a América a mediados del siglo XIX. Actualmente, el café se cultiva en más de 70 países, principalmente en las regiones ecuatoriales de América, Sudeste de Asia, el subcontinente Indio y África. Los países clasificados por mayor producción de café son Brasil, Vietnam, Colombia, Indonesia, Etiopía, Honduras, India, Uganda, México y Guatemala (Scalabrin *et al.*, 2020; De Nadai Fernandes *et al.*, 2022).

1.2. Importancia del cafeto

El café es uno de los productos de cultivos agrícolas más comercializados en todo el mundo, tan solo detrás del petróleo y sin considerar el agua, el café es la bebida más consumida por la población humana. Este cultivo es trabajado por aproximadamente 25-30 millones de pequeños, medianos y grandes productores en alrededor de 70 regiones tropicales y subtropicales, comprendidos por los Trópicos de Cáncer y de Capricornio en donde la mayoría de estas regiones están en proceso de desarrollo o son subdesarrollados, los cuales son responsables del 70 % de la producción mundial. El café es un componente importante de la economía a nivel mundial, más de 125 millones de familias dependen de la industria del café para mejorar sus condiciones de vida y es una

fuentes de divisas para los países que lo producen (ICO, 2019; Muñoz *et al.*, 2019; Chalchissa *et al.*, 2022).

En el año 2020, los mayores productores de café fueron; Brasil (3 700 231 t), Vietnam (1 763 476 t), Colombia (833 400 t), Indonesia (773 409 t) y Etiopía (584 790 t). México se posicionó en el doceavo lugar con una producción de 175 555 t y fue el sexto lugar por la superficie cosechada con 636 004 ha. Por otro lado, los principales países exportadores son: Brasil (2 372 633 t), Vietnam (1 231 314 t), Colombia (694 928 t) e Indonesia (375 671 t). México ocupa el lugar 14 con una exportación de 100 767 t (FAOSTAT, 2020).

En México, la producción de café está distribuida en 14 entidades federativas, con una superficie sembrada de 700 993 ha, cosechada de 404 208 ha, y una producción total de 340 013 t; no obstante, más del 96 % de la producción se concentra en Chiapas (384 937 t), Veracruz (229 997 t), Puebla (146 163 t), Oaxaca (85 663 t), Guerrero (38 960 t) e Hidalgo (29 268 t) (SIAP, 2021).

1.3. Enfermedades del cafeto causadas por hongos

No obstante que el cultivo de cafeto es clave para la economía mundial, una de las bases principales, la producción presenta limitaciones determinadas por factores abióticos y bióticos que afectan el rendimiento y la calidad del café en todo el mundo. Como factores bióticos se encuentran las enfermedades fúngicas que afectan en diferentes etapas fenológicas del cultivo, desde plántula en vivero hasta el almacenamiento de la cosecha, infectando los diferentes órganos de la planta como raíces, tallos, hojas y frutos, provocando pérdidas en el mercado nacional e internacional (Dechassa, 2019).

Los agentes causales de las enfermedades del cafeto se han identificado y agrupado según su importancia en la incidencia y severidad en el cultivo. Las principales enfermedades a nivel mundial son: roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*), enfermedad del fruto del cafeto (*Colletotrichum kahawae*) y Marchitez del cafeto (*Gibberella xylarioides*). Mientras que como enfermedades

secundarias son: pudrición de la raíz (*Armillaria mellea*), antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), tizón foliar por *Ascochyta* y muerte regresiva de brotes (*Ascochyta tarda*), el marchitamiento de las plántulas o damping off (*Rhizoctonia* spp., *Phytium* spp., *Fusarium* spp., y *Paramyrothecium roridum*), mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*), ojo de gallo (*Mycena citricolor*), mal de hilachas (*Pellicularia koleroga*) y quema o derrite del cafeto (*Phoma costarricensis*), (Monroig *et al.*, 2002; Hindorf y Omondi, 2011; IICA, 2016; Dechassa, 2019; Jayanna *et al.*, 2021).

En México se tiene documentado un aproximado de 17 enfermedades de importancia económica que afectan al cafeto, sobresaliendo la roya del cafeto, mal de hilachas, ojo de gallo, mancha de hierro y antracnosis (Figura 1). Estas enfermedades se encuentran diseminadas en todas las regiones cafetaleras. El grado de los daños que estas enfermedades generan son determinados por las condiciones del ambiente físico natural, sistemas de cultivo y del manejo agronómico principalmente (SENASICA, 2018; SADER, 2019).

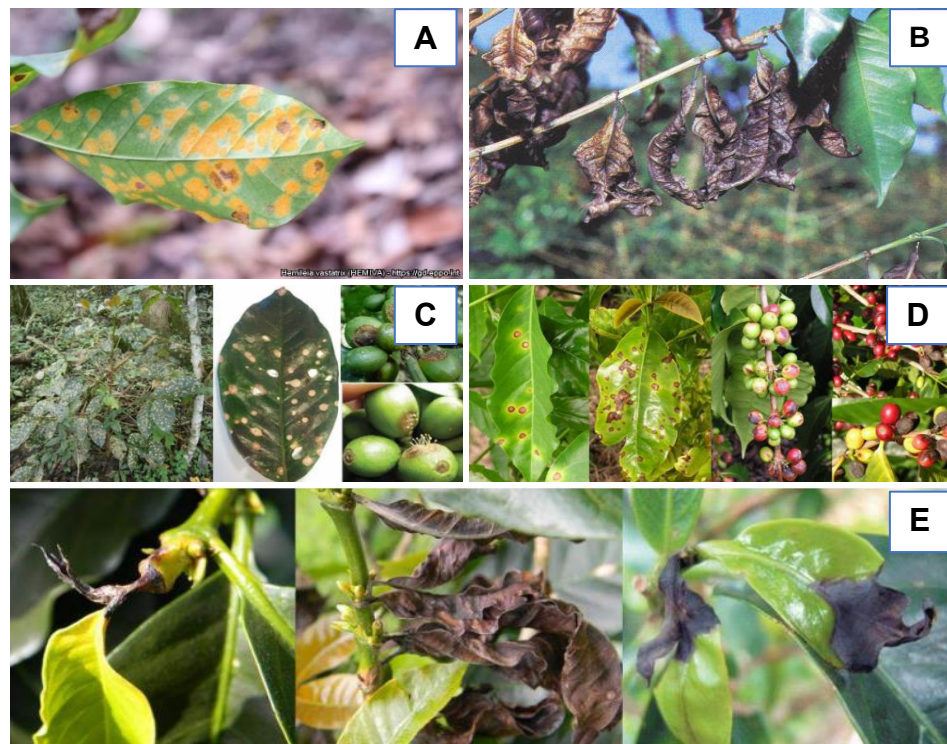


Figura 1. Principales enfermedades fúngicas del café en México. A) Roya del café. B) Mal de hilachas. C) Ojo de gallo. D) Mancha de hierro. E) Quema o derrite del cafeto. Créditos: SENASICA, 2016.

1.3.1. Importancia de la mancha foliar causada por *Paramyrothecium roridum* en el cultivo del cafeto

La mancha foliar, causada por *Paramyrothecium roridum* es una de las enfermedades del cultivo de café con importancia económica en los países productores como: China, Brasil, India, Colombia, Costa Rica, Guatemala, Indonesia, Puerto Rico y las Islas Vírgenes, debido a que esta enfermedad ocasiona daños en plántulas a nivel vivero con incidencias que van del 4 al 30 %, una mortalidad que oscila entre 5 y 33 % (Daivasikamani *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014; Ranjini y Raja, 2018; Ranjini y Raja, 2019; Huaman *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2021).

Es importante mencionar que en Puerto Rico, Bautista y Rodríguez (1996) consignan la presencia de *P. roridum* asociado con *Rizoctonia solani* causando pudrición de raíces y cancro de tallo en plántulas de cafeto en vivero, ocasionando más del 50 % de pérdidas. Por su parte, Rodríguez *et al.* (1996) identificaron a *P. roridum* asociado con *R. solani* atacando a plántulas de cafeto de la variedad Caturra y Bourbon a nivel de vivero, en donde obtuvieron que *R. solani* fue patógeno a la raíz y al tallo; sin embargo, *P. roridum* fue el más agresivo induciendo síntomas en 100 % de las inoculaciones y ocasionando 30 y 100 % de incidencia en Bourbon y Caturra, respectivamente. Con respecto al porcentaje de mortalidad de plántulas, varió de 40 a 60 %. Los mismos autores mencionan que por varios años, en los viveros de cafeto de Puerto Rico se han observado perdidas del 100 % cuando *P. roridum* se asocia con otros hongos patógenos como *R. solani*, formando complejos.

Como muchos cultivos, el café tiene la amenaza latente de la aparición de nuevas enfermedades de nuevo encuentro como resultado de la adaptabilidad de un patógeno nativo a un cultivo introducido (Dechassa, 2019). Bajo estas condiciones, esta enfermedad también se ha observado en una de las principales regiones cafetaleras de México por Pelayo *et al.* (2017) quienes reportaron por primera vez la enfermedad de la mancha foliar causada por *P. roridum* en

plántulas Oro Azteca (*Coffea arabica* × Híbrido de Timor) de un vivero en el Estado de Oaxaca.

En un trabajo realizado por Huaman *et al.* (2021) sobre caracterización morfológica de hongos asociados con el agroecosistema café en el Estado de Tabasco, México lograron identificar en hojas de plantas establecidas en campo, a 2 años del trasplante, a *P. roridum* como agente causal de la mancha foliar, convirtiéndose así, en un problema fitopatológico potencial a futuro por ser un peligro directo para los viveros en México.

1.3.2. Agente causal de la mancha foliar

Las especies de *Paramyrothecium* spp. son habitantes del suelo, presentes en regiones templadas y tropicales del mundo, la mayoría de las especies identificadas se reportan como saprofitos que coexisten en materia orgánica en proceso de descomposición, como hojas o tallos. Particularmente *P. roridum* es un hongo cosmopolita con una amplia gama de hospedantes, causando daños a cultivos económicamente importantes (Ranjini y Raja, 2018).

Ubicación taxonómica

Diferentes autores coinciden que la clasificación taxonómica de *Paramyrothecium roridum* (Tode) L.Lombard & Crous es:

Dominio: Eukaryota

Reino: Hongos

Filo: Ascomycota

Clase: Sordariomycetos

Orden: Hypocreales

Familia: Stachybotryaceae

Género: *Paramyrothecium*

Especies: *Paramyrothecium roridum* (Tode) L. Lombard & Crous
(EPPO, 2002; CABI, 2021; GBIF, 2021; Catalogue of Life, 2022)

Sinonimias de la enfermedad: mancha foliar del café, necrosis del tallo del café, podredumbre anular, cancro del tallo (EPPO, 2002; CABI, 2021).

Sinonimia (Catálogo de la vida, 2022): *Myrothecium roridum* Tode, (1790); *Dacrydium roridum* (Tode) Link, (1809); *M. advena* Sacc, (1908); *M. roridum* var. *violae* Lobik, (1928); *M. roridum* var. *eichhorniae* Ponnappa, (1970); *M. roridum* var. *apiculatum* Haware & Pavgi, (1971); *M. advena* var. *terrícola*, (2014); *Paramyrothecium roridum* (Tode) L. Lombard & Crous, (2016) y el Basiónimo: *Myrothecium roridum* Tode, (1790).

1.3.3. Rango de hospedantes

P. roridum tiene un rango de hospedantes con más de 200 especies de plantas de diferentes tipos como son: ornamentales, frutales y hortalizas. Entre las especies más importantes se encuentra el tomate, la soya, el cafeto, cacao, cucurbitáceas, papa y algodón (Sajjad *et al.*, 2017; Ruiz *et al.*, 2020).

A continuación, se mencionan algunos ejemplos a nivel mundial de diferentes especies de plantas en donde se ha reportado a *P. roridum* como agente causal de mancha foliar: en Pakistán, se encontró a *P. roridum* como agente causal de manchas foliares en nueve variedades de calabaza amarga (Sajjad *et al.*, 2017). También en Pakistán, Yousaf *et al.* (2018) evaluaron la patogenicidad de *P. roridum* en momordica (*Momordica charantia*), melón cantalupo (*Cucumis melo*), pepino (*Cucumis sativus*) y sandía (*Citrullus lanatus*), resultando susceptibles.

En Brasil, Cabral *et al.* (2009) reportan manchas foliares en pepino (*Cucumis sativus*), pepinillo (*C. anguria*) y calabaza (*Cucurbita moschata*), identificando como agente causal a *P. roridum*. En ese mismo país, Quezado *et al.* (2010) confirman el primer registro de *P. roridum* como agente causal de manchas foliares en pimienta dulce (*Capsicum annuum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), en la planta ornamental cuna de moisés (*Spathiphyllum*), plantas flamenco (*Anthurium*), diefembagia (*Dieffenbachia*) y en mala hierba o solanácea (*Nicandra physaloides*).

Durante una investigación relacionada con la identificación de microorganismos en macetas de Anturio (*Anthurium*) en Corea, Japón, se concluye que el agente causal de manchas foliares es *P. roridum* (Kwon *et al.*, 2014). En este mismo país, Kim *et al.* (2003) reportan por primera vez a *P. roridum* como agente causal de manchas foliares en sandía (*Citrullus vulgaris*).

Haudenshield *et al.* (2018) dan a conocer por primera vez a *P. roridum* en soya (*Glycine max*) cultivada en África.

En un estudio realizado en la India dirigido a semillas de sandía variedad *Arka Manik* y *Sugar Baby* con la finalidad de identificar agentes causales de pudrición, se encontró alta incidencia de *Myrothecium roridum*, el cual producía esporodoquios de color verde claro sobre las semillas infectadas (Bharath *et al.*, 2006).

A nivel mundial se había documentado a *Myrothecium roridum* como patógeno de una amplia gama de hospedantes entre las angiospermas y faltaba registro de daños en las gimnospermas, pero en 2009 se informa sobre daños en hojas con formaciones de anillos concéntricos y presencia de esporodoquios de color verde oscuro a negro en pino de corteza blanca (*Pinus albicaulis*) (Worapong *et al.*, 2009).

Los informes sobre *P. roridum* a través de los años en diferentes países sobre los daños que ocasiona en distintas especies de plantas, sugieren que es consecuencia del cambio climático, propiciando condiciones óptimas para la infección de este patógeno, o bien, es el resultado de una coevolución de subespecies o razas específicas con otras especies vegetales que facilitan un surgimiento de una gama más amplia de hospedantes (Kim *et al.*, 2003; Worapong *et al.*, 2009).

1.3.4. Síntomas de la enfermedad

Los síntomas de la mancha foliar en plántulas de viveros se observan en hojas, tallos y raíces. En hojas las lesiones iniciales causan pequeños puntos circulares

de color marrón a marrón oscuro con márgenes amarillos en el haz y envés, que al transcurrir el tiempo se extiende gradualmente tornándose de color café oscuro. Estos puntos se vuelven más grandes formando anillos concéntricos y posteriormente se van uniendo para formar parches o manchas necróticas irregulares que alcanzan 1.5 a 3.0 mm de diámetro o hasta cubrir toda la hoja. Los signos en la hoja son los esporodoquios de color negro producido en la superficie del envés de la hoja. Al avejentarse, las lesiones, el tejido vegetal dañado se desprende durante la temporada de lluvias formando un agujero (Da Silveira *et al.*, 2007; Pelayo *et al.*, 2017; Ranjini y Raja, 2018; Ruiz *et al.*, 2020; CABI, 2021; Wu *et al.*, 2021).

En tallo, los síntomas son la coloración grisácea en varios puntos de tejido hasta que finalmente provoca el estrangulamiento en el cuello o cancro, como consecuencia de la infección a las plantas por medio de esporas. En el tallo se forman llagas de color negro y ocurre un posterior marchitamiento. Como signos, se ha observado la formación de esporodoquios rodeados de abundante micelio blanco, lo cual facilita la dispersión del inoculo por salpique, mediante el riego por aspersión, lluvia o por el viento en los campos de cultivo (Urhan, 1951; Ranjini y Raja, 2018; Ruiz *et al.*, 2020).

En las raíces, los síntomas se aprecian como pudrición de la raíz pivotante y reducción significativa del sistema radical. Existen casos en que las plantas infectadas tienen follaje vigoroso gracias a la fertilización foliar, sin embargo, su sistema radical es muy pobre. Estas plántulas pueden llegar a establecerse en campo, pero sus probabilidades de éxito para superar el estrés del postrasplante, sequía y condiciones del ambiente durante el proceso de producción agrícola es mínima (Bautista y Rodríguez, 1996; Rodríguez *et al.*, 1996; Monroig *et al.*, 2002; Rojo, 2014).

En el caso de las semillas depositadas directamente en el suelo, se produce necrosis y, aunado a esto, existe la presencia de toxinas y enzimas producidas por el patógeno que inhiben la germinación (Ruiz *et al.*, 2020).

1.3.5. Condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad

Las lluvias prolongadas y la alta humedad relativa (mayor a 60 %) favorece la incidencia y severidad de la enfermedad. Suelos muy húmedos y mal drenados; hojas con película de agua, rocío permanente y escasa luz, son sitios de elevada infección (Loría, 2021). La temperatura óptima para su desarrollo es de 27 °C pero en temperaturas superiores a 30 °C el crecimiento es inhibido. Este patógeno puede crecer normalmente en un amplio rango de pH, aunque su crecimiento se reduce en medios muy ácidos con pH de 2.8 (Urhan, 1951; Sajjad *et al.*, 2017). Al germinar, los conidios producen hifas, las cuales se aglomeran constituyendo el micelio. Después, se forman los esporodoquios que ocasionan los síntomas como el estrangulamiento en el tallo y mancha foliar (Ulate, 2019).

1.3.6. Cualidades de *Paramyrothecium roridum*

Los hongos endófitos tienen la capacidad de asociarse simbióticamente con las plantas sin mostrar ningún síntoma de enfermedad. Por el contrario, estos organismos son una fuente de productos bioactivos naturales o metabolitos secundarios que tienen una fuerte actividad antifúngica y antibiótica. Las especies del género *Myrothecium* spp. son un grupo de hongos cosmopolitas que se encuentran en todo el mundo y la mayoría son endófitos (Frohlich y Hyde, 1999; Hyde, 2008; Lin *et al.*, 2010).

Isaka *et al.* (1999) reportan propiedades citotóxicas de los tricotecenos y sus análogos macrólidos producidos por la especie *Myrothecium verrucaria* con alta actividad antipalúdica o antimalaria. Por su parte, Amagata *et al.* (2003) refieren la presencia de micotoxinas tales como el acetato de roridina E, roridina A, verrucarina A, verrucarina J (tricotecenos macrocíclicos), con actividad antimalaria o antipalúdica los cuales se obtuvieron de aislados de raíz del árbol blanco (*Vatica mangachapoi*).

Además de ser reportado a *P. roridum* como patógeno en algunos cultivos, Liu *et al.* (2005) encontraron de este género más de 50 compuestos bioactivos, algunos

metabolitos aislados con actividad antifúngicos fueron: roridina A, verrucarina A, 8 β -acetoxi-roridina H, cerevisterol, N-fenil- β -amino-naftaleno (tricotecenos macrocíclicos).

Los metabolitos obtenidos del género *Myrothecium* spp. tienen un gran potencial en el tratamiento de pacientes que padecen infecciones fúngicas secundarias de enfermedades como el SIDA, cáncer de hígado y tumores hepáticos (Liu *et al.*, 2005).

En un trabajo realizado en Nigeria por Okunowo *et al.* (2010) se identificó a *M. roridum* como un agente de control micoherbicida potencial sobre la maleza acuática nociva conocida como Jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*).

Dong *et al.* (2015) evalúan a *Myrothecium verrucaria* contra el nematodo agallador (*Meloidogyne hapla*) de hortalizas encontrando que, en las etapas de huevo, juvenil y adulto, los efectos resultan letales (22–71 % de mortalidad).

En este contexto, Turhan y Grossmann (1994), conjuntamente con Murakami *et al.* (1998) informan que *M. roridum* produce toxinas en medio de cultivo demostrando que estas toxinas tienen efecto antibiótico potencial contra una amplia gama de bacterias y hongos tales como: *Bacillus subtilis*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum dematium*, *Rosellinia necatrix*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Diaporthe nomurai* y *Cochliobolus miyabeanus*.

Al menos ocho especies del género *Myrothecium*, incluidas *M. gramineum*, *M. roridum* y *M. verrucarium*, podrían controlar varias malezas en campo teniendo gran potencial como bioherbicida en sistemas de producción. Por ejemplo, *M. verrucaria* ha sido estudiada como un potencial agente de biocontrol para *Lygodium microphyllum*, *Taraxacum officinale*, *Amaranthus hybridus*, *A. spinosus* y *A. lividus*. La especie *M. roridum* puede ser oportunista y puede causar graves daños en hojas y tallos (Yang y Brenner. 1997; Walker y Tilley, 1997; Boyette *et al.*, 2002; Boyette *et al.*, 2007; Clarke *et al.*, 2007).

Las enzimas documentadas obtenidas del género *Paramyrothecium* tienen uso biotecnológico en la industrias alimentaria y farmacéutica, industrias papeleras, conversión de biomasa de residuos agrícolas e industriales a materias primas químicas, biocombustibles y alimentos para animales (Zaldiva, 2001; Ikram *et al.*, 2006; Tarek y Nagwa, 2007; Acharya *et al.*, 2008).

1.3.7. Manejo integral de *Paramyrothecium roridum*

La enfermedad de la mancha foliar del cafeto causado por *P. roridum* también se ha identificado en muchos cultivos, pero actualmente hay pocos estudios realizados relacionados con su manejo. Todo parece indicar que la incidencia y severidad de esta enfermedad se incrementa en diferentes regiones cafetaleras del mundo, en parte debido al conocimiento limitado de los productores sobre el manejo y confusión en la identificación correcta de síntomas y signos del patógeno.

Control químico

Al momento de la aparición de este patógeno, podría controlarse aplicando fungicidas protectores, a base de cobre (Hidróxido de Cobre), ditiocarbamato de sodio y dietilditiocarbamato (Monroig *et al.*, 2002; Da Silveira *et al.*, 2007).

En trabajos realizados a nivel almácigos de cafeto en Costa Rica, Loría (2021), evalúa fungicidas contra *M. roridum*, como óxido cuproso, piraclostrobina + epoxiconazol, azoxistrobin y piraclostrobina, obteniendo eficacias de 20, 17, 17, y 9 %, respectivamente. Este autor recomienda que cuando se tenga el problema en hojas, se debe aplicar fungicidas protectores como sulfato de cobre y estrobilurinas cada 15 días en épocas de lluvia.

Con la finalidad de generar un mejor manejo para la enfermedad de la mancha foliar causada por *M. roridum* en la India, Daivasikamani *et al.* (2013) ensayan siete fungicidas en condiciones *in vitro* e *in vivo*. De los siete fungicidas, el mayor porcentaje de inhibición se registró con tebuconazol (0.05 % i. a) con 90 % de inhibición, seguido del mismo ingrediente activo a una dosis de 0.025 % con 84.3

% y propiconazol (0.05 % i. a) con 83.9 %. Sin embargo, los fungicidas como metiram, triadimefon, fosetil-al, inhiben el crecimiento del patógeno únicamente en 18.30, 19.70 y 34.07 %, respectivamente. En invernadero los resultados indicaron que tanto tebuconazole (0.02 % y 0.03 % de i. a) como propiconazole (0.02 % y 0.03 % de i. a) resultan significativamente superiores al resto de los fungicidas.

McMillan (2010) evaluando la eficacia a nivel *in vitro* de seis fungicidas contra *M. roridum*, agente causal de la mancha foliar de la planta ornamental conocida como Loteria (*Dieffenbachia picta* Schott cv. *compacta*). Los resultados mostraron que todos los fungicidas probados tuvieron efectos significativos en el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial. Los fungicidas Pageant (piraclostrobina), fludioxonil, Insignia (piraclostrobina), y azoxystrobin producen los mejores resultados con 94.9, 94.3, 94.6, 94.3 %, respectivamente, seguidos de clorotalonil (87.4 %), iprodiona (84.6 %) y trifloxystrobin (42.2 %).

Quezado *et al.* (2010) al probar algunos fungicidas en condiciones *in vitro* contra *M. roridum*, registran crecimiento micelial del patógeno durante 7 días. Los fungicidas como el sulfato de cobre, tebuconazol, hidroxido de cobre, la mezcla de dietilditiocarbamato más sulfato de cobre y amonio cuaternario generan los mejores resultados al inhibir el crecimiento micelial en un rango de 80 a 100 %.

Sajjad *et al.* (2017) evalúan fungicidas a nivel *in vitro* contra *M. roridum*, identificado como agente causal de mancha foliar en calabaza amarga. Los fungicidas evaluados fueron propineb, piraclostrobina + metiram, tebuconazole + trifloxistrobina, tiofanato metílico y difenoconazol en concentraciones de 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, se encuentra que difenoconazol influye mayor porcentaje de inhibición en el crecimiento micelial con un 49 %, seguido de tebuconazole + trifloxistrobina y tiofanato metílico con valores de 48 y 47 %, respectivamente. Por su parte, Propineb fue el menos efectivo con un valor de 22 % de inhibición, seguido de piraclostrobina + metiram con 28 %.

Control cultural

Las prácticas culturales desempeñan un papel determinante en el manejo integral de la enfermedad. De manera preventiva diferentes autores recomiendan iniciar con la selección de semilla libre de enfermedades, certificada; y en la elaboración de semilleros, con buena desinfección de la cama de germinación y de las bolsas de almácigo o el suelo. Evitar el exceso de riego, particularmente por las noches, reducir encharcamientos y minimizar la escorrentía o salpique. Regular exceso de sombra; facilitar la buena ventilación, evitando ambientes cerrados y de alta humedad, tener buena separación de bolsas y plantas y finalmente monitorear con supervisiones periódicas (Monroig *et al.*, 2002; Loría, 2021). Cuando la enfermedad se ubica en las hojas, se recomienda la poda de ramas y eliminación de hojas. En caso de estar presente en tallo, se recomienda eliminar las plantas afectadas y no llevarlas a campo (Da Silveira *et al.*, 2007; Loría, 2021).

En campo, utilizar la densidad de plantación adecuada, comenzando por seleccionar rigurosamente la plántula para el trasplante y no usar plántulas ubicadas a 25 cm del foco de infección (Monroig *et al.*, 2002).

En el caso de injertación, las plantas infectadas deben eliminarse y quemarse. Además, la navaja de injertar debe desinfestarse con algodón empapado con alcohol después de cada injerto a fin de prevenir la diseminación del hongo por medio de las herramientas. Por otra parte, se recomienda usar siempre papel parafinado nuevo para proteger los injertos y evitar que sea una posible fuente de infección (Urhan, 1951).

Control Orgánico

El uso de fungicidas químicos puede tener un efecto negativo en la calidad del producto y salud del productor, además de una inminente contaminación ambiental. Por ello, existe la necesidad de generar nuevas formas de manejo de enfermedades fúngicas que sean, eficientes, efectivas, económicas y amigables con el medio ambiente. Actualmente hay poca información de la actividad

antifúngica o actividad alelopática de plantas en el manejo de patógenos a fin de generar nuevas estrategias para el manejo integrado de la enfermedad (Vyvyan, 2002).

A continuación, se mencionan algunos trabajos reportados a nivel mundial que proporciona una excelente alternativa:

En México, Ruiz *et al.* (2020) aplicando la bioprospección para búsqueda de metabolitos secundarios, trabajan con el arbusto llamado escoba (*Baccharis conferta*); los metabolitos secundarios obtenidos se evaluaron como fungicida en condiciones *in vitro* contra *Myrothecium roridum* y se reporta inhibición del crecimiento micelial en 11.6 % de este patógeno con el extracto de las flores femeninas en la fenofase anthesis de *B. conferta* a una concentración de 10 mg.

En Pakistan, Naz *et al.* (2015) evalúan, mediante la técnica de medio envenenado, extractos acuosos de cenizo o quihuilla (*Chenopodium album* L), escoba (*Parthenium hysterophorus* L), verdolaga de caballo (*Trianthema portulacastrum* L), malva rizada (*Malvestrum coromandelianum* L), yerba del ciervo (*Coronopus didymus* L), cardo globo indio oriental (*Sphaeranthus indicus* L), falso amaranto (*Digera muricata* L), hierba mora (*Solanum nigrum* L) y tabaco Tex-Mex (*Nicotiana plumbaginifolia*) contra *Myrothecium roridum*, agente causal de mancha foliar de la calabaza amarga. El mejor extracto resultante fue Tabaco Tex-Mex que inhibe el crecimiento micelial en 88 %, seguido de la hierba llamada escoba con 71 %; la hierba mora, yerba de ciervo, cardo globo indio oriental y la verdolaga de caballo inhiben 66, 65, 64 y 60 %, respectivamente, por el contrario, falso amaranto inhibe 11 %.

En Veracruz, México, Bravo *et al.* (2018) hacen pruebas *in vitro* con extractos metanólicos de corteza y hojas de ocho árboles de neem (*Azadirachta indica*) contra *M. roridum*, causante de la enfermedad de la mancha foliar en cafeto y tomate. Los resultados mostraron efecto fungicida del extracto metanólico de corteza roja a una concentración de 10 000 µg ml⁻¹ de medio de cultivo inhibiendo el 100 % del crecimiento micelial de este hongo.

Abid *et al.* (2017) utilizan extractos etanólicos de cinco plantas medicinales como el mango (*Mangifera indica*), árbol del paraíso (*Melia azedarach*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), moringa (*Moringa oleífera*) y eucalipto azul (*Eucalyptus globulus*) para evaluar sus efectos antifúngicos a nivel *in vitro* contra *M. roridum*, mediante la técnica de difusión en agar y prueba de las concentraciones 0.01, 0.10, 1.0 y 10.0 µg mL⁻¹; los resultados indican que el tabaco inhibe el mayor crecimiento con 13.40 y 8.28 mm, seguido del árbol del paraíso (9.00 y 6.48 mm) y la inhibición más baja se obtuvo con eucalipto azul (6.04 y 3.88 mm). El análisis fitoquímico de las plantas seleccionadas revela riqueza en alcaloides, terpenoides, flavonoides y fenoles.

Control biológico

El control biológico de las enfermedades fúngicas en plantas cada vez ha tenido mayor relevancia durante los últimos diez años; en todo el mundo se han comercializado más de 80 productos de control biológico donde se incluye a *Coniothyrium minitans*, especies de *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Streptomyces* y *Bacillus*, relacionados con el manejo de patógenos como *Sclerotinia*, *Pythium*, *Rhizoctonia* spp. y *Fusarium* spp. El uso de agentes biológicos tiene un potencial prometedor, dentro de una estrategia de manejo integral para el manejo de enfermedades foliares, tallos, raíces y frutos en varios cultivos y en el futuro podría predominar sobre los pesticidas químicos (Dechassa, 2019; Loría, 2021).

Fujinawa *et al.* (2020) evalúan en condiciones *in vitro* y mediante la técnica de cultivos apareados, el antagonismo de *Trichoderma asperellum* y *Gliocladium roseum*, contra *M. roridum*, patógeno aislado de Begonia, y para ello se analizan compuestos volátiles, competencia por colonización y parasitismo. Tanto *Gliocladium* como *Trichoderma* producen compuestos volátiles en medio de cultivo, inhibiendo el desarrollo de *M. roridum* con 26 y 23 %, respectivamente.

Promwee e Intana (2022) en un estudio *in vitro* para evaluar la efectividad de una cepa nativa de *Trichoderma asperellum* contra *Cercospora lactucae-sativae* de

lechuga tailandesa muestra que *T. asperellum* inhibe el crecimiento micelial del patógeno en un 72.5 %.

Galleti *et al.* (2008) evaluaron *in vitro* a *Trichoderma hamatum* contra *Cercospora beticola* Sacc. Y reportan un valor de inhibición del crecimiento micelial de 63.5 %.

Machado y Menezes (1997) ensayan seis aislados de *Trichoderma*: *T. koningii* (T15), *T. harzianum* (T25), *T. viride* (TR2, TM, TPET y TSM) aplicados individualmente y en mezcla contra *M. roridum*, un nuevo patógeno que causa cancro en la base del tallo y fruto del melón. La acción de los antagonistas se evaluó mediante el tratamiento de semillas utilizando suspensión de esporas empleando dos métodos; con el método de aspersión se detectan mejores antagonistas T25 (100 % de inhibición), TM y TSM (90 %) y TPET (75 %), pero por inmersión los mejores tratamientos resultantes T25 (100% de inhibición), TPET (95 %), TM (85 %) y TSM (85 %).

Vitale *et al.* (2012) provando la cepa T22 de *Trichoderma harzianum* como agente de biocontrol de la pudrición de cuello y raíz causada por *Calonectria pauciramosa*, agente causal en clavel, evalúan la producción de microesclerocios y destacan que este antagonista inhibe 23 % la formación de esta estructura de supervivencia del patógeno.

Aunque *Trichoderma* spp. se ha evaluado en condiciones *in vitro* contra diferentes patógenos y con buenos resultados, pero son pocos los trabajos realizados contra *Paramyrothecium roridum*, causante de la mancha foliar en cafetos.

2.0. LITERATURA CITADA

- Abid, M., Chohan, S., Mehmood, M. A., Naz, S., and Naqvi, S. A. H. (2017). Antifungal potential of indigenous medicinal plants against *Myrothecium* leaf spot of bitter gourd (*Momordica charantia* L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 60(0): e17160395. doi:10.1590/1678-4324-2017160395.
- Acharya, P. B., Acharya, D. K., Modi, H. A. (2008). Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using saw dust as substrate. *African Journal of Biotechnology* 7(22): 4147-4152.
- Amagata, T., Rath, C., Rigot, J. F., Tarlov, N., Tenney, K., Valeriotte, F. A., Crews, P. (2003). Structures and cytotoxic properties of trichoverroids and their macrolide analogues produced by saltwater culture of *Myrothecium verrucaria*. *Journal of Medicinal Chemistry* 46:4342–4350. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm030090t>.
- Bautista, P. F. y Rodríguez, R del P. (1996). Dinámica poblacional de *Myrothecium roridum* Tode ex. Fr y *Rhizoctonia solani* Kühn en viveros comerciales de cafetos. *Journal Agriculture. Univ. P. R* 80 (3): 145-156.
- Bharath, B. G., Lokesh, S., Yashovarma, B., Prakash, H. S., Shetty, H. S. (2006). Seed-borne nature of *Myrothecium roridum* in watermelon seeds. *Research Journal of Botany* 1: 44-45. DOI: 10.3923/rjb.2006.44.45. <https://scialert.net/abstract/?doi=rjb.2006.44.45>.
- Boyette, C. D., Hoagland, R. E. and Abbas, H. K. (2007). Evaluation of the bioherbicide *Myrothecium verrucaria* for weed control in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Biocontrol Science Technology*. 17:171-178.
- Boyette, C. D., Walker, H. L. and Abbas, H. K. (2002). Biological control of kudzu (*Pueraria lobata*) with an isolate of *Myrothecium verrucaria*. *Biocontrol Science Technology*. 12:75-82.
- Bravo, R. O., Alarcón, G E., Cen, P. F. A., Sánchez, V. L. R., Villanueva, J. J. A. (2018). Extractos de *Azadirachta indica* con potencial fungicida sobre *Myrothecium roridum*. V Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina III Simposio Nacional de Microbiología Aplicada. file:///C:/Users/erysi/Downloads/admin,+Extractos+de+Azaradicta+indica.pdf.
- CABI. (2021). Centre for Agricultural Bioscience International: *Myrothecium roridum* (blight: eggplant). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/35576#toidentity> (Consulta, marzo 2022).
- Cabral, C. S., Henz, G. P., Moreira, A. J. A., Reis, A. (2009). New cucurbitaceous hosts of *Myrothecium roridum* in Amazonas State, Brazil. *Tropical Plant Pathology* 34: 402-405. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1982-56762009000600006>.
- Catalogue of Life. (2022). *Paramyrothecium roridum* (Tode) L. Lombard & Crous. <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/6TPCY> (Consulta, marzo 2022).

- Chalchissa, F.B., Diga, G.M., Tolossa, A. R. (2022). Modeling of the responses of Coffee (*Coffea arabica* L.) distribution to current and future climate change in Jimma Zone, Ethiopia. *Sains Tanah Journal of Soil Science and Agroclimatology* 19(1): 19-32. <https://dx.doi.org/10.20961/stjssa.v19i1.54885>.
- Clarke, T. C., Shetty, K. G., Jayachandran, K. and Norland, M. R. (2007). *Myrothecium verrucaria*-a potential biological control agent for the invasive old world climbing fern (*Lygodium microphyllum*). *BioControl* 52:399-411.
- Da Silveira, S. F., Mussi, D. V., De Ponte, E. C., Pedro Paulo, D. P. (2007). Mancha de Mirotécio em Mudras de Cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 32(5). <https://www.scielo.br/j/fb/a/RK5WHyQNK3LDMbpbGDvn8jM/?lang=pt#>.
- Daivasikamani, S., Shyam, S., Ranjini, A. P., Sudhakar., Bhat, S., Jayarama. (2013). Screening of fungicides against *Myrothecium roridum* causing stem necrosis and leaf spot disease of coffee seedlings. *Journal of Coffee Research* (41): 92-101. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20143262147>.
- De Nadai Fernandes, A. E., Mazola, T. Y., De Lima, C. R., Furlan, N. G., Bacchi, A. M., Sarriés, A. G. (2022). Machine learning to support geographical origin traceability of *Coffea Arabica*. *Advances in Artificial Intelligence and Machine Learning* 2(1):18.
- Dechassa, N. (2019). Occurrence, distribution, biology and management of coffee thread blight (*Corticium koleroga* (Cke) Hoehnel): A Review. *Journal of Environment and Earth Science* 9(2): 6 p. ISSN 2224-3216 (Paper) ISSN 2225-0948 (Online). <https://core.ac.uk/download/pdf/234665404.pdf>.
- Dong, H., Zhou, X. G., Wang, J., Xu, Y., Lu, P. (2015). *Myrothecium verrucaria* strain X-16, a novel parasitic fungus to *Meloidogyne hapla*. *Biological Control* 83: 7–12. doi: 10.1016/j.biocontrol.2014.12.016. <https://sci-hub.se/10.1016/j.biocontrol.2014.12.016>.
- EPPO. (2002). Organización Europea y Mediterránea para la Protección Vegetal: *Paramyrothecium roridum*. <https://gd.eppo.int/taxon/MYRORO> (Consulta, marzo 2022).
- FAOSTAT. (2020). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL> (Consulta, marzo 2022).
- Frohlich, J., y Hyde, K. D. (1999). Biodiversity of palm fungi in the tropics: ¿are the global fungal biodiversity estimates realistic? *Biodivers Conservation* 8:977–1004.
- Galletti, S., Burzi, P. L., Cerato, C., Marinello, S., Sala, E. (2008). *Trichoderma* as a potential biocontrol agent for *Cercospora* leaf spot of sugar beet. *BioControl* 53: 917–930. <https://doi.org/10.1007/s10526-007-9113-1>.
- GBIF. (2021). Global Biodiversity Information Facility: *Paramyrothecium roridum* (Tode) L.Lombard & Crous in GBIF Secretariat GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> (Consulta, abril, 2022).
- Haudenschild, J. S., Pawlowski, M., Miranda, C., Hartman, G. L. (2018). First report of *Paramyrothecium roridum* causing *Myrothecium* leaf spot on

- soybean in Africa 102(12). ISSN: 0191-2917.
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-04-18-0624-PDN>.
- Hindorf, H., Omondi, O. C. (2011). A review of three major fungal diseases of *Coffea arabica* L. in the rainforests of Ethiopia and progress in breeding for resistance in Kenya. *Journal of Advanced Research* (2): 109-120.
- Huaman, A., Torres, M., Ramírez, G., Leiva, S., Sánchez, T., Oliva, S. (2021). Caracterización morfológica de hongos asociados al agroecosistema café (*Coffea arabica* L.), en el Estado de Tabasco, México. *Revista Pakamuros* (9): 44-58. DOI: <https://doi.org/10.37787/pakamuros-unj.v9i3.217>.
- Hyde, K. D., Soyong, K. (2008) The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers* 33:163–173. https://www.researchgate.net/profile/Kevin-Hyde-3/publication/261401775_The_fungal_endophyte_dilemma/links/57eb437808aeafc4e88a5ea1/The-fungal-endophyte-dilemma.pdf.
- ICO. (2019). Organización Internacional del Café. Informe del ICO sobre desarrollo cafetero. Crecer para prosperar: viabilidad económica como catalizador de un sector cafetero sostenible. <http://www.ico.org/documents/cy2018-19/ed-2318c-overview-flagship-report.pdf> (Consulta, febrero, 2022).
- IICA. (2016). Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. La Situación y tendencias de la producción de café en América Latina y el Caribe. ISBN: 978-92-9248-651-8. 70 p. <http://iica.int> (Consulta, febrero 2022).
- Ikram, U. H., Javed, M. M., Siddiq, Z., Saleem, T. (2006). Triggering of β -glucosidase Production in *Trichoderma viride* with Nutritional and Environmental Control. *Journal of Applied Sciences Research* 2(11): 884-889.
- Isaka, M., Punya, J., Lertwerawat, Y., Tanticharoen, M., Thebtaranonth, Y. (1999) Antimalarial activity of macrocyclic trichothecenes isolated from the fungus *Myrothecium verrucaria*. *Journal of Natural Products* 62:329–331.
- Jayanna, N. B., Kim, S., Seenayah, R., Akabar, B. P., Young, S. E. (2021). Coffee cultivation techniques, impact of climate change on coffee production, role of nanoparticles and molecular markers in coffee crop improvement, and challenges. *Journal of Plant Biotechnology* 48:207–222. DOI: <https://doi.org/10.5010/JPB.2021.48.4.207>.
- Kim, D. K., Bae, D. W., Lee, S. C., Han, K. S., Kim, H. K. (2003,). Detection of *Myrothecium* leaf spot, a new disease of watermelon. *The Plant Pathology Journal. Korean Society of Plant Pathology* 19(4): 200-202. <https://doi.org/10.5423/ppj.2003.19.4.200>.
- Kwon, H. W., Kim, J. Y., Choi, M. A., Son, S. Y., & Kim, S. H. (2014). Characterization of *Myrothecium roridum* Isolated from imported Anthurium plant culture medium. *Mycobiology* 42(1): 82–85. doi:10.5941/myco.2014.42.1.82.
- Liang, J., Li, G., Zhou, S., Zhao, M., Cai, L. (2019). *Myrothecium*-like new species from turfgrasses and associated rhizosphere. *MycKeys* 51: 29–53. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.51.31957>.
- Lin, X., Huang, Y., Zheng, Z., Su, W., Quiang, X., Shen, Y. (2010) Endophytes from the pharmaceutical plant, *Annona squamosa*: isolation, bioactivity,

- identification and diversity of its polyketide synthase gene. *Fungal Divers* 43:41–51. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13225-010-0017-5>.
- Liu, J. Y., Huang, L. L., Ye, Y. H., Zou, W. X., Guo, Z. J., Tan, R. X. (2005) Antifungal and new metabolites of *Myrothecium* sp. Z16, a fungus associated with white croaker *Argyrosomus argentatus*. *Journal of Applied Microbiology* 100:195–202.
- Loría, V. D. (2021, 22 de abril). *Myrothecium*, enfermedad silenciosa en almácigos de café [Video]. YouTube. <https://youtu.be/KHrbzCJeGUw>.
- Machado, M. do C. V., Menezes, M. (1997). Efeito de *Trichoderma* no biocontrole de *Myrothecium roridum* e na germinação de sementes de melão e caracterização isoesterásica do antagonista. *Cadernos Ômega*, Recife, n. 10, p. 49-58. <https://repository.ufrpe.br/handle/123456789/640>.
- McMillan, R. T. Jr. (2010). Efficacy of fungicides for the control of *Myrothecium roridum* on *Dieffenbachia picta* 'compacta'. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 123: 302–303.
- Moat, J., Williams, J., Baena, S., Wilkinson, T., Gole, T.W., Challa, Z.K., Demissew, S., Davis, A.P. (2017). Resilience potential of the Ethiopian coffee sector under climate change. *Nature Plants* 3: 1-14.
- Monroig, I. M., Almodóvar, W., O'Farrill, H., Ada N Alvarado, O. A. N. (2002). Crop Profile for Coffee in Puerto Rico. 15 p. <https://ipmdata.ipmcenters.org/documents/cropprofiles/PRcoffee.pdf>
- Mulatu, A., Megersa, N., Abena, T., Kanagarajan, S., Liu, Q., Alemu T., and Vetukuri, R. R. (2022). Biodiversity of the Genus *Trichoderma* in the Rhizosphere of Coffee (*Coffea arabica*) Plants in Ethiopia and their Potential Use in Biocontrol of Coffee Wilt Disease 1(1):39.
- Muñoz, R., M., Gómez, P. D., Santoyo, C. V. H., y Rosales, L. R. (2019). Los negocios del café ¿Cómo innovar en el contexto de la paradoja del café, en pro de una red de valor más inclusiva y accesible? México: Universidad Autónoma Chapingo, CIESTAAM. <http://ciestaam.edu.mx/publicaciones2018/libros/negocios-del-cafe.pdf>.
- Murakami, R., Shirata, A., Inoue, H. (1998). A selective medium containing the toxins of *Myrothecium roridum* for isolation from soil. *The journal of sericultural science of Japan* 67(5): 381-387.
- Naz, S., Khan, S.N., Mohy-Ud-Din, G., and Farooq, S. (2015). *In vitro* fungicidal activity of aqueous extracts of crop and wasteland weeds against *Myrothecium roridum* Tode. *Pak. Journal of Research in Weed Science* 21(3): 369-379.
- Okunowo, W. O., Gbenle, G. O., Osuntoki, A. A., Adekunle, A. A., Ojokuku, S. A. (2010). Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by a phytopathogenic *Myrothecium roridum* and some avirulent fungal isolates from water hyacinth. *African Journal of Biotechnology* 9: 1074–1078. <https://doi.org/10.5897/AJB09.1598>.
- Pelayo, S. G., Yañez, M. M. J., and Solano, V. R. (2017). First report of leaf spot on *Coffea arabica* caused by *Paramyrothecium roridum* in México. *Plant Disease Notes* 101(6). <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-16-1588-PDN>.
- Promwee, A., Intana, W. (2022): *Trichoderma asperellum* (NST-009): A potential native antagonistic fungus to control *Cercospora* leaf spot and promote

- the growth of 'Green Oak' lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivated in the commercial NFT hydroponic system. *Plant Protection Science*. 58: 139–149. <https://doi.org/10.17221/69/2021-PPS>.
- Quezado, D., G.P. Henz, M.L. Paz-Lima, A.R. Medeiros, B.E.C. Miranda, L.H. Pfenning and A. Reis. (2010). New hosts of *Myrothecium* spp. in Brasil and a preliminary *in vitro* assay of fungicides. *Braz. J. Microbiol* 41: 233-240.
- Ranjini, A. P. y Raja N. A. (2018). Leaf spot and stem necrosis disease of coffee seedlings caused by *Myrothecium roridum* Tode ex Fr. in India. *Journal of Mycopathological Research* 56(1): 5-10, 2018; (ISSN 0971-3719). Indian Mycological Society, Department of Botany, University of Calcutta, Kolkata 700 019. https://www.researchgate.net/profile/Ap-Ranjini-2/publication/348928597_Leaf_spot_and_stem_necrosis_disease_of_Coffee_seedlings_caused_by_Myrothecium_roridum_Tode_ex_Fr_in_India/links/601780d792851c2d4d0a9263/Leaf-spot-and-stem-necrosis-disease-of-Coffee-seedlings-caused-by-Myrothecium-roridum-Tode-ex-Fr-in-India.pdf.
- Ranjini, A. P. and Raja, N. (2019). Efficacy of biocontrol agents on *Myrothecium roridum*, the stem necrosis and leaf spot pathogen of coffee seedlings. *Journal of Biopesticides* 12(1):109-113.
- Rodríguez, R del P., Sanches, L., Gonzales, W., Bosques, O. (1996). Patogenicidad de *Myrothecium roridum* y *Rhizoctonia solani* en cafetos en el vivero. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 80 (3): 135- 143.
- Rojo, J. E. (2014). *Café I (G. Coffea)*. Departamento Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal) Facultad de Biología, Universidad Complutense. Madrid. *Serie Botánica* 7(2): 113-132.
- Ruiz, G. M. G., Cen, P. F. A., Pineda, L. M. del R., Bravo, R. O., Alarcón, G. E., Sánchez, V. L. R. (2020). Bioprospección modulada por la fenología, el sexo y el gradiente altitudinal: el caso de *Baccharis conferta* sobre *Myrothecium roridum* y *Alternaria solani*. *Botanical Sciences* 98(3): 473-486. 2020. DOI: 10.17129/botsci.2582.
- SADER. (2019). Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural: Vigilancia Epidemiológica en el cultivo de cafeto. 83 p. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/525454/Informe_Final_P_SIA_2018_Chiapas_VE_Cafeto.pdf (Consulta, abril 2022).
- Sajjad, H., Iqbal, M., Rehman, A., Muhammad, W. A., Mehboob, S., Muhammad. (2017). Varietal response of bitter gourd germplasm against *Myrothecium roridum* tode ex. fr. causing *myrothecium* leaf spot disease and its chemosynthetic management. *Pakistan Journal of Phytopathology* 29(01): 129-135. file:///C:/Users/erysi/Downloads/361-2197-2-PB.pdf.
- Scalabrin, S., Toniutti, L., Di Gaspero, G., Scaglione, D., Magris, G., Vidotto, M., Pinosio, S., Cattonaro, F., Magni, F., Jurman, I., Cerutti, M., Suggi, L. F., Navarini, L., Del Terra, L., Pellegrino, G., Rosanna, R. M., Vitulo, N., Valle, G., Pallavicini, A... Bertrand, B. (2020). A single polyploidization event at the origin of the tetraploid genome of *Coffea arabica* is responsible for the extremely low genetic variation in wild and cultivated germplasm. *Scientific Reports*, 10(1): 4642. doi:10.1038/s41598-020-61216-7.

- SENASICA. (2016). Ojo de gallo (*Mycena citricolor* Berkeley). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria - Dirección General de Sanidad Vegetal. Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Cd. de México. Ficha Técnica No.49. 8 p. (Consulta, abril 2022).
- SENASICA. (2016). Mancha de hierro (*Mycosphaerella coffeicola* Meyrick). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria- Dirección General de Sanidad Vegetal - Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Cd. de México. Última actualización: Abril, 2016. Ficha Técnica No. 46. 8 p. (Consulta, abril 2022).
- SENASICA. (2016). Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome). Dirección General de Sanidad Vegetal. Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México, D.F. Ficha Técnica No. 40. 23 p. (Consulta, abril 2022).
- SENASICA. (2016). Quema o derrite del cafeto (*Phoma costarricensis* Echandi). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria- Dirección General de Sanidad Vegetal- Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Cd. de México. Ficha Técnica No.47. 8 p. (Consulta, abril 2022).
- SENASICA. (2018). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria: Manual Técnico Operativo 2018, para la Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria en el Cultivo del Cafeto. 31 p. <https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/ContenidoPublico/Roya%20cafeto/Estrategia%20operativa/ManualOperativoRoyaCafeto.pdf> (Consulta, abril 2022).
- SIAP. (2021). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto. (Consulta, marzo 2022).
- Silva, A., Pinho, D. B., Costa, H., Lopes, A., Pereira, O. L. (2014). First Report of Leaf Spot Caused by *Myrothecium roridum* on *Coffea canephora* in Brasil. Plant Disease 98:1587. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-06-14-0643-PDN>.
- Tarek, A. A. M., Nagwa, A. T. (2007). Optimization of cellulase and β glucosidase induction by sugarbeet pathogen *Sclerotium rolfsii*. African Journal of Biotechnology 6(8): 1048-1054.
- Turhan, G., Grossmann, F. (1994). Antagonistic activity of five *Myrothecium* species against fungi and bacteria *in vitro*. Journal of Phytopathology 140: 97-113.
- Ulate, H. E. (2019). Caracterización de la sintomatología y determinación de los hongos asociados al daño en la base del tallo en plantas de cafeto (*Coffea arabica* A. Chev) cultivar centroamericano. Tesis de licenciatura. Universidad de Costa Rica. 80 p.
- Urhan, O. (1951) Llaga y marchitamiento del cafeto causado por *Myrothecium roridum* Tode. Boletín informativo-Centro Nacional de Investigaciones de café. Colombia. V. 2c(16):33-45. [https://www.cenicafe.org/es/index.php/nuestras_publicaciones/revista_cenicafe/revista_cenicafe_arc002_16_3345#:~:text=Los%20experimentos%](https://www.cenicafe.org/es/index.php/nuestras_publicaciones/revista_cenicafe/revista_cenicafe_arc002_16_3345#:~:text=Los%20experimentos%20)

20demostraron%20que%20el,el%20tallo%20y%20su%20marchitamiento

- Vitale, A., Cirvilleri, G., Castello, I. (2012). Evaluation of *Trichoderma harzianum* strain T22 as biological control agent of *Calonectria pauciramosa*. *BioControl* 57: 687–696. <https://doi.org/10.1007/s10526-011-9423-1>.
- Vyvyan, J. R. (2002). Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron* 58(9): 1631–1646. doi:10.1016/s0040-4020(02)00052-2.
- Walker, H. L. and Tilley, A. M. (1997). Evaluation of an isolate of *Myrothecium verrucaria* from sicklepod (*Senna obtusifolia*) as a potential mycoherbicide agent. *Biological Control* 10:104-112.
- Worapong, J., Joyce, S., Newcombe, G. (2009). First report of *Myrothecium roridum* from a gymnosperm. *North American Fungi* 4: 1-6. ISSN 1937-786X. DOI:<http://dx.doi.org/10.2509/naf2009.004.006>. <https://openjournals.wsu.edu/index.php/pnwfungi/article/view/1050>.
- Wu, W. W., Zhu, M. F., Liang, Y. Q., Bai, X. H., Lu, Y., Xi, J. G., Huang, X., Li, R., Tan, S. B., He, C. P., Yi, K. X. (2021). First Report of *Paramyrothecium breviseta* causing leaf spot disease of *Coffea canephora* in China. The American Phytopathological Society (APS). <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-10-20-2276-PDN>.
- Yang, S. M. and Brenner, D. (1997). Virulence and host range of three species of *Myrothecium* on *Amaranthus* spp. ARS USDA, TEKTRAN, USA.
- Yousaf, B., Rahman, A. U., Sajjad, M., Ahmad, S., Hussain, A., Hussain, M., Jabbar, S. (2018). Risk of *Myrothecium roridum* leaf spot in local cucurbitaceous crops of Pakistan. *JOJ Horticulture & Arboriculture* 2(1): 555577. DOI: 10.19080/JOJHA.2018.01.555577.
- Zaldiva, M., Velasquez, J. C., Contreras, I., Perez, L. M. (2001). *Trichoderma aueviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes; its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. *Electronic Journal of Biotechnology* 4(3): 1-7.

CAPÍTULO II.- CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Paramyrothecium roridum* PARA VERIFICACIÓN COMO AGENTE CAUSAL DE LA MANCHA FOLIAR DE CAFETO EN MÉXICO

2.1. RESUMEN

En un vivero ubicado en el Estado de Chiapas, municipio de Tapachula, se observaron plántulas de cafeto variedad Oro Azteca con síntomas de manchas foliares. El objetivo de este estudio fue caracterizar morfológica y molecularmente al agente causal de la enfermedad, información necesaria para un manejo adecuado. El patógeno aislado se identificó morfológicamente como *Paramyrothecium roridum* y se confirmó con la secuenciación de la región espaciadora interna transcrita (ITS) parcial del ADNr utilizando los iniciadores ITS1 e ITS4. La prueba de patogenicidad mostró que *P. roridum* es un patógeno potencial del cafeto. La información sobre esta enfermedad resulta útil para implementar métodos de manejo en plántulas de cafeto.

Palabras clave: Mancha foliar, plántulas, caracterización, *Paramyrothecium roridum*, Cafeto.

2.2. ABSTRACT

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Paramyrothecium roridum* FOR VERIFICATION AS A CAUSAL AGENT OF COFFEE LEAF SPOT IN MEXICO

In a nursery located in the State of Chiapas, municipality of Tapachula, seedlings of the Oro Azteca coffee tree with symptoms of leaf spots were observed. The objective of this study was to characterize morphologically and molecularly the causal agent of the disease, information necessary for proper management. The isolated pathogen was morphologically identified as *Paramyrothecium roridum* and confirmed by sequencing the partial internal transcribed spacer (ITS) region of the rDNA using primers ITS1 and ITS4. The pathogenicity test showed that *P. roridum* is a potential pathogen of coffee. The information on this disease is useful to implement management methods in coffee seedlings.

Keywords: Leaf spot, seedlings, characterization, *Paramyrothecium roridum*, Coffee tree.

2.3. INTRODUCCIÓN

El café se ha consolidado desde hace muchos años como uno de los productos primarios más valiosos en la economía mundial, tan solo por detrás del petróleo y en su proceso de producción agrícola proporciona empleo a millones de personas (ICO, 2022). En México el cafeto es considerado un cultivo estratégico para su economía, empleando a más de 500 mil productores de 14 entidades federativas y 480 municipios (SADER, 2018; SIAP, 2021). Sin embargo, la producción de café se ha visto afectada por factores abióticos y bióticos, en este último, las enfermedades fúngicas juegan un papel determinante en calidad y rendimiento de la producción del cultivo al infectar al árbol de cafeto, debilitando a las plantas e incluso eliminándolas (CEDRSSA, 2019).

En este contexto, diferentes autores han reportado los daños de hongos fitopatógenos del suelo como *Paramyrothecium roridum* (Tode) L. Lombard y Crous, el cual es un hongo con una amplia gama de hospedantes que asciende a más de 300 especies vegetales como hortalizas, frutales, ornamentales, cultivos extensivos, entre otros (Lombard *et al.*, 2016; Moumni *et al.*, 2020; Soliman, 2020). Conocer las características morfológicas de este patógeno es importante, así como los síntomas y signos que produce en las plantas para su identificación correcta, lo cual es el paso inicial en el plan de manejo por parte de técnicos y productores (Kusai *et al.*, 2015). En adición a la caracterización morfológica, se recomienda utilizar los métodos moleculares como el análisis de secuencias de ADN de la región del espaciador transcrito interno (ITS) y la PCR por ser métodos rápidos y más confiables en la actualidad (El-Kazzaz *et al.*, 2008; Singha, 2016).

En el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo se está trabajando un proyecto sobre desarrollo de innovación tecnológica para control biológico de la roya del café, toda vez que se verifique la identidad del agente causal de la enfermedad y posteriormente se evalúen poblaciones de organismos antagónicos al hongo fitopatógeno.

Con la idea general del proyecto, se visitó un vivero bajo cubierta en Tapachula, Chiapas y se observaron síntomas de manchas foliares en plántulas de cafeto cultivado de la variedad Oro Azteca, coincidentes con características similares reportadas por Pelayo et al. (2017), pero, por rigor científico, no se consideró evidencia suficiente para asumir que el agente causal de los síntomas referidos fuera *P. roridum*, por lo que se planteó recurrir a métodos morfológico y molecular para identificación precisa del agente causal de la enfermedad, toda vez que puede haber incidencia múltiple de organismos causantes de síntomas parecidos a la mancha foliar y necrosamiento en tallos. Con esta base segura, se podría avanzar con otras partes del proyecto.

2.4. MATERIALES Y METODOS

2.4.1. Obtención del agente causal de la mancha foliar

2.4.1.1. Material vegetal

Muestreos dirigidos a plantas sintomáticas en viveros cafetaleros de Tapachula, Chiapas se implementaron, considerando plántulas con necrosis basal del tallo, canchros y/o pudrición de raíces y hojas con manchas foliares. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico y se transportaron al Laboratorio de Patosistemas Vegetales de la Universidad Autónoma Chapingo, en Texcoco, Estado de México.

2.4.1.2. Aislamiento y purificación del patógeno

En laboratorio, cada planta de cafeto se limpió con agua de la llave para eliminar suelo en raíz, tallo y hoja; después se realizaron cortes (1 cm²) de la zona de avance de la enfermedad. Cada porción de tejido se desinfectó con hipoclorito de sodio al 1.5 % (v/v) por 2 min y se eliminó el residuo con agua destilada estéril; posteriormente cada tejido se sembró en cajas Petri con medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar) y se incubaron a 28 ± 2 °C (Esparza, 2009). A las 24 h se tomaron explantes de PDA con crecimiento micelial de la colonia y se transfirieron

a nuevas cajas Petri. Los aislamientos obtenidos se dejaron desarrollar durante 12 días para proseguir con el reaislamiento y purificación mediante la técnica de cultivo monospórico o punta de hifa (Waller, 2002).

2.4.2. Pruebas de patogenicidad

Con base en los postulados de Koch (Agrios, 2005), se realizaron diez aislados correspondientes a hoja, tallo y raíz, utilizando 20 macetas de plántulas de cafeto de la variedad Oro Azteca de dos meses de edad sin síntomas de marchitez, de las cuales 10 macetas se inocularon con micelio del hongo y 10 macetas se utilizaron como testigos.

Las primeras 10 plántulas se inocularon por aspersión con una suspensión de 1×10^6 conidios mL^{-1} , además de incisiones con aguja de insulina para facilitar la absorción de la suspensión e incubadas a 28 °C durante 72 h. A las 10 macetas que fungieron como testigos solo se les asperjó agua destilada estéril, dándoles las mismas condiciones experimentales. Las macetas se colocaron en el interior de bolsas plásticas que contenían papel filtro, las cuales se humedecieron con agua destilada estéril para lograr humedad relativa alta (cámaras húmedas). Después del desarrollo de síntomas se procedió a realizar el reaislamiento, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito (Esparza, 2009).

2.4.3. Identificación morfológica del patógeno

La identificación morfológica de las cepas representativas obtenidas que ocasionaron patogenicidad se realizó con ayuda de un microscopio Olympus BX41 (objetivos 40 y 100X), buscando presencia, forma y tamaño de 50 conidios, 50 conidióforos, 50 fiálides y esporodoquios, con base en lo descrito por Holliday (1980), Tuset (1986), Pelayo *et al.* (2017), Ulate (2019), Matic *et al.* (2019), Soliman (2020), Wang *et al.* (2020) y Huaman *et al.* (2021).

2.4.4. Identificación molecular

2.4.4.1. Extracción de ADN

La extracción del ADN genómico se llevó a cabo usando la metodología de Dellaporta Mini, descrito por Dellaporta y Hicks (1983) con algunas modificaciones. El crecimiento del hongo por 14 días en cajas Petri con medio de cultivo PDA incubado a 25 ± 2 °C fue una condición necesaria. El protocolo utilizado se describe a continuación: en tubos tipo Eppendorf se adicionó 1 mL de buffer de lisis (urea 3 M; NaCl 0.35 M; tris 0.05 M; EDTA 0.02 M y 1 % sarcosina), dejándolos en reposo durante 10 min. Posteriormente los microtubos se guardaron en ultracongelador a una temperatura de -70 °C durante 12 h. Transcurrido este tiempo las muestras se agitaron en Vortex durante 1 min. Después se centrifugaron a 12 000 rpm por 1 min. El sobrenadante se colocó en un microtubo nuevo y a la mezcla se le adicionó 500 µL de fenol cloroformo (12:4 v/v) (Sigma®Chemicals, EE. UU.). Otra centrifugación de 12 000 rpm durante 3 min se realizó. El DNA que contenía el microtubo se dividió en tres fases, la fase acuosa se recuperó colocándola en un microtubo nuevo, agregando 200 µL de cloroformo y centrifugando por 20 min. En la segunda fase, los ácidos nucleicos se recuperaron en un microtubo nuevo y precipitados con 500 µL de isopropanol y 50 µL de acetato de sodio (10 M), enseguida se incubaron durante 20 min en frío en un ultracongelador. En la tercera fase, el DNA se sedimentó mediante centrifugación a 12 000 rpm durante 15 min y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 50 µL de etanol al 70 %, se centrifugó nuevamente a 12 000 rpm por 5 min, descartando el sobrenadante. Para finalizar, se adicionaron 50 µL de agua grado PCR y las muestras fueron conservadas a -20 °C. La calidad y concentración del DNA se verificó usando electroforesis en gel de agarosa al 1 % y mediante espectrofotometría usando un NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific®, EE. UU.).

2.4.4.2. Amplificación por PCR

Para la amplificación molecular se utilizaron los iniciadores universales ITS 1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGGAAGTAA-3') e ITS 4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White *et al.*, 1990). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL, con 1 x PCR Buffer, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.6 µM de cada oligonucleótido, 1.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 10 ng de DNA. Para las condiciones de PCR se tomó como referencia lo reportado por Infante *et al.* (2013) comenzando con una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, una temperatura de alineamiento de 55 °C por 1 min, extensión de 72 °C durante 1 min y una extensión final de 72 °C por 6 min (termociclador BIO-RAD T100 Thermal Cycler). Una alícuota de 5 µL se analizó por electroforesis en gel de agarosa (Promega, USA) al 1.5 % (w/v) en Buffer TBE. Dicho gel fue teñido con bromuro de etidio y se visualizó en un fotodocumentador (DNR minibis-pro) (Sambrook y Russell, 2001). Finalmente, los amplicones se enviaron a secuenciación al laboratorio de Macrogen © Korea.

2.4.4.3. Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas se analizaron y compararon con secuencias disponibles en el centro Nacional de Estados Unidos de America para la Información Biotecnológica (Genbank-EMBL) (Altshul *et al.*, 1990). El número de acceso de cada secuencia se obtuvo considerando mayor porcentaje de similitud y cobertura.

2.4.4.4. Análisis filogenético

El alineamiento múltiple de secuencias se realizó con un método iterativo (MUSCLE) (Robert, 2004) y el modelo de sustitución de nucleótidos se llevó a cabo en MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). La reconstrucción filogenética se infirió aplicando el método de Neighbour-Joining, el modelo de Tamura (Tamura *et al.*,

2004) y 1000 repeticiones de bootstrap (Felsenstein, 1985); se utilizó secuencias obtenidas del Blast.

2.5. RESULTADOS

2.5.1. Aislamiento del patógeno

Del material vegetal enfermo procesado en laboratorio se obtuvieron diez aislamientos de un hongo con morfología similar. Estas cepas se desarrollaron en medio de cultivo PDA incubadas durante 14 días a temperatura de 25 ± 2 °C.

2.5.2. Pruebas de patogenicidad

A los 3 días después de la inoculación (ddi) de las plántulas aparecieron puntos oscuros pequeños en el área de inoculación, tanto en tallo y hojas, que posteriormente se fueron uniendo hasta formar áreas negras irregulares de tejido muerto. Las lesiones en las hojas presentaban manchas foliares circulares con anillos concéntricos; en el haz, la lesión presentaba color café oscuro y, en el envés, color café y márgenes con tonalidades de café oscuro. En el tallo se observó necrosis abarcando desde la zona apical hasta la raíz, teniendo una apariencia atizonada de color negro grisáceo (Figura 2).

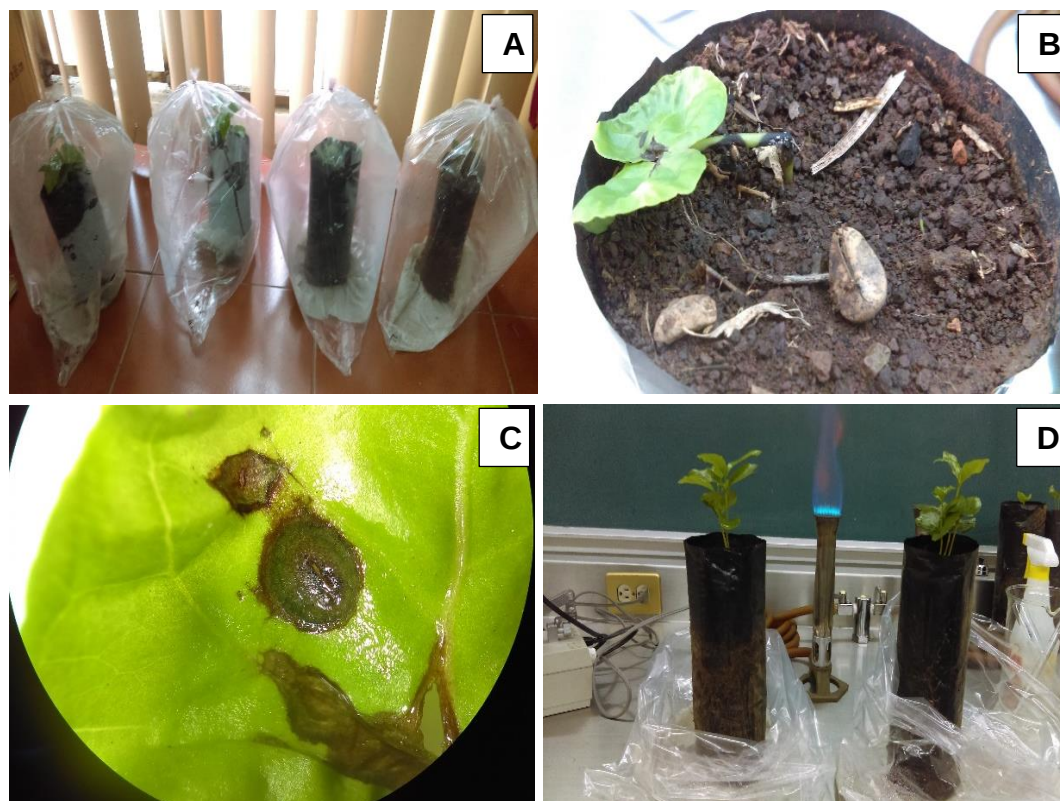


Figura 2. Síntomas en plántulas de cafeto a 3 ddi. A) Cámaras húmedas. B) síntoma inicial en cuello de tallo. C) síntoma en hojas. D) Plántulas con síntomas para reaislamiento. Créditos: Silverio Jarquín-Cordero, 2022.

2.5.3. Identificación morfológica

A los 14 días después de la siembra (dds) del hongo en el medio de cultivo PDA, los aislamientos presentaron un crecimiento micelial diametral de 6.3 cm (Figura 3). Las características macroscópicas observadas de las cepas fueron: colonia color blanco a ligeramente amarillo con micelio aéreo, presentó formación de seis anillos concéntricos en promedio y abundantes esporodoquios sobre el micelio de color verde oliváceo claro. Las características microscópicas identificadas fueron: presencia de conidióforos hialinos con medidas de 20.22 a 36.62 μm de largo x 2.09 a 3.27 μm de ancho y ramificados de tres a cinco fiálides en forma de cilindro y verticiladas que median 10.64 a 27.82 x 1.20 a 2.27 μm , los conidios estaban aseptados y en forma de bastón con los extremos ligeramente redondeados de 6.31 a 9.91 x 0.87 a 2.44 μm (Figura 4).

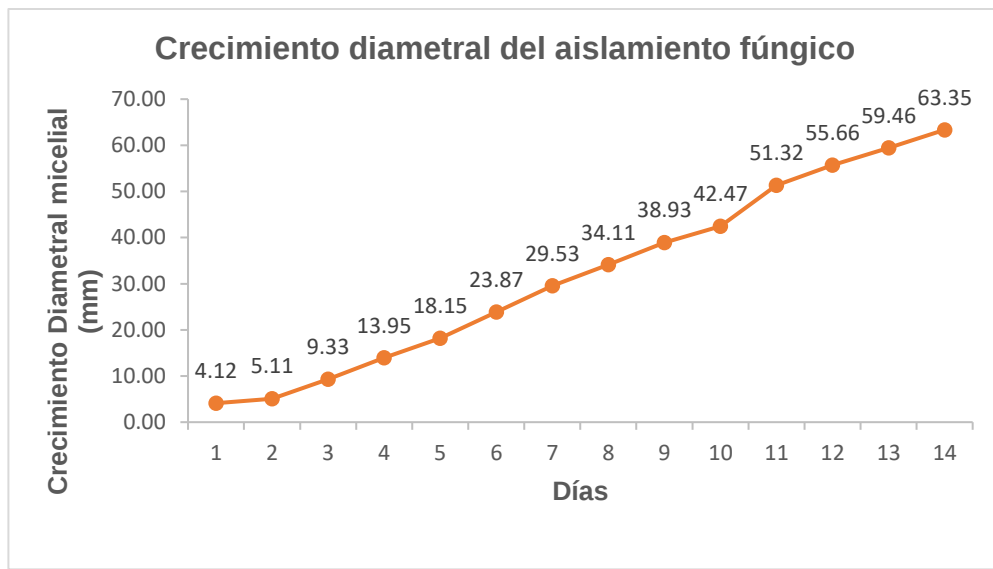


Figura 3. Crecimiento del aislado a los 14 dds en medio de cultivo PDA incubado a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Créditos: Silverio Jarquín-Cordero, 2022.

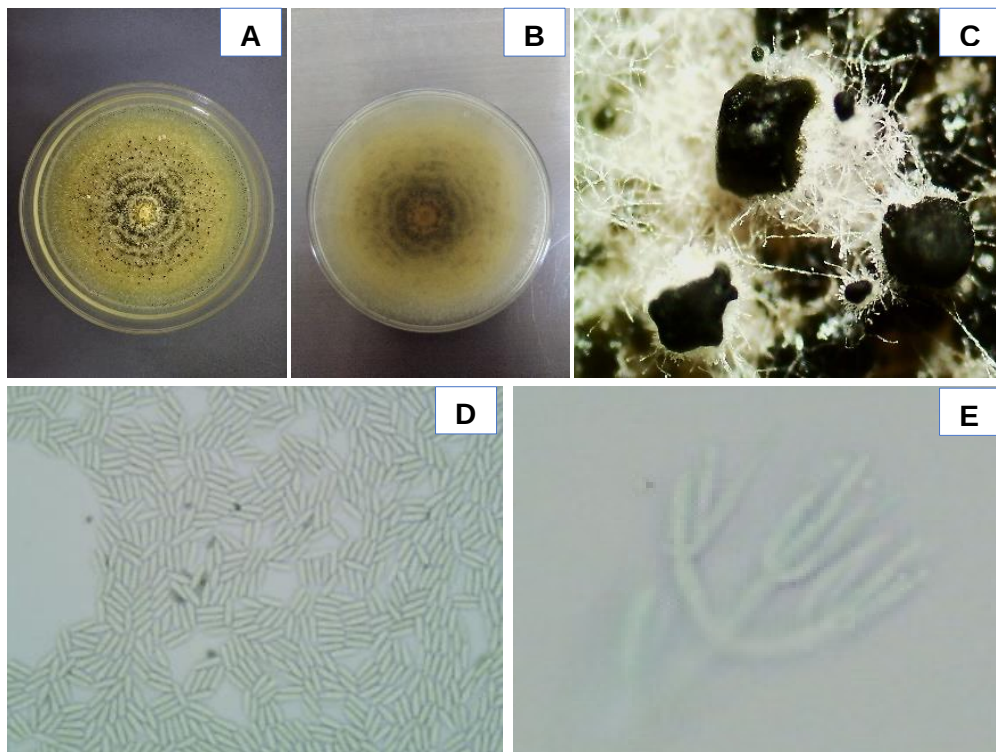


Figura 4. Características de aislados a 40x. A) y B) Crecimiento de la colonia en medio de cultivo PDA a los 14 dds (anverso y reverso, respectivamente). C) Esporodocios. D) Conidios. E) Fiálides. Créditos: Silverio Jarquín-Cordero, 2022.

2.5.4. Identificación molecular

A fin de corroborar la identificación morfológica del patógeno, se realizó la identificación molecular mediante ITS1 e ITS4 del rDNA parcial. Como resultado de la amplificación se obtuvo el gel de la Figura 5 donde se muestran la banda reportada del patógeno.

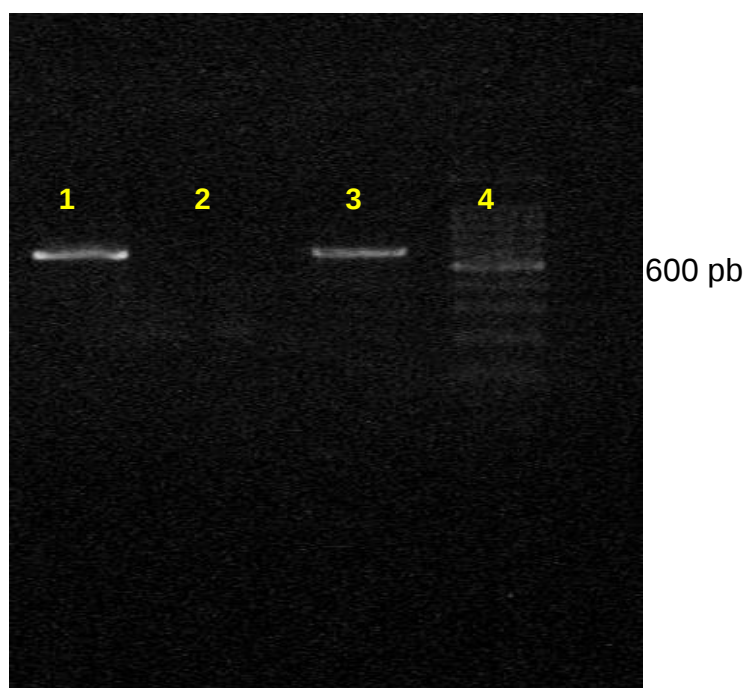


Figura 5. Amplificación del producto PCR en gel de agarosa al 1 %. Carril 1. Positivo. Carril 2. Negativo. Carril 3. Patógeno. Carril 4. Marcador de Peso Molecular de 1 kb (Promega).

Las secuencias se editaron y compararon en GenBank usando BLAST. Para la reconstrucción filogenética de la secuencia de *P. roridum* (PRMF12) se infirió por el método de Neighbour-Joining con 1000 repeticiones de bootstrap (Felsenstein, 1985). Se seleccionaron 10 secuencias obtenidas del Blast: presentando 100 % de similitud con los números de accesión MW600528.1 (*P. roridum*), MW600536.1 (*P. roridum*), KC469695.1 (*Myrothecium roridum*), KF761292.1 (*M. roridum*), MZ570588.1 (*P. roridum*), KC581914.1 (*M. roridum*), y 99.73 % con KJ174523.1 (*M. roridum*), MT853067.1 (*P. breviseta*), un 99.47 % con KY062563.1 (*P. roridum*) y 98.14 % de similitud con JF724155.1 (*M. roridum*). El árbol filogenético construido evidencio la relación evolutiva entre *P. roridum* con otras especies del género *Paramyrothecium*, y mostró que *P. roridum* está estrechamente relacionado con el *P. roridum* del número de accesión MW600528 y MW600536 en un soporte de 84 % (Figura 6).

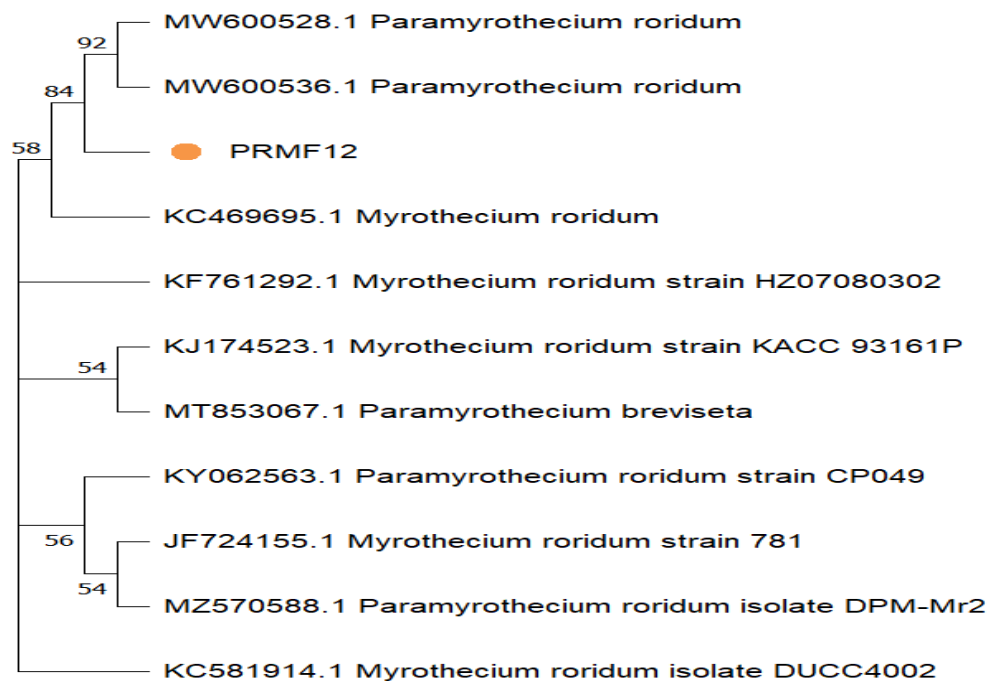


Figura 6. Árbol filogenético de la secuencia correspondiente al punto color anaranjado (PRMF12) del aislado de *P. roridum* con otras 10 secuencias de *Paramyrothecium* spp., disponibles en el Genbank. El método usado fue Neighbour-Joining con 1000 repeticiones de Bootstrap. El análisis involucró 11 secuencias de nucleótidos.

2.6. DISCUSIÓN

Los resultados de la caracterización morfológica y molecular indican que los aislados fúngicos de *Paramyrothecium roridum* coinciden con las de Pelayo *et al.* (2017) quienes reportaron la siguiente caracterización de cepas: plana por el anverso con micelio aéreo de color blanco a ligeramente amarillo, el promedio de anillos concéntricos fue de 6 con presencia de esporodoquios en cada anillo. Por el reverso de la cepa (caja Petri) se tornó ligeramente de color amarillo; los conidióforos fueron hialinos, abundantes, con estípites septados, con medidas de $22 \text{ a } 40 \times 2 \text{ a } 3 \text{ }\mu\text{m}$, presentaban ramas peniciladas sin septos que contenían de 2 a 5 fiálides; las fiálides eran rectos y ligeramente curvos, cilíndricos, hialinos que midieron de $10 \text{ a } 28.5 \times 1.5 \text{ a } 2.0 \text{ }\mu\text{m}$ y finalmente los conidios observados fueron aseptados, cilíndricos a elipsoidales con medidas de $6.0 \text{ a } 7.0 \times 1.5 \text{ a } 2 \text{ }\mu\text{m}$ y extremos redondeados. Las cepas presentaron un crecimiento diametral de 6.3 cm a los 14 días después de la siembra en medio de cultivo PDA, medida de crecimiento que coincide con los obtenidos en este estudio. Soliman (2020) por su parte en cultivo de fresa caracterizó cepas de *P. roridum* en medio de cultivo PDA documentando las siguientes características; micelio de color blanco a ligeramente amarillo con aspecto de corrugación en el centro de la colonia, estas cepas formaron anillos concéntricos con presencia de gotas viscosas de color negro oliváceo a verde oliváceos llamados esporodoquios; conidióforos hialinos y ramificados con 3 y 5 fiálides en forma de cilindro; los conidios eran aseptados y en forma de bastón con los extremos ligeramente redondeados, características similares obtenidas en la presente investigación.

En este estudio, los postulados de Koch fueron cumplidos mediante las pruebas de patogenicidad utilizando plántulas de cafeto, revelando que la cepa aislada de *P. roridum* es un agente potencial para infectar al cafeto. Resultados que concuerdan con la metodología empleada para pruebas de patogenicidad de *P. roridum* en plantas de hortensia y de soya (Mmbaga *et al.*, 2010; Haudenshield *et al.*, 2018).

Huaman *et al.* (2021) identificaron a nivel morfológico a *P. roridum* asociado con el agroecosistema café en el Estado de Tabasco, México. En la descripción de las cepas, estos autores mencionan que el anverso de la colonia presenta micelio aéreo de color blanco, formando anillos concéntricos con abundantes esporodoquios de color verde oliváceo, mientras que en el reverso se observa de color amarillo pálido. Conidios de 5.23 a 6.75 μm de largo y 1.37 a 1.99 μm de ancho. Estas características concuerdan con las obtenidas en este trabajo.

Ulate (2019) en un estudio realizado en Costa Rica enfocado en aislar al agente causal de manchas foliares en cafeto, caracterizó cepas que presentaban micelio aéreo de color blanco que con el tiempo fue formando anillos concéntricos con la presencia de esporodoquios de color negro a verde oliváceo rodeado de abundante micelio blanco. En el reverso de la colonia se observó que el color fue crema oscuro a amarillo pálido. Este autor observó presencia de conidióforos, rectos, septados y ramificados de manera irregular que en su mayoría se encontraban agrupados, los conidios tenían forma de cilindro con los extremos ligeramente redondeados, lisos, con apariencia hialina al principio, pero al transcurrir los días su coloración se tornaba verde oliváceo, se encontraban libres o agrupados en masas pequeñas y median de 6 a 8 μm de largo x 1.5 a 2.5 μm de ancho. También observa la presencia de fiálides que eran cilíndricas y redondeadas en los extremos; además, por medio de técnicas moleculares, las cepas aisladas pertenecen a *Paramyrothecium roridum*, resultados que concuerdan con los obtenidos en el presente estudio.

Los resultados de la caracterización morfológica de este trabajo también coinciden con lo reportado por Lee *et al.* (2008), Tomar *et al.* (2016) y Kwon *et al.* (2014) los cuales describieron las cepas desarrolladas en medio de cultivo PDA, documentando la presencia de micelio color blanco, formando anillos concéntricos en el centro de la colonia y produciendo esporodoquios de color verde oscuro a negro y que en su mayoría estaban rodeados por micelio blanco; también reportaron conidióforos macronematosos y conidios agregados con color verde oscuro.

Cabrera *et al.* (2007) en un trabajo realizado para aislar e identificar al agente causal de mancha foliar en el cultivo de soya, describe a *Paramyrothecium roridum* con las siguientes características; en hojas como en medio de cultivo PDA formaba esporodoquios de color verde oliváceo a verde oscuro, de aspecto aceitoso, brillante, en su mayoría estaban rodeado de micelio blanco. Los conidióforos tenían forma de cilindro con ramificaciones y los conidios eran unicelulares, hialinos con los extremos redondeados que median de 5 a 7 x 1 a 2 μm . observaron presencia de fiálides. Estas características coinciden con las obtenidas en esta investigación.

En China, Wang *et al.* (2020) reportaron por primera vez a *P. roridum* como agente causal de la mancha foliar en la planta ornamental conocida con el nombre común de “planta obediente” (*Physostegia virginiana*). Aislaron y caracterizaron a cepas que presentaban micelio de color blanco, mencionando que la colonia tenía un aspecto de corrugación, formando anillos concéntricos con presencia de esporodoquios de color negro. Informaron que los conidióforos eran hialinos con ramificaciones secundarias y terciarias en forma de cilindro. Los conidios fueron aseptados, unicelulares, hialinos, cilíndricos y median de 4.8 a 8.2 μm x 1.7 a 2.4 μm con los extremos redondeados. Con respecto a la identificación molecular utilizaron iniciadores ITS1 e ITS4 para amplificar los genes parciales del espaciador transcrito interno (ITS). Estos informes coinciden con los obtenidos en esta investigación.

Otro estudio realizado en Irak, reporta la identificación de *Paramyrothecium roridum* aislado de suelo de cultivos de cucurbitáceas, en dicho trabajo los aislados desarrollados en medio de cultivo PDA alcanzaron 4.6 cm de diámetro después de 7 días a 25 °C, en el anverso de las cepas presentaban micelio de color blanco, anillos concéntricos y formación de esporodoquios de color verde oliváceo a verde oscuro rodeados de micelio blanco, observaron presencia de conidióforos ramificados y conidios hialinos en forma de cilindros con los extremos ligeramente redondeados que median de 5.3 a 7.8 x 1.1 a 2.8 μm

(Ramadan *et al.*, 2021). Todas las características coinciden con los resultados de este estudio.

Como lo señala Holliday (1980) en la descripción que realiza de *Myrothecium roridum* desarrollado en medio de cultivo PDA, el cual presentó en el anverso de la colonia micelio de color blanco con la colonia de aspecto corrugado, formando anillos concéntricos y produciendo esporodoquios de color verde oliváceo que podían estar rodeados de micelio color blanco, el crecimiento micelial a los 14 días después de la siembra fue de 6 cm de diámetro en promedio. Los conidióforos eran hialinos, en forma de cilindro, presentaban de 2 a 3 ramas. Las fiálides eran verticiladas en forma de cilindro, hialinos con medidas de 9 a 27 (14.2) x 0.9 a 1.8(1.4) μm . Por su parte los conidios tenían forma de cilindro con los extremos redondeados, hialinos y con medidas de 4.5 a 10.8 (7.2) x 1.3 a 2.7 (1.8) μm . Información que concuerda con los resultados de este trabajo.

Por su parte, Tuset (1986) describe a *Myrothecium roridum* con las siguientes características; los conidióforos eran cortos y compactos que formaban una capa estromática junto con las células del hospedero, eran hialinos, cilíndricos y ramificados. Las fiálides, eran cilíndricas, hialinas con los extremos redondeados. Los conidios por su parte eran cilíndricos con los extremos ligeramente redondeados, hialinos a ligeramente oliváceo y que median de 4.5 a 10.8 de largo x 1.3 a 2.7 μm de ancho. Características que concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio.

Matic *et al.* (2019) en un trabajo realizado para la identificación del agente causal de manchas foliares en plantas ornamentales y hortalizas de hojas, describieron las colonias de *P. roridum* crecidas en medio de cultivo PDA, las cuales presentaban abundante micelio aéreo de color blanco con formación de esporodoquios de color verde oscuro distribuidos en los anillos concéntricos desarrollados el centro de la colonia. Los conidios eran aseptados, cilíndricos, hialinos con los extremos redondeados que median de 6 x 2 μm . También reportaron presencia de conidióforos ramificados. Resultados que concuerdan con los obtenidos en este trabajo.

El análisis del alineamiento múltiple de secuencias de la región ITS que fue realizada para *Paramyrothecium roridum* de este estudio incluyó secuencias reportadas previamente en National Center for Biotechnology Information (NCBI) de géneros y especies estrechamente relacionados. En el dendograma la secuencia del aislamiento de este estudio (PRMF12) fue comparado con *Myrothecium roridum* (KC4696695.1) mostrando una relación entre ellos con valores bootstrap de 58%. En otro clado, la secuencia PRMF12 se comparó con *Paramyrothecium roridum* (MW600528.1) y *Paramyrothecium roridum* (MW60536.1) mostrando una estrecha relación entre ellos con valores Bootstrap de 84%, indicando que los organismos son similares genéticamente. Estos resultados son similares con lo reportado por Garzón (2019) quien identificó molecularmente a *Myrothecium verrucaria* con relaciones estrechas con especies del género *Paramyrothecium* en valores Bootstrap de 98% en el árbol filogenético reconstruido.

Todos los resultados antes mencionados, incluyendo los de este trabajo, proporcionan la certeza de que se trata de *Paramyrothecium roridum*, agente causal de la mancha foliar en plántulas de cafeto. Por lo tanto, este estudio puede resultar de utilidad para los productores de cafeto al identificar correctamente al patógeno y que permitirá realizar el manejo adecuado de la enfermedad.

2.7. CONCLUSIONES

Evidencia morfológica y molecular indica que el agente causal de la mancha foliar en plántula de cafeto fue *Paramyrothecium roridum*, es posible aislarlo y su patogenicidad indica que se trata de un hongo patógeno potencial del cafeto.

2.8. LITERATURA CITADA

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403 - 410.
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. 5ed. Nueva York. Elsevier Academic Press. 922 p.
- Cabrera, G. M., Cúndom, Á. M., Gutiérrez, A. S., Álvarez, R. E. y Sosa, C. N. T. (2007). Detección de *Myrothecium roridum* en manchas foliares de soja en cultivos de Corrientes, Argentina. *Summa Phytopathol* 34(2): 193 <https://www.scielo.br/j/sp/a/Jfm8f9QwN84CrZrhnmfpgGM/?format=pdf&lang=es>.
- CEDRSSA. (2019). Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. <http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/94Caf%C3%A9%20-Producci%C3%B3n%20y%20Consumo.pdf>. (Consulta, abril 2022).
- Dellaporta, S. J. and Hicks, J. (1983). A plant DNA miniprep. *Plant Molecular Biology Reporter* 1(19): 21.
- El-Kazzaz, M. K., El-Fadly, G. B., Hassan, M. A. A., El-Kot, G. A. N. (2008). Identification of some *Fusarium* spp. using Molecular Biology Techniques, *Egypt Journal of Phytopathology* 36:57–69.
- Esparza, L. L. L. (2009). Efectividad *In vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en aislados de *Phytophthora parasítica* D. obtenidos de plantas de Jamaica. Colegio de Postgraduados. Tesis Maestría en Ciencias. 69 p.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Garzón, M. L. (2019). Identificación de microorganismos asociados al necrosamiento de tallo, en morera *Morus* sp. en la meseta de Popayán. Universidad del Cauca, Colombia. Tesis de maestría en ciencias. 118 p. <http://repositorio.unicauca.edu.co:8080/bitstream/handle/123456789/1608/Identificaci%C3%B3n%20de%20microorganismos%20asociados%20al%20necrosaneamiento%20de%20tallo%20en%20morera%20Morus%20sp.en%20la%20meseta%20de%20Popay%C3%A1n.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Haudenschild J.S., Pawlowski M., Miranda C., Hartman G.L. (2018). First report of *Paramyrothecium roridum* causing *Myrothecium* leaf spot on soybean in Africa. *Plant Disease* 102(12): 2638. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-18-0624-PDN>.
- Holliday, P. (1980). *Fungus Diseases of Tropical Crops*. Cambridge University Press. 17(3):343. <https://books.google.com.mx/books?id=2QU9AAAAIAAJ&pg=PA286&lpg=PA286&dq=myrothecium+and+coffee&source=bl&ots=4wcUy69d-x&sig=Kr-E2PJ2HcRNH2JMIIBvPAQbrR4&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjEyYbRrZvWAhWqrFQKHTghDEk4ChDoAQhSMAc#v=onepage&q=myrothecium%20and%20coffee&f=false>.

- Huaman, A., Torres, M., Ramírez, G., Leiva, S., Sánchez, T. y Oliva, S. (2021). Caracterización morfológica de hongos asociados al agroecosistema café (*Coffea arabica* L.), en el estado de Tabasco, México. *Revista Pakamuros*. 9(3): 44-58. DOI: <https://doi.org/10.37787/pakamuros-unj.v9i3.217>.
- ICO (International Coffee Organization). (2022). Historia del café: el café es un producto básico mundial. https://www.ico.org/ES/coffee_storyc.asp (Consulta, abril 2022).
- Infante, D., Marinez, B., Peteira, B., Reyes, Y., Herrera, A. (2013). Identificación molecular y evaluación patogénica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *Rhizoctonia solani* Kühn. *Biotecnología Aplicada* 30:17-22.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016). Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870-1874.
- Kusai, N. A., Azmi, M. M. Z., Zulkifly, S., Yusof, M. T., and Zainudin, N. A. I. M. (2015). Morphological and molecular characterization of *Curvularia* and related species associated with leaf spot disease of rice in Peninsular Malaysia. *Lincei. Scienze Fisiche e Naturali* 27:205-214. <https://doi.org/10.1007/s12210-015-0458-6>.
- Kwon, H. W., Kim, J. Y., Choi, M. A., Son, S. Y., and Kim, S. H. (2014). Characterization of *Myrothecium roridum* isolated from imported *Anthurium* plan culture médium. *Mycobiology* 42(1): 82-85.
- Lee, H. B., Kim, J. C., Hong, K. S., and Kim, C. J. (2008). Evaluation of a fungal strain, *Myrothecium roridum* F0252, as a bioherbicide agent. *The Plant Pathology Journal* 24(4): 453-460.
- Lombard L., Houbraken J., Decock C., Samson R.A., Meijer M., Réblová M., Groenewald J.Z., and Crous P.W. (2016). Generic hyper-diversity in Stachybotriaceae. *Persoonia* 36: 156–246. DOI: <http://dx.doi.org/10.3767/003158516X691582>.
- Matić, S., Gilardi, G., Gullino, M. L., Garibaldi, A. (2019). Emergence of leaf spot disease on leafy vegetable and ornamental crops caused by *Paramyrothecium* and *Albifimbria* species. *Phytopathology* 109(6): 1053-1061. Doi:10.1094/phyto-10-18-0396-r.
- Mmbaga M.T., Li Y., Kim M.S. (2010). First report of *Myrothecium roridum* causing leaf spot on garden hydrangea in the United States. *Plant Disease* 94 (10): 1266. DOI: <http://doi.org/10.1094/PDIS-04-10-0264>.
- Moumni, M., Allagui, M.B., Mancini, V., Murolo, S., Tarchoun, N., and Romanazzi, G. (2020). Morphological and molecular identification of seedborne fungi in squash (*Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*). *Plant Disease* 104(5): 1335-1350.
- Pelayo, S. G., Yañez, M. M. J., and Solano, V. R. (2017). First report of leaf spot on *Coffea arabica* caused by *Paramyrothecium roridum* in Mexico. *Plant Disease Notes* 101(6):1044-1044. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-16-1588-PDN>.
- Ramadan, H. F., Majeed, G. N., Haji, A. L., and Khalaf, A. S. (2021). Pathogenicity of endogenous isolate of *Paramyrothecium* (= *Myrothecium*) *roridum* (Tode) L. Lombard & Crous against the squash beetle *Epilachna chrysomelina* (F.). *Journal of Plant Protection Research* 61(1): 110–116.

- DOI: 10.24425/jppr.2021.136271. <http://www.plantprotection.pl/pdf-131278-63012?filename=Pathogenicity%20of.pdf>.
- Robert, C. E. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5): 1792-1797.
- SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural). (2018). Blog: México, onceavo productor mundial de café <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/mexico-onceavo-productor-mundial-de-cafe#:~:text=La%20producci%C3%B3n%20de%20sus%20cafetos%20representa%202.4%25%20del%20total%20mundial&text=El%20caf%C3%A9%20es%20un%20cultivo,kg%20per%20c%C3%A1pita%20al%20a%C3%B1o>. (Consulta, abril 2022).
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL*. New York, EU: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1(3).
- SIAP. (2021). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto (Consulta, marzo 2022).
- Singha, M. I., Kakoty, Y., Unni, G. B., Das, J., Kalita, C. M. (2016). Identification and characterization of *Fusarium* sp. using ITS and RAPD causing *Fusarium* wilt of tomato isolated from Assam, North East India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 14:99–105.
- Soliman, M. S. (2020). Characterization of *Paramyothecium roridum* (Basionym *Myrothecium roridum*) causing leaf spot of strawberry. *Journal of Plant Protection Research* 60(2): 141-149. <https://doi.org/10.24425/jppr.2020.133308>.
- Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.
- Tomar, D. S., Shastry, P. P., and Nayak, M. K. (2016). Morphological and histopathological studies of *Myrothecium roridum* on cotton. *Journal of cotton Research and Development* 30(1):90-96.
- Tuset, J. J., Hinarejos, C., y García, J. (1986). *Myrothecium roridum*, un patógeno Tuberculariaceae de *Euphorbia lathyris* y *Lactuca sativa* en España. *Investigación Agraria* 1: 251-258.
- Ulate, H. E. (2019). Caracterización de la sintomatología y determinación de los hongos asociados al daño en la base del tallo en plantas de cafeto (*Coffea arabica* A. Chev) cultivar centroamericano. Tesis de licenciatura. Universidad de Costa Rica. 80 p.
- Waller, J. M. (2002). Detection and Isolation of Fungal and Bacterial Pathogens. *Plant Pathologist's Pocketbook*. CABI Publishing New York, USA 1(3): 208-215.
- Wang, H., Jiang, F., Lan, Y., and Han, X. (2020). First Record of *Paramyothecium roridum* Causing Leaf Spot on *Physostegia virginiana* in China. *Disease Notes. Plant Disease* 105: 505. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/epdfplus/10.1094/PDIS-05-20-1082-PDN>.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor. J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols a guide to methods and applications, London, United Kingdom: pp. 315 – 322.

CAPÍTULO III. POTENCIAL ANTAGÓNICO *in vitro* DE DIFERENTES AISLADOS NATIVOS DE *Trichoderma* spp. CONTRA *Paramyrothecium roridum*

3.1. RESUMEN

El manejo actual de *Paramyrothecium roridum* se realiza principalmente con productos químicos que en su mayoría resultan adversos al ambiente. Por tal razón, se investigan alternativas de manejo. *Trichoderma* spp. es uno de los hongos más utilizados para el control biológico de enfermedades fúngicas y tiene gran relevancia ambiental debido a la amplia distribución en los sistemas de producción del cultivo de cafeto. Los objetivos del presente trabajo fueron la identificación morfológica y molecular; y la evaluación patogénica de aislamientos nativos del género *Trichoderma* spp., frente a *Paramyrothecium roridum*, analizando las variables: días al primer contacto entre hifas, clasificación de antagonismo y porcentaje de inhibición. Se empleo un experimento completamente al azar con cinco repeticiones. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples de medias de Tukey ($\alpha=0.05$). Los resultados para días a primer contacto entre hifas indicaron que T8(MB) tuvo contacto al tercer día y el resto de los aislamientos a los cuatro días. Predominó el tipo de antagonismo tipo II con 12 cepas de *Trichoderma* spp. y 6 cepas aisladas presentaron antagonismo tipo I. El porcentaje de inhibición fluctuó de 7.11 a 17.52 %. A partir de la secuenciación y comparación de los datos de las secuencias depositadas en el GenBank, se comprobó que las cepas representativas T8(MB) y T15(CH1), tienen 100 % de identidad con la especie *Trichoderma harzianum*.

Palabras clave: *Trichoderma* spp., *Paramyrothecium roridum*, identificación, Antagonismo.

3.2. ABSTRACT

ANTAGONIC POTENTIAL *in vitro* OF DIFFERENT NATIVE ISOLATES OF *Trichoderma* spp. AGAINST *Paramyrothecium roridum*

The current management of *Paramyrothecium roridum* is carried out mainly with chemical products that are mostly adverse to the environment. For this reason, management alternatives are investigated. *Trichoderma* spp. It is one of the most widely used fungi for the biological control of fungal diseases and has great environmental relevance due to its wide distribution in coffee production systems. The objectives of this work were the morphological and molecular identification; and the pathogenic evaluation of native isolates of the genus *Trichoderma* spp., against *Paramyrothecium roridum*, analyzing the variables: days to first contact between hyphae, classification of antagonism and percentage of inhibition. A completely randomized experiment with five replications was used. The data obtained were subjected to an analysis of variance and Tukey's multiple comparison test of means ($\alpha=0.05$). The results for days to first contact between hyphae indicated that T8(MB) had contact on the third day and the rest of the isolates on four days. Type II antagonism prevailed with 12 strains of *Trichoderma* spp. and 6 isolated strains presented type I antagonism. The percentage of inhibition fluctuated from 7.11 to 17.52 %. From the sequencing and comparison of the data of the sequences deposited in the GenBank, it was found that the representative strains T8(MB) and T15(CH1), have 100 % identity with the *Trichoderma harzianum* species.

Keywords: *Trichoderma* spp., *Paramyrothecium roridum*, identification, Antagonismo.

3.3. INTRODUCCIÓN

El café es una de las bebidas más consumidas a nivel mundial y es uno de los productos agrícolas más comercializados e importantes junto con el petróleo (Dechassa, 2019). Es cultivado por 25 a 30 millones de pequeños, medianos y grandes productores en alrededor de 80 países tropicales (Aderolu *et al.*, 2014). A pesar de que el cafeto es cultivo clave para la economía mundial, la producción ha estado afectada por factores que limitan la productividad; factores abióticos y bióticos son las principales limitantes de la producción de café en el mundo. En el segundo factor se encuentran enfermedades fúngicas que atacan frutos, hojas, tallos y raíces que finalmente afectan el rendimiento y la comercialización (Dechassa, 2019). Diferentes enfermedades fúngicas han sido reportadas con sus respectivos agentes causales identificadas que afectan al cultivo de cafeto, las cuales han sido: *Colletotrichum kahawae*, *Gibberella xylarioides*, *Hemileia vastatrix*, *Corticium koleroga*, *Armillaria mellea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Ascochyta tarda*, *Rhizoctonia* spp., *Phytium* spp., *Fusarium* spp. y *Mucor* spp. (Adugna *et al.*, 1997; Derso *et al.*, 2000; Teferi *et al.*, 2008).

La aparición de nuevas enfermedades que afecten el desarrollo del cafeto es un riesgo latente, tal es el caso de las enfermedades de nuevo encuentro (Bieysse *et al.*, 2008). La enfermedad de la mancha foliar en plántulas de cafeto causada por *Paramyrothecium roridum* es un caso particular, debido a que hasta hace 10 años estaba confinada a países como India y Japón únicamente (Govindiah *et al.*, 1989; Murkai *et al.*, 2002). Actualmente esta enfermedad se encuentra presente en México. Ante tal situación, surge la necesidad de generar estrategias de manejo para la enfermedad.

En su manejo, se recomienda emplear los controles cultural, mecánico, químico y biológico dentro de un enfoque integral. A pesar de que el uso de agroquímicos podría tener los mejores resultados en el control, el uso inadecuado y las malas prácticas de estos, pueden generar resistencia del patógeno disminuyendo la eficacia. Además de tener como desventaja el impacto negativo en flora y fauna,

contaminación al medio ambiente y tener riesgo de afectar la salud humana. En parte, estas características de los químicos justifican la búsqueda de agentes biológicos con potencial para el manejo (Pappachan *et al.*, 2019). Los agentes de biocontrol tienen la característica de contribuir a la resistencia inducida, hiperparasitismo, antibiosis, protección cruzada, competencia por espacio y nutrientes, principalmente, contra hongos fitopatógenos (Asghar *et al.*, 2010). La demanda de productos biológicos es cada vez mayor en el sector agrícola y todo indica que el futuro del control biológico parece ser prometedor. Por ello, en el presente estudio se aisló e identificó a cepas nativas de *Trichoderma* spp. a fin de realizar evaluaciones *in vitro* contra *Paramyrothecium roridum*.

3.4. MATERIALES Y METODOS

3.4.1. Obtención de especies nativas de *Trichoderma* spp.

3.4.2. Colecta de muestras de suelo

Las muestras de suelo fueron recolectadas en tres Estados productores de café (Hidalgo, Puebla y Veracruz) (Figura 7). En cada sitio visitado se realizó un muestreo dirigido a la rizosfera de diferentes especies de plantas, por lo que, cada muestra de suelo se obtuvo a una profundidad diferente, oscilando de 20 a 30 cm, eliminando previamente la materia orgánica superficial, hasta obtener 1 kg de suelo. Las muestras se transportaron en bolsas de plástico al Laboratorio de Patosistemas Vegetales, ubicado en la Universidad Autónoma Chapingo donde se guardaron en refrigeración a 10 °C para su uso posterior.



Figura 7. Ubicación en México de los sitios de colecta de las muestras de suelo para obtener especies nativas de *Trichoderma*. Créditos: Silverio Jarquín-Cordero, 2022.

3.4.3. Aislamiento, purificación e identificación morfológica de *Trichoderma* spp.

Los aislados de *Trichoderma* spp. se obtuvieron mediante el método de dilución de esporas. De cada muestra de suelo se pesó 1 g y se colocó en un tubo de ensayo con 10 mL de agua destilada estéril y se agito durante 15 seg en un vórtex (GENIE™). Utilizando micropipeta (KIMAX®) se tomó una alícuota de 1 mL para depositarla en otro tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril, se repitió este procedimiento hasta llegar a diluciones de 10^{-2} y 10^{-3} . De cada dilución se tomó una alícuota de 0.5 mL y se distribuyó homogéneamente sobre una caja

Petri que contenía medio de cultivo PDA. Todo el procedimiento se realizó en condiciones asépticas. Las cajas Petri sembradas se incubaron a temperatura ambiente de 28 ± 2 °C durante 7 días. Se utilizaron 10 cajas Petri por cada muestra de suelo (Sandoval y Stefanova, 2000; Esparza, 2009).

Las colonias de posibles *Trichoderma* spp. se reconocieron por formación de anillos concéntricos y esporulación de color verde, principalmente. Posteriormente se realizó la purificación de cada cepa haciendo cultivos monospóricos. La identificación se llevó a cabo mediante claves de Barnett y Hunter (1998) y Samuels (2006). Con la ayuda de un microscopio compuesto, se identificaron características típicas del género; conidióforos hialinos ramificados, no verticilados, fiálides individuales o en grupos.

La caracterización morfológica de cada cepa fue realizada midiendo el largo y ancho de 30 conidios, 30 fiálides y diámetro de 30 clamidosporas; para esto se empleó el programa computacional de Micro Capture Versión 6.9.10., la cual tiene la función de medición en micras (Esparza, 2009).

3.4.4. Identificación molecular

3.4.4.1. Extracción de ADN

La extracción del ADN genómico se llevó a cabo usando la metodología de Dellaporta Mini descrito por Dellaporta y Hicks (1983) con algunas modificaciones. Se usó el micelio del hongo desarrollado por 7 días en cajas Petri con medio de cultivo PDA incubado a 28 ± 2 °C. El protocolo utilizado se describe a continuación: en microtubos Eppendorf se adicionó 1 mL de buffer de lisis (urea 3 M; NaCl 0.35 M; tris 0.05 M; EDTA 0.02 M y 1 % sarcosina), dejándolos en reposo durante 10 min, posteriormente los microtubos se resguardaron en ultracongelador a -70 °C durante 12 h. Transcurrido este tiempo las muestras se agitaron en Vortex durante 1 min. Después fueron centrifugados a 12 000 rpm durante 1 min. El sobrenadante se colocó en un microtubo nuevo y se adicionaron 500 µL de fenol: cloroformo (12:4 v/v) (Sigma®Chemicals, EE. UU.) a la mezcla.

Se realizó otra centrifugación a 12 000 rpm durante 3 min. El DNA que contenía el microtubo fue recuperada colocándola en un microtubo nuevo agregando 200 μ L de cloroformo y centrifugando por 20 min. Después los ácidos nucleicos fueron recuperados en un microtubo nuevo y precipitados con 500 μ L de isopropanol y 50 μ L de acetato de sodio (10 M) e incubados durante 20 min en frío en un ultracongelador. Al finalizar este tiempo el DNA se sedimentó mediante centrifugación a 12 000 rpm durante 15 min; se eliminó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 50 μ L de etanol al 70 %, se centrifugó nuevamente a 12 000 rpm por 5 min, descartando el sobrenadante. Para finalizar se adicionaron 50 μ L de agua grado PCR y las muestras fueron conservadas a -20°C . La calidad y concentración del DNA se verificó usando electroforesis en gel de agarosa al 1 % y mediante espectrofotometría usando un NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific®, EE. UU.).

3.4.4.2. Amplificación por PCR

Para amplificar la secuencia se utilizaron los iniciadores universales ITS 1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGGAAGTAA-3') e ITS 4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') las cuales se utilizan para identificación molecular de hongos (White *et al.*, 1990; Quispe-Apaza *et al.*, 2017). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ L, con 1 x PCR Buffer, 1.5 mM de MgCl_2 , 0.2 mM de cada dNTP, 0.6 μ M de cada oligonucleótido, 1.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 10 ng de DNA. Para las condiciones de PCR se tomó como referencia lo reportado por Infante *et al.* (2013) comenzando con una desnaturalización inicial de 94°C durante 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, una temperatura de alineamiento de 55°C por 1 min, extensión de 72°C durante 1 min y una extensión final de 72°C por 6 min (termociclador BIO-RAD T100 Thermal Cycler). Se analizó una alícuota de 5 μ L por electroforesis en gel de agarosa (Promega, USA) al 1 % (w/v) en Buffer TBE. Dicho gel fue teñido con bromuro de etidio y se visualizó en un fotodocumentador (DNR minibis-pro) (Sambrook y Russell, 2001). Finalmente,

los microtubos Eppendorf con las muestras se enviaron a secuenciar al laboratorio de Macrogen © Korea.

3.4.4.3. Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y comparadas con secuencias similares del centro Nacional de Estados Unidos de América para la Información Biotecnológica (Genbank-EMBL) (Altshul *et al.*, 1990). Se obtuvo el número de acceso de cada secuencia considerando mayor porcentaje de similitud y cobertura.

3.4.4.4. Análisis filogenético

El alineamiento múltiple de secuencias se realizó con un método iterativo (MUSCLE) (Robert, 2004) y el modelo de sustitución de nucleótidos se llevó a cabo en MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). La reconstrucción filogenética fue inferida por el método de Neighbour-Joining, el modelo de Tamura (Tamura *et al.*, 2004) y 1000 repeticiones de bootstrap (Felsenstein, 1985). Se utilizó secuencias obtenidas del Blast.

3.4.5. Evaluación del antagonismo *in vitro* por técnica de cultivo dual

En la evaluación de la actividad antagónica se empleó la técnica de cultivo dual. Se colocó en un extremo (a 2 cm de la periferia) de las cajas Petri con medio de cultivo, un disco de PDA de 3.5 mm con *Paramyrothecium roridum* con crecimiento activo y en el extremo opuesto, otro disco de 3.5 mm con *Trichoderma* spp. (Esparza, 2009; Romero *et al.*, 2021). Una vez colocados ambos organismos en las cajas Petri, se incubaron a 28 ± 2 °C. El crecimiento micelial de ambos hongos se midió cada 24 h, hasta que el testigo llenó la caja y se observaron las confrontaciones a fin de evaluar las siguientes variables: días al primer contacto entre hifas, clasificación del antagonismo y porcentaje de

inhibición. Se empleo un diseño completamente al azar tomando como unidad experimental una caja Petri. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación de medias y prueba Tukey ($\alpha=0.05$) con el paquete estadístico SAS.

A continuación, se describe cada una de las variables y como se tomaron los datos.

3.4.5.1. Días al primer contacto entre hifas

Se realizaron observaciones en las confrontaciones y sus repeticiones cada 24 h, a partir del momento de la siembra de ambos microorganismos. Se registró el momento exacto en que las puntas de hifas de *Trichoderma* spp. y *P. roridum* tuvieron el primer contacto (Esparza, 2009; Romero *et al.*, 2021).

3.4.5.2. Clasificación del antagonismo

Considerando la clasificación de antagonismo propuesta por Bell *et al.* (1982), se ubicó en la clase de antagonismo correspondiente a cada tratamiento evaluado:

1= *Trichoderma* spp. sobrecrece completamente al fitopatógeno y cubre totalmente (100 %) la superficie del medio de cultivo de la caja Petri.

2= *Trichoderma* spp. cubre el 75 % de la superficie del medio de cultivo en la caja Petri, detiene al fitopatógeno, puede sobrecrecerlo y esporular sobre él.

3= *Trichoderma* spp. y el fitopatógeno colonizan, cada uno, aproximadamente la mitad de la superficie (50 %) del medio y ningún organismo es dominante.

4= El fitopatógeno coloniza dos terceras partes de la superficie del medio (75 %) y detiene el crecimiento de *Trichoderma* spp., lo puede sobrecrecer y esporular sobre este.

5= El fitopatógeno sobrecrece completamente a *Trichoderma* spp. y cubre 100 % la superficie del medio.

3.4.5.3. Porcentaje de inhibición

Las mediciones se realizaron con ayuda de un vernier digital, registrando el crecimiento cada 24 h. El experimento concluyó hasta que el testigo llenó la caja Petri. Con las mediciones obtenidas, se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento de *P. roridum*, aplicando la fórmula propuesta por Fokkema (1973), citado por Kagezi *et al.* (2015):

$$\% \text{ de inhibición (I)} = [(D1-D2) / D1] \times 100$$

En donde:

I= Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial.

D1= Diámetro de la colonia del testigo (patógeno) (mm).

D2 = Diámetro del crecimiento de la colonia del patógeno influenciada por el antagonista (mm).

3.5. RESULTADOS

3.5.1. Aislamiento, purificación e identificación morfológica de *Trichoderma* spp.

Los aislamientos de *Trichoderma* spp., se obtuvieron en puntos georreferenciados correspondientes a localidades como El Tejocotal y La Cabaña, Municipio de Acaxochitlán, Hidalgo; La Raya Municipio de Huatusco y Monte Blanco, Municipio de Fortín, Veracruz y en un punto del tramo carretero con dirección a Huatusco, Veracruz y de Zacatlán, Puebla (Cuadro 1). Se recolectaron 30 muestras de suelo distribuidas en 5 especies de plantas y un

macromiceto Agarical en las diferentes localidades de los 3 Estados visitados. Se obtuvieron 18 cepas nativas de *Trichoderma* spp.

Cuadro 1. Sitios de colecta para obtener aislados nativos de *Trichoderma* spp

Tratamiento /Clave de colecta	Hospedante	Localidad/Municipio	Localización Geográfica
(T1) ZP1 (T2) ZP2 (T3) ZP3	Pino	Zacatlán, Puebla	LT: N 19° 56' 15.71" LG: E 98° 00' 23.64" 2412 msnm
(T4) ZP4	Pino	Zacatlán, Puebla	LT: N 19° 56' 15.71" LG: E 98° 00' 23.64" 2412 msnm
(T5) ZP5 (T6) ZP6	Pino	Zacatlán, Puebla	LT: N 19° 56' 15.71" LG: E 98° 00' 23.64" 2412 msnm
(T7) ZP7	Pino	Zacatlán, Puebla	LT: N 19° 56' 15.71" LG: E 98° 00' 23.64" 2412 msnm
(T8) MB (T9) MB1 (T10) MB2	Caña de azúcar (etapa de maduración)	Monte Blanco, Fortín, Veracruz	LT: N 18° 57' 39.9" LG: E 97° 01' 16.02" 1250.89 msnm
(T11) HV1 (T12) HV2 (T13) HV3	Café (Typica)	La Raya, Huatusco, Veracruz	LT: N 19° 6' 35.35" LG: E 97° 00' 2.21" 1371.2 msnm
(T14) BV	Bambú	Carretera Huatusco, Veracruz	LT: N 19° 15' 53.00" LG: E 97° 02' 1.55" 1403 msnm
(T15) CH1 (T16) CH2 (T17) CH3	Hongo (Agarical)	La Cabaña, Acaxochitlán, Hidalgo	LT: N 20° 08' 43.63" LG: E 98° 09' 37.32" 2129.3 msnm
(T18) TH1	Zarzamora silvestre	El Tejocotal, Acaxochitlán, Hidalgo	LT: N 20° 8' 26.66" LG: E 98° 8' 44.08" 2124 msnm

En este estudio, 16 de 18 cepas aisladas se identificaron a nivel género (TH1, CH2, CH3, HV1, HV2, HV3, BV, MB1, MB2, ZP1, ZP2, ZP3, ZP4, ZP5, ZP6, ZP7) considerando algunas características morfológicas típicas de *Trichoderma* spp., como: micelio septado y ramificado, producción de conidióforos hialinos ramificados no verticilados, fíalides individuales cortas y generalmente en grupos

con medidas de 3.18-9.99x1.12-5.55 μm , conidios hialinos de una célula, ovoides nacidos en pequeños racimos terminales, globosos o subglobosos, oblongos u obovoides con medidas 2.33-7.73x1.99-6.12 μm y clamidosporas intercalares, terminales, subglobosas con tamaños de 5.18-11.93 μm (Barnett y Hunter, 1998; Samuels, 2006). En la Figura 8 se muestran las características de las 18 cepas, las cuales variaron en color, forma, número de anillos concéntricos, forma de esporulación y pigmentación del medio de cultivo.

Las cepas MB (Suelo de caña de azúcar) y CH1 (suelo de hongo Agarical) se identificaron morfológica y molecularmente, resultando como *Trichoderma harzianum* con hifas hialinas, conidióforos hialinos ramificados no verticilados, fiálides individuales o en grupo que median de 3.91-8.46 μm x 1.12-3.87 μm , conidios de una célula, subglobosas, obovoides o elipsoidales con tamaños que oscilaron en 3.10-5.10 x 2.13-4.88 μm y las clamidosporas midieron 5.18-10.98 μm . En la Figura 9 se muestran las características de conidióforos, fiálides y conidios de cepas representativas al género *Trichoderma*.

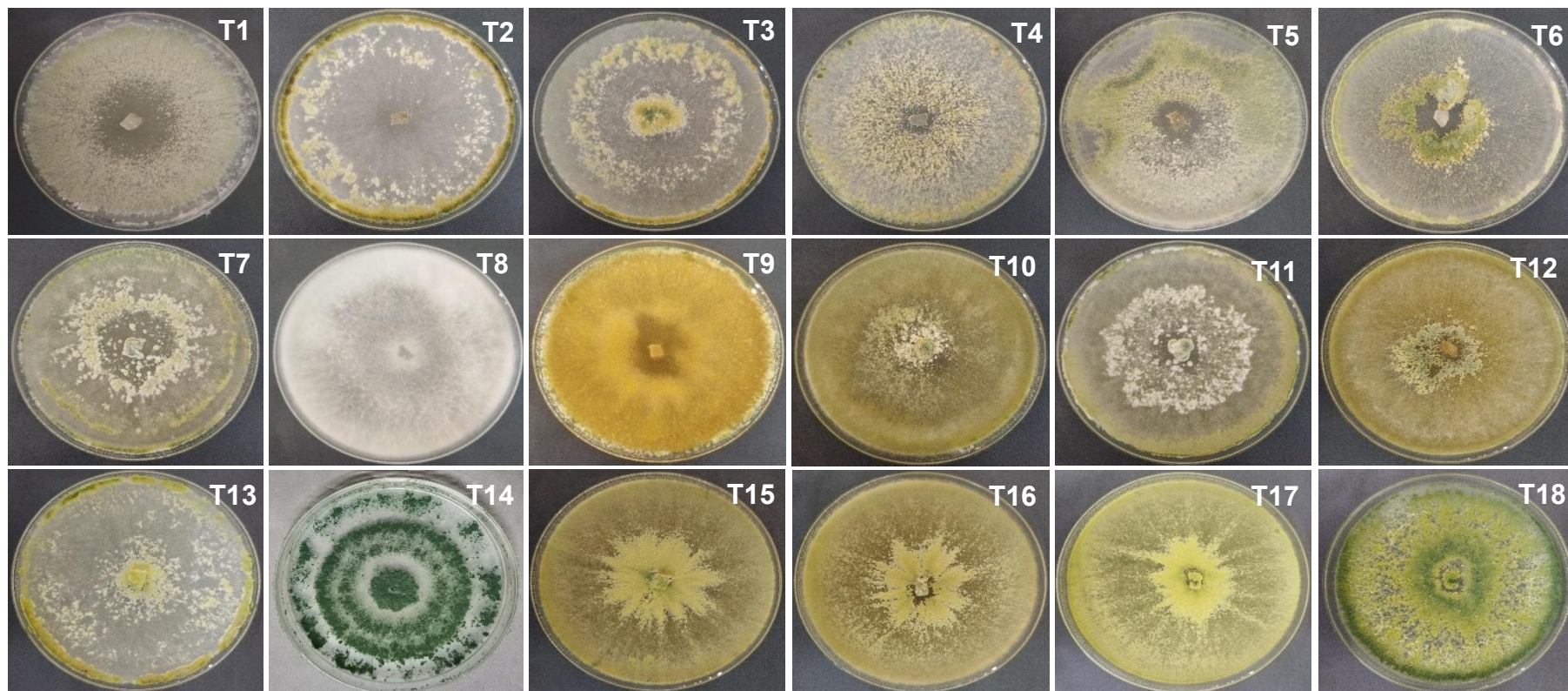


Figura 8. Características de las colonias de los 18 aislamientos nativos de *Trichoderma* spp.

Créditos: Silverio Jarquín-Cordero, 2022.

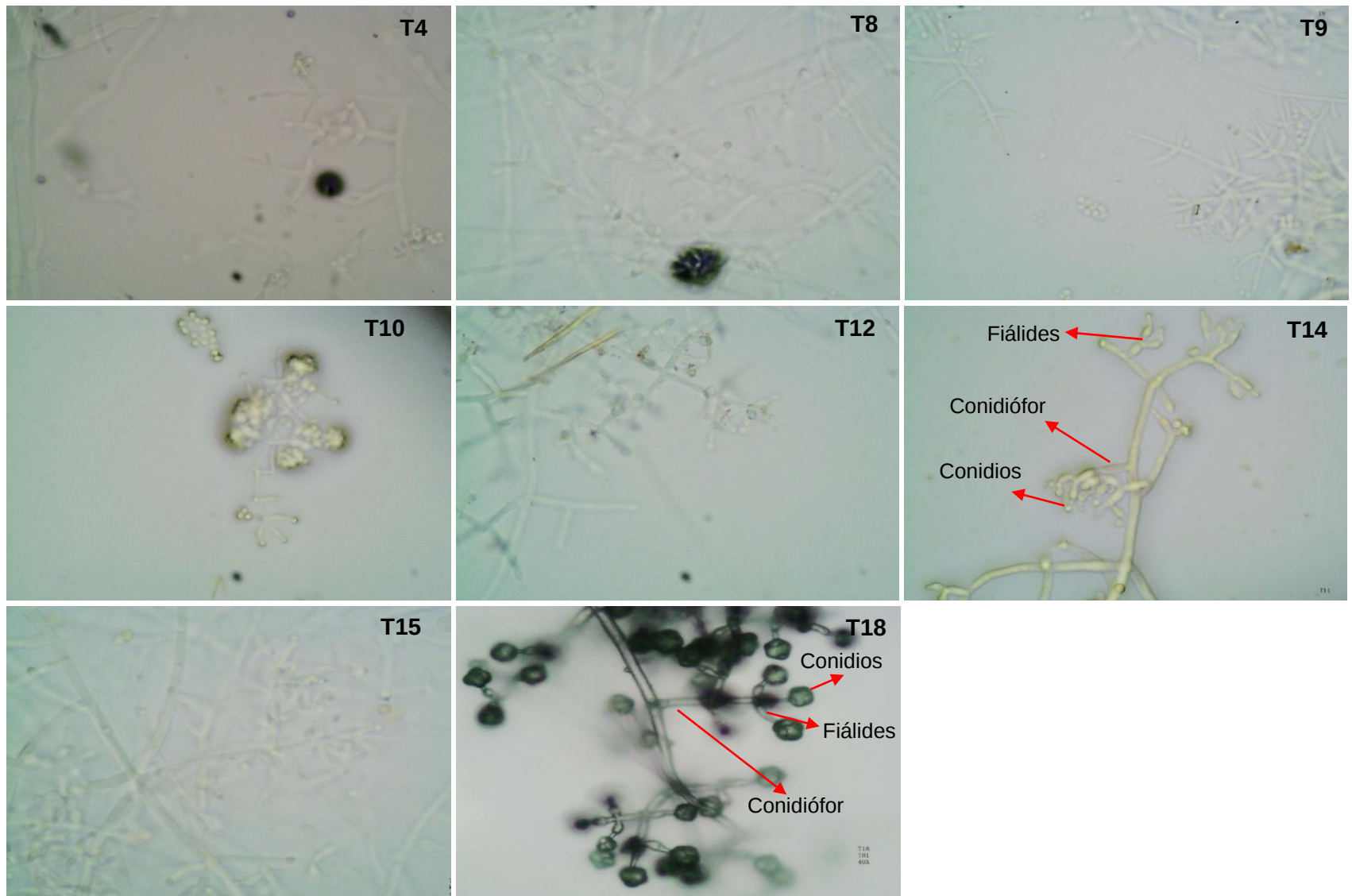


Figura 9. Características morfológicas de cepas representativas del género *Trichoderma*. (T14 y T18) Conidióforos, fiálides y conidios. Observado en aumento de 40x. Créditos: Silverio Jarquín-Cordero, 2022.

3.5.2. Identificación molecular

Del total de cepas caracterizadas a nivel género, el T8 (MB=ANTS6) y T15 (CH1=ANT5) fueron confirmadas mediante identificación molecular, con la comparación de secuencias obtenidas en el banco de genes del NCBI, resultando que ambas muestras se identificaron dentro de la especie *Trichoderma harzianum*. Como resultado de la amplificación del fragmento ITS1 e ITS4, se obtuvo el gel de la Figura 10 donde se muestran las bandas para cada cepa nativa de *Trichoderma* spp.

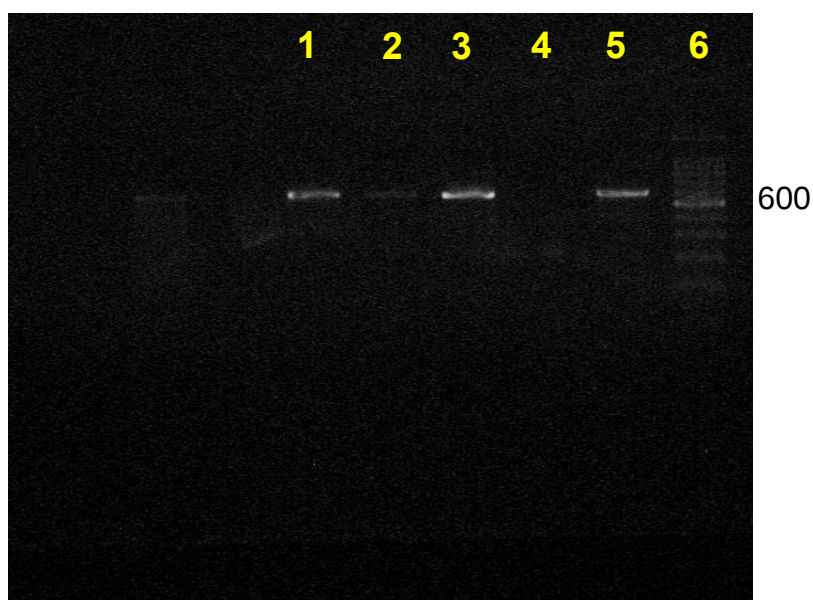


Figura 10. Amplificación del producto PCR en gel de agarosa al 1 %. Carril 1: T15 (CH1)= *Trichoderma* spp.: Carril 3: T8 (MB)= *Trichoderma* spp.: Carril 4: Negativo: Carril 5: Positivo. Carril 6: Marcador de Peso Molecular de 1 kb (Promega).

Para la reconstrucción filogenética de las secuencias de los *Trichodermas*, se infirió por el método de Neighbour-Joining con 1000 repeticiones de bootstrap (Felsenstein, 1985). Se seleccionaron ocho secuencias obtenidas del Blast y el resultado fue: presentaron 100 % de similitud con número de accesoión MH368147.1 (*T. harzianum*), KR868390.1 (*T. harzianum*), KT285894.1 (*T. harzianum*), MN263160.1 (*T. harzianum*), MT441597.1 (*T. lixii*), MK752565.1 (*T.*

harzianum), KP263602.1 (*T. harzianum*) y KP263734.1 (*T. harzianum*). El árbol filogenético construido evidenció la relación evolutiva entre los *Trichodermas* (ANTS5 y ANTS6) con otras especies del género *Paramyrothecium* y mostró que estos *Trichodermas* están emparentados con *T. harzianum*, número de accesoión MK752565.1 en un soporte de 62 % (Figura 11).

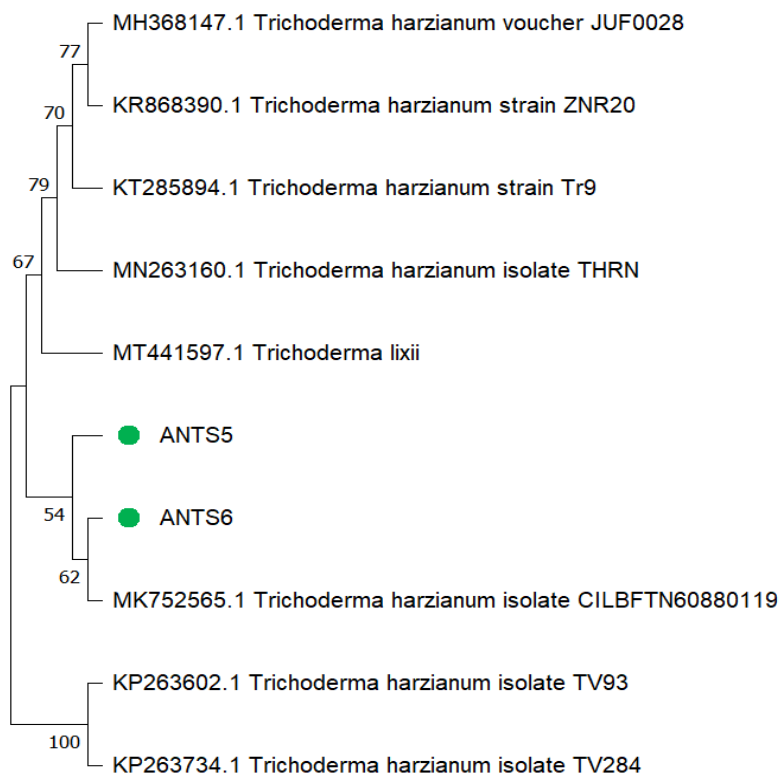


Figura 11. Árbol filogenético de las secuencias de *Trichoderma* correspondiente al punto color verde (ANTS5 y ANTS6) con otras ocho secuencias de *Trichodermas* spp., disponibles en el Genbank. Se usó el método de Neighbour-Joining de la región espaciadora interna transcrita (ITS) con 1000 repeticiones de Bootstrap. El análisis involucró 10 secuencias de nucleótidos.

3.5.3. Días al primer contacto entre hifas

Del tratamiento 1 al 7 y del 9 al 18, ambos microorganismos tuvieron contacto hifal a los 4 días después de la siembra en confrontación dual y únicamente el tratamiento 8 tuvo contacto con el patógeno a los 3 días. Se observó que

Paramyrothecium roridum detuvo su crecimiento al momento de tener contacto con los *Trichoderma* spp., siendo superado por el controlador biológico en competencia por espacio y nutrientes.

3.5.4. Clasificación del antagonismo

Derivado de la clasificación de antagonismo propuesta por Bell *et al.* (1982), se obtuvieron 6 cepas de *Trichoderma* spp., con clasificación tipo 1 (*Trichoderma* spp. sobrecreció completamente al fitopatógeno y cubrió el 100 % la superficie del medio de cultivo de la caja Petri), las cuales fueron: T2, T4, T6, T10, T14, T18, y los 12 restantes se clasificaron como tipo 2 (*Trichoderma* spp. cubrió el 75 % de la superficie del medio de cultivo en la caja Petri, detuvo al fitopatógeno y esporuló sobre él), correspondiendo al T1, T3, T5, T7, T8 (*T. harzianum*), T9, T11, T12, T13, T15 (*T. harzianum*), T16, T17. Estos resultados muestran la gran capacidad de los *Trichoderma* para crecer en un nicho ecológico compartido con *Paramyrothecium roridum* y la velocidad de desarrollo de estos organismos como controladores biológicos y superando al patógeno en competencia por un mismo espacio.

3.5.5. Porcentaje de inhibición

El porcentaje de inhibición fluctuó de 7.11 a 17.52 % (Cuadro 2), los tratamientos se dividieron en dos grupos, en el primer grupo estuvieron los de mayor porcentaje de inhibición, los cuales fueron: T17 (13.07 %), T4 (13.22 %), T2 (13.73 %), T8 (14.25 %), T15 (14.84 %), T7 (15.03 %) T3 (16.59 %) y T12 (17.52 %). El segundo grupo se conformó con los tratamientos de menor porcentaje de inhibición, correspondientes al T16 (7.11 %), T10 (7.92 %), T11 (8.78 %), T14 (9.71 %), T9 (9.91 %), T13 (10.10 %), T6 (10.37 %), T18 (11.10 %), T1(11.26 %) y T5 (12.64 %). En la Figura 12 se muestran las confrontaciones duales.

Cuadro 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *P. roridum* debido a cepas nativas de *Trichoderma* spp

TRATAMIENTOS	VCD	% CRECIMIENTO	% INHIBICIÓN	DPCH	CLASIFICACIÓN
1	6.13 ba	88.73 ba	11.26 ba ¹	4	2 ^z
2	5.96 b	86.26 b	13.73 a	4	1 ^y
3	5.76 b	83.40 b	16.59 a	4	2
4	6.00 b	86.77 b	13.22 a	4	1
5	6.04 ba	87.35 ba	12.64 ba	4	2
6	6.19 ba	89.62 ba	10.37 ba	4	1
7	5.87 b	84.96 b	15.03 a	4	2
8	5.92 b	85.74 b	14.25 a	3	2
9	6.23 ba	90.08 ba	9.91 ba	4	2
10	6.36 ba	92.08 ba	7.92 ba	4	1
11	6.30 ba	91.21 ba	8.78 ba	4	2
12	5.70 b	82.47 b	17.52 a	4	2
13	6.21 ba	89.89 ba	10.10 ba	4	2
14	6.24 ba	90.28 ba	9.71 ba	4	1
15	5.88 b	85.15 b	14.84 a	4	2
16	6.42 ba	92.88 ba	7.11 ba	4	2
17	6.01 b	86.92 b	13.07 a	4	2
18	6.14 ba	88.89 ba	11.10 ba	4	1
19	6.92 a	100.00 a	0.00 b		
CV	6.35	6.35	49.24	-----	-----
DMS	0.89	12.96	12.96	-----	-----

VCD= Velocidad de Crecimiento Diametral (mm día⁻¹). DPCH= Días al Primer Contacto Hifal.¹medias seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$). ^z *Trichoderma* spp., cubre 75 % de la caja Petri, detiene al patógeno, puede sobrecrecerlo y esporular sobre el. ^y*Trichoderma* spp., sobrecrece al patógeno y cubre el 100 % de la caja Petri. CV= Coeficiente de variación. DMS= Diferencia Mínima Significativa.

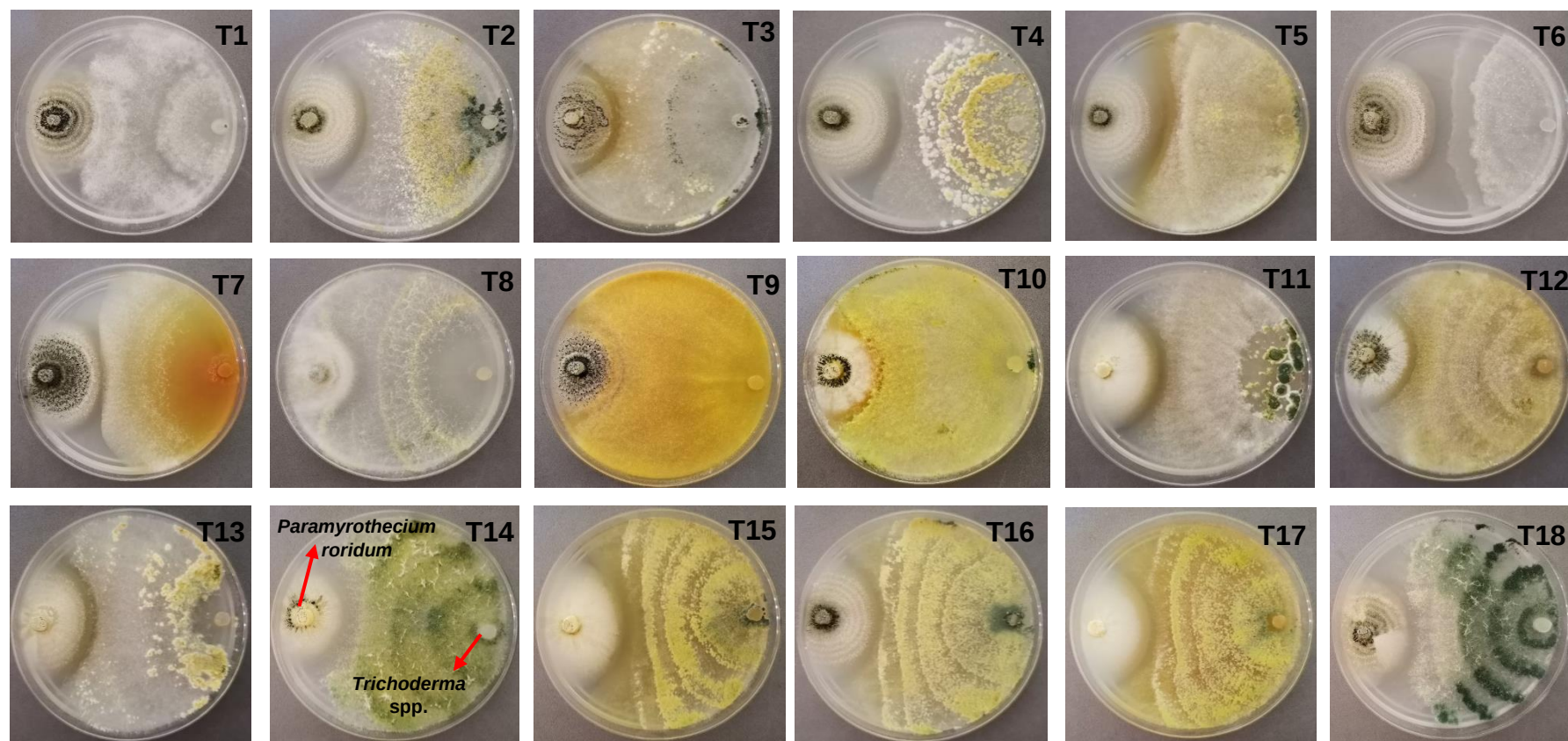


Figura 12. Confrontaciones duales de cepas nativas de *Trichoderma* spp., contra *P. roridum* desarrollados en medio de cultivo PDA e incubadas a 28 ± 2 °C. Créditos: Silverio Jarquín-Cordero, 2022.

3.6. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo demostraron que las cepas de los aislamientos nativos de *Trichoderma* spp. tienen la capacidad de presentar algún efecto de control en condiciones *in vitro* sobre el crecimiento de *Paramyrothecium roridum* agente causal de la mancha foliar en plántulas de cafeto. Se obtuvieron 18 cepas que presentaron características morfológicas típicas del género *Trichoderma* spp. (Barnett y Hunter, 1998; Samuels, 2006), sin embargo, aunque las características morfológicas son de utilidad para identificar al género, muchas veces puede existir confusión para distinguir entre especies, por lo tanto, es necesario confirmar la identificación morfológica con métodos moleculares (Hermosa *et al.*, 2000; Shores y Harman, 2008). Del total de cepas aisladas, se identificó al T8 (MB) y T15 (CH1), considerándolas cepas representativas y resultaron como *T. harzianum* mediante identificación molecular. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Sánchez *et al.* (2017) quienes aislaron cepas nativas de *Trichoderma* spp. provenientes de suelo de las zonas productoras de frijol en Celaya, Guanajuato y mediante técnicas moleculares, identificaron a *T. harzianum* y *T. asperellum*.

Autores como Lieckfeldt, *et al.* (1998) y Lewis y Papavizas (1984) mencionan que el género *Trichoderma* spp. es considerado cosmopolita y como hongos saprofitos altamente competitivos contra hongos fitopatógenos. Específicamente las especies de *Trichoderma* spp., son prospectos potenciales para el biocontrol por producir grandes cantidades de clamidosporas (estructuras de resistencia) aumentando su capacidad de supervivencia en condiciones extremas en diferentes nichos ecológicos. Esta característica contribuye a evitar la introducción del hongo patógeno gracias a su agresividad para colonizar y establecerse *in situ*.

Por otro lado, Kucuk y Kivanc (2003) mencionan que las características morfológicas son generalmente muy variables y que los aislamientos de *Trichoderma* spp., a menudo pueden identificarse fácilmente hasta el género

considerando una morfología distintiva que incluye un crecimiento rápido, pigmentos conidiales de color verde brillante o blanco y una ramificación en conidióforos y fialides. Sin embargo, según Druzhinina y Kubicek (2003) los análisis morfológicos son muy propensos a errores y más de la mitad de los *Trichoderma* spp. que han sido depositados en la colección de cultivos reciben nombres morfológicamente incorrectos.

Por ejemplo, Bissett (1991) mencionó que realizar únicamente una identificación morfológica hasta género *Trichoderma* spp., sería compleja ya que la estructura de ramificación del conidióforo es muy variable y en muchos casos, se asemeja superficialmente a géneros como *Verticillium* spp. y *Gliocladium* spp. En la mayoría de estos casos, los anamorfos de *Trichoderma* se pueden diferenciar por tener un patrón de ramificación menos regular en un número indefinido de niveles, a diferencia de la ramificación verticilada o biverticilada más regular en *Verticillium*; y la producción de una disposición penicilada terminal de ramas y de fialides acumulados en un estípote relativamente bien definido en el caso de *Gliocladium*. En otras palabras, los conidióforos similares a *Trichoderma* no pueden tomarse como un argumento para excluir o incluir especies al género *Trichoderma*. Por lo tanto, el uso de análisis de secuencias de genes se está volviendo cada vez más popular y puede completar la mayoría de los análisis filogenéticos (Druzhinina y Kubicek, 2003; Liu *et al.*, 2004; Szekeres, 2005; Jomin y Akarapisan, 2009).

Referente al contacto entre hifas, los resultados de este estudio son similares a lo reportado por Romero *et al.* (2021), quienes en confrontaciones duales de *Trichoderma* spp., contra *P. parasitica*, *F. oxysporum*, *C. cassicola* y *Coniella diplodiella* las hifas de ambos microorganismos hicieron contacto en promedio a los 3.25 días después de la siembra. Michel *et al.* (2019) en evaluaciones de confrontaciones duales utilizaron *Trichoderma* spp., contra aislados de *P. parasitica* y *F. oxysporum* aislados del cultivo de Jamaica, las hifas de ambos microorganismos hicieron contacto a los 3 y 4 días después de la siembra y

reportaron nulo crecimiento de los patógenos al momento del contacto con los agentes biológicos.

Esparza (2009), obtuvo resultados similares a los obtenidos en este estudio, documentando que en todos los tratamientos de confrontaciones duales en condiciones *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra *P. parasítica* las hifas hicieron contacto a los 4 días después de la siembra y se detuvo el crecimiento del patógeno; de la misma forma Ezziyyani *et al.* (2007) mencionan que *T. harzianum* detiene el crecimiento de *Phytohthora capsici* al momento del contacto hifal y que esto se debe a la activación de los mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. al detectar confrontación de un patógeno.

En este contexto, autores como Ghazanfar *et al.* (2018) mencionan que cuando *Trichoderma* spp. tiene contacto con el hongo patógeno activa sus mecanismos de acción con la intención de colonizarlo, sobrecrecerlo y reducir el desarrollo del agente causal mostrando su capacidad de micoparasitismo y producción de quitinasas y glucanasas principalmente.

Romero (2014) reportó que todos los tratamientos evaluados en confrontaciones duales de *Trichodermas* spp. contra aislados de *P. parasítica* y *F. oxysporum* hicieron contacto a los 4 días después de la siembra y que al momento del contacto detuvieron su crecimiento. Dennis y Webster (1971), mencionan que algunos aislados de *Trichoderma* spp. producen antibióticos no volátiles que causan la inhibición del crecimiento de colonias de patógenos después del contacto con las hifas, de la misma manera Sivakumar *et al.* (2000) señalan que especies de *Trichoderma* spp. producen metabolitos tóxicos los cuales están implicados en la interrupción del crecimiento del agente fitopatógeno.

De acuerdo con la clasificación de antagonismo propuesta por Bell *et al.* (1982), las cepas T8 (MB) y T15 (CH1), ambas identificadas como *T. harzianum* se clasificaron como tipo 2, seguidas del T1, T3, T5, T7, T8, T9, T11, T12, T13, T15, T16 y T17. En la clasificación 1, estuvieron el T2, T4, T6, T10, T14 y T18. Estos resultados indican que todas las cepas nativas de *Trichoderma* spp. poseen una

capacidad de crecimiento rápido sobre *P. roridum*; característica que evidencia una fuerte actividad antagonica y por lo tanto mientras mayor sea la superficie colonizada por el antagonista, mayor será el dominio sobre el patógeno.

Romero (2014) clasificó a cinco cepas de *Trichoderma* spp. contra *P. parasítica* en la clase 1 y contra *F. oxysporum* las mismas cepas se ubicaron en clasificación de antagonismo tipo 2.

Michel *et al.* (2019) reportaron que cinco cepas de *Trichoderma* spp. cubrieron por completo la colonia de *P. parasítica* y se ubicaron en la Clase 1 de antagonismo y en la confrontación dual entre las mismas cepas de *Trichoderma* spp. contra *F. oxysporum* todas presentaron la clase de antagonismo tipo 2, en la escala propuesta por Bell *et al.* (1982).

Ramos *et al.* (2008) y Hermosa *et al.* (2012) reportan que los aislados de una misma especie del género *Trichoderma* spp. pueden presentar comportamientos distintos frente a un mismo hongo fitopatógeno, como consecuencia de la variabilidad que puede existir entre aislamientos del fitopatógeno de la misma especie y también debido a la selectividad de *Trichoderma* spp. para producir mayor o menor cantidad de enzimas que hidrolizan paredes celulares, característica que está correlacionada con la capacidad micoparasítica, producción de compuestos antibióticos y fungistáticos.

Con respecto a los porcentajes de inhibición del crecimiento diametral de *P. roridum* causada por las colonias de los aislados de *Trichoderma* spp., los resultados indicaron que en todas las confrontaciones redujeron significativamente el tamaño del patógeno, inhibiendo su desarrollo. Romero *et al.* (2021) reportaron porcentajes de inhibición del 75-95 % en aislados de *Trichoderma* spp. contra cepas de *Phytophthora parasítica* asociado al manchado de cáliz en Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). Por su parte Michel *et al.* (2013), evaluaron aislados de *T. virens* y *T. harzianum* en pruebas *in vitro* contra *F. oxysporum* y *F. subglutinans* aislados de tejido vegetal del mango, reportando inhibiciones superiores al 60 %, y consideraron a estos aislados como agentes

potenciales de control biológico de la enfermedad. Del mismo modo, Espinoza *et al.* (2019), reportaron porcentajes de inhibición del 54.9 a 74.1 % en aislados de *Trichoderma asperellum* y de 54.9 a 64.7 % en aislados de *T. harzianum* contra cepas de *Fusarium* sp. provenientes de tejido de raíz y tallo en melón (*Cucurbita melon*). Otros autores, como Sánchez *et al.* (2017) reportaron inhibiciones del 70 % de *T. harzianum* y *T. asperellum* mediante pruebas *in vitro* contra *Fusarium* spp. y *R. solani* aislados de raíces en frijol. A fin de entender las diferencias en los porcentajes de inhibición entre los diferentes aislamientos de *Trichoderma* spp., Corrêa *et al.* (2007), Ruocco *et al.* (2009) y Badar y Qureshi, (2012) mencionan que las diferencias en el porcentaje de inhibición entre aislamientos de una misma especie de *Trichoderma* spp., se debe a la discrepancia que hay en la actividad enzimática (quitinasas y glucanasas) que actúan sobre la hidrólisis de paredes celulares que limitan el crecimiento micelial y pueden estar relacionado con la tasa de síntesis de metabolitos difusibles al medio de cultivo que ejercen un efecto antagónico contra los agentes patógenos.

Autores como Yang *et al.* (2006), Monteiro *et al.* (2010) y Zivkovic *et al.* (2010) refuerzan lo reportado por los autores anteriores, mencionando que la limitación de la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. reflejado en el porcentaje de inhibición contra patógenos como *Rhizoctonia solani*, *Curvularia lunata*, *Bipolaris sorokiniana* y *Colletotrichum gloeosporioides* se debe a la capacidad para producir metabolitos secundarios en el medio de cultivo. Los metabolitos volátiles como 6-pentil-a-pirona (6PP) y la mayoría de los derivados de isocianuro; compuestos solubles en agua; y peptaiboles, que son oligopéptidos lineales de 12 a 22 aminoácidos ricos en ácido α -aminoisobutírico y N-acetilados. (Le Doan *et al.*, 1986; Rebuffat *et al.*, 1989; Harman *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008). Estos metabolitos inducen la producción de enzimas y desencadenan una cascada de cambios fisiológicos, estimulando el desarrollo de *Trichoderma* spp. logrando reducir el crecimiento del patógeno (Zeilinger *et al.*, 1999).

A pesar de los ejemplos mencionados, no se han encontrado estudios a nivel mundial sobre el uso de *Trichoderma* spp., como agentes de control biológico en

el manejo de la mancha foliar causada por *P. roridum* en el cultivo de cafeto y son poco los autores que reportan hallazgos preliminares evaluando confrontaciones duales en condiciones *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra *P. roridum* aislado de diferentes cultivos, entre ellos Fujinawa *et al.* (2020) reportan que en evaluaciones *in vitro* usando *Trichoderma asperellum* contra *P. roridum* que fue aislado del cultivo de begonia, el agente biológico produjo 26 % de inhibición en el desarrollo del patógeno y Kanherkar (2016) en un estudio realizado para investigar las actividades antimicóticas mediante el método de confrontación dual de *Trichoderma viride* y *T.harzianum* contra *Myrothecium roridum* aislado del cultivo de algodón obtuvo que *T. harzianum* fue el más eficaz con el crecimiento más rápido para controlar al patógeno al quinto día después de la siembra.

Hutchinson (1971) reporta que la selección de antagonistas después de obtener resultados de confrontaciones duales contra hongos fitopatógenos en medio de cultivos son útiles pero no garantiza buenos resultados de los agentes biológicos en invernadero y campo; los resultados en condiciones *in vitro* únicamente indican capacidades potenciales y los buenos resultados estarían condicionados por el balance de la producción y pérdida de metabolitos, así como de la sensibilidad de los controladores biológicos en cada ecosistema. Se tienen la ventaja de que las cepas de *Trichoderma* spp. evaluados en este trabajo son nativas de regiones productoras de café en México, por lo que resultados de evaluaciones futuras en campo podrían ser prometedoras gracias a su adaptación a las condiciones ambientales *in situ*. Parmar *et al.* (2015) especifica que uno de los principales problemas del control biológico de fitopatógenos es que los organismos empleados no están adaptados a las condiciones ambientales locales donde serán aplicados y la producción enzimática se ve afectada, disminuyendo el potencial antagónico. Es importante llevar esta investigación a las fases de invernadero y campo a fin de evaluar la capacidad de *Trichoderma* spp., obtenidos en este estudio e incorporarlos en un esquema de manejo integrado y ecológico fitosanitario *in vivo* en el cultivo de cafeto en México y sus regiones productoras.

3.7. LITERATURA CITADA

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3): 403 - 410.
- Aderolu, I. A., Babalola, F. D., Ugioro, O., Anagbogu, C. F., Ndagi, I., Mokwunye, F. C., Mokwunye, I. U., Idrisu, M., Asogwa, E. U. (2014). Production and marketing of Coffee (*Coffea robusta*) in Kogi State, Nigeria: Challenges and recommendation for intervention. *JOURNAL OF SOCIAL SCIENCE RESEARCH* 3(2): 207-215. <https://doi.org/10.24297/jssr.v3i2.3559>.
- Adugna, G. (1997). Status and economic importance of *Fusarium* wilt disease of Arabica coffee in Ethiopia. In: Hakiza G, Birkunzira B, Musoli P (eds.) *Proceedings of the first Regional Workshop on Coffee Wilt Disease*. International Conference Centre, Kampala, Uganda. pp.53-61.
- Asghar, H., Mohammad, P. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of biological science* 10: 273-290.
- Badar, R. y Qureshi, S. A. (2012). Use of *Trichoderma hamatum* alone and in combination with rhizobial isolates as bio-fertilizer for improving the growth and strength of sunflower. *Journal of Basic and Applied Scientific Research* 2: 6307-6314.
- Barnett, H.L., y Hunter, B.B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. (4th Ed). The American Phytopathological Society; St. Paul, Minnesota, USA. pp. 218. <https://doi.org/10.2307/3757954>.
- Bell, D. K., Wells, H. D., and Markham, C. R. (1982) *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72:379-382, <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-379>.
- Bieysse, D., Cilas, C., Mouen, J., Musoli, P., Avelino, J. (2008). Coffee Disease Risk Analysis: How Epidemiology Knowledge Could Help In Assessing and Preventing Disease Invasion. *Proceedings of 22nd International Conference on Coffee Science*, pp. 1422-1423.
- Bissett, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany* 69: 2357 – 2372.
- Corrêa, S., Mello, M., Ávila, Z. R., Braúna, L. M., Pádua, R. R., Gomes, D. (2007). Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad* 11(1): 3-9. <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209116144001.pdf>.
- Dechassa, N. (2019). Occurrence, Distribution, Biology and Management of Coffee Thread Blight (*Corticium koleroga* (Cke) Hoehnel): A Review. *Journal of Environment and Earth Science*. ISSN 2224-3216 (Paper) ISSN 2225-0948 9(2): 6. <https://core.ac.uk/download/pdf/234665404.pdf>.
- Dellaporta, S. J. and Hicks, J. (1983). A plant DNA miniprep. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
- Dennis, C., Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society* 57:41-48.

- Derso, E., Gebrezigi, T., Aduagna, G. (2000). Significance of Minor Diseases of *Coffea arabica* L. in Ethiopia. A Review In: Proceedings of the Workshop on Control of Coffee Berry Disease in Ethiopia. Addis Ababa, Ethiopia. pp. 58-65.
- Druzhinina, I., and Kubicek, C. P. (2003). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. *J. Zhejiang Universitas Scientiarum* 6(2):110–112.
- Esparza, L. L. L. (2009). Efectividad *In vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en aislados de *Phytophthora parasítica* D. obtenidos de plantas de Jamaica. Colegio de Postgraduados. Tesis de Maestro en Ciencias. 69 p.
- Espinoza, A. C. A., Gallegos, M. G., Hernández, C. F. D., Ochoa, F. M., Cepeda, S. M., Castillo, R. F. (2019). Antagonistas microbianos a *Fusarium* spp., como agente causal de pudrición de raíces y tallo en melón. *Ecosistemas y recursos agropecuarios* 6(16): 45-55. <https://doi.org/10.19136/era.a6n16.1843>.
- Ezziyyani, M., Requena, M E., Egea, G. C., Candela, M. E. (2007). Biological control of *Phytophthora* root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *Phytopathology* 155:342-349.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Fujinawa, M. F., de Carvalho Pontes, N., Borel, F. C., de Almeida Halfeld-Vieira, B., de Goes, A., and Boechat Morandi, M. A. (2020). Biological control of gray mold and *Myrothecium* leaf spot in begonias. *Crop Protection* 133(2020): 105138. doi:10.1016/j.cropro.105138.
- Ghazanfar, M. U., Raza, M., Raza, W., Qamar, M.I. (2018) *Trichoderma* as potential biocontrol agent, its exploitation in agriculture: a review. *Plant Protection* 2:109-135.
- Govindiah, Sengupta, K., Sharma, D. D., Gargi, G. (1989) A new leaf spot disease of mulberry caused by *Myrothecium roridum* Tode ex Fr. *Current Science* 58:398.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M., (2004). *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 1(2) pp. 43-56.
- Hermosa, M. R., Grondona, I., Iturriaga, E. A. (2000). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Appl Environ Microbiol* 66:1890–1898.
- Hermosa, R., Viterbo, I. A., Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158:17-25. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052274-0>.
- Hutchinson, S. A. (1971). Biological activity of volatile fungal metabolites. *Transactions of the British Mycological Society* 57:185-200.
- Infante, D., Marinez, B., Peteira, B., Reyes, Y., Herrera, A. (2013). Identificación molecular y evaluación patogénica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *Rhizoctonia solani* Kühn. *Biotecnología Aplicada* 30:17-22.
- Jom-in, S., Akarapisan, A. (2009). Characterization of double-stranded RNA in *Trichoderma* spp. isolates in Chiang Mai province. *Journal Agricultura Tecnológica* 5(2):261–270.

- Kagezi, G., Kucel, P., Olal, S., Pinard, F., Seruyange, J., Musoli, P., Kangire, A. (2015). *In vitro* inhibitory effect of selected fungicides on mycelial growth of ambrosia fungus associated with the black coffee twig borer, *Xylosandrus compactus* Eichhoff (Coleoptera: Curculionidae) in Uganda. African Journal of Agricultural Research 10(23), 2322-2328.
- Kanherkar, S. H. (2016). Antimycotic activities of some rhizosphere fungi against *Myrothecium roridum* causing leaf spot of cotton. The Journal of Indian Botanical Society 9: 0019-4468. <https://indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:jibs&volume=93&issue=1a&nd2&article=015>.
- Kucuk, C., Kivanc, M. (2003). Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical, and physiological features. Journal of Biology 27: 247-253.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016). Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution, 33: 1870-1874.
- Le Doan, T., El-Hajji, M., Rebuffat, S., Rajeswari, M. R., Bodo, B. (1986). Fluorescein studies on the interaction of trichorzianine A IIIc with model membranes. Biochimica et Biophysica Acta 858: 1–5.
- Lewis, J. A., and Papavizas, G. C. (1984). Chlamydospore formation by *Trichoderma* spp. in natural substrates. Canadian Journal of Microbiology 30: 1–7.
- Lieckfeldt, E., Kuhls, K., Muthumeenakshi, S. (1998). Molecular taxonomy of *Trichoderma* and *Gliocladium* and their teleomorphs. In: Kubicek C P, Harman G E, editors. *Trichoderma* and *Gliocladium*. London, United Kingdom: Taylor & Francis Ltd. pp. 35–56.
- Liu, X., Zhuang, J. H., Gao, Z. G., Yang, C. C., Chen, J. (2004). Construction of engineering *Trichoderma* strains and their characteristics against tomato gray 30:419–420.
- Michel, A. A. C., Hernández, M. J., Toledo, A. R., Sabino, L.J. E., Romero, R. T. (2019). CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE *Trichoderma* spp. NATIVA CONTRA *Phytophthora parasitica* Y *Fusarium oxysporum* AISLADOS DE CULTIVOS DE JAMAICA. Rev. Fitotec. Mex 42(3): 235 – 241.
- Michel, A. A. C., Otero, S. M. A., Ariza, Flores. R., Barrios, A. A., Alarcón, C. N. (2013). Eficiencia biológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en el control de *Sclerotium rolfsii* Sacc., en cacahuete. Avances en Investigación Agropecuaria 17(3): 89-107. <https://www.redalyc.org/pdf/837/83728497008.pdf>.
- Monteiro, V. N., Silva, R. N., Steindorff, A. S., Costa, F. T., Noronha, E. F. (2010) New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. Curr Microbiol 61: 298–305.
- Murkai, R., Kawakita, H., Shirata, A. (2002). Infection behavior of conidia of *Myrothecium roridum* on mulberry leaf and cytological changes of leaf cells infected with the fungus. Sericologia 42:19-31.
- Pappachan, A., Tabiyo, K., Rahul, K., Trivedy, K. (2019). Isolation and molecular identification of potential bacterial antagonist for the management of brown leaf spot of mulberry. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 8(3):

4098-4103.

<https://www.phytojournal.com/archives/2019/vol8issue3/PartBI/8-3-516-725.pdf>.

- Parmar H. J., N. P. Bodar, H. N. Lakhani, S. V. Patel, V. V. Umrana and M. M. Hassan (2015) Production of lytic enzymes by *Trichoderma* strains during *in vitro* antagonism with *Sclerotium rolfsii*, the causal agent of stem rot of groundnut. African Journal of Microbiology Research 9:365-372, <https://doi.org/10.5897/AJMR2014.7330>.
- Quispe-Apaza, C., Mansilla-Samaniego, R., López-Bonilla, C., Espejo-Joya, R., Villanueva-Caceda, J., y Monzón, C. (2017). Genetic diversity of *Hemileia vastatrix* of two coffee producing areas in Perú. Revista Mexicana de Fitopatología 35(3): 418 - 436.
- Ramos, A. S., Fiaux, Leite, S. G. F. (2008). Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentation. Brazilian Journal of Microbiology 39:712-717.
- Rebuffat, S., El Hajji, M., Hennig, P., Davoust, D., Bodo, B., (1989). Isolation, sequence and conformation of seven trichorzianines B from *Trichoderma harzianum*. International Journal of Peptide and Protein Research 34:200–210.
- Robert, C. E. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5): 1792-1797.
- Romero, R. T. (2014). Cepas nativas de *Trichoderma* spp., aisladas de suelo cultivado con Jamaica, su antibiosis y micoparasitismo sobre *Phytophthora parasítica* y *Fusarium oxysporum*. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Fitopatología. Tesis de Doctorado en Ciencias. 96 p.
- Romero, R. T., Acuña, S. J., Azuara, D. A., Lázaro, D. M. O., Monteon, O. A., Vargas, M. H., y Yulissa S. E. Y. (2021). IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN ANTAGÓNICA IN VITRO DE CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp. SOBRE HONGOS FITOPATÓGENOS ASOCIADOS AL MANCHADO DEL CÁLIZ EN JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.). Tropical and Subtropical Agroecosystems 24(24): 1870-0462.
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turrà, D., Woo, S. L. y Lorito, M. (2009). Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. Molecular plant-microbe interactions 22(3): 291-301. <https://doi.org/10.1094/mpmi-22-3-0291>.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL*. Ney York, EU: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuels, G. J. (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. Phytopathology 96(2): 195-206. <https://doi.org/10.1094/phyto-96-0195>.
- Sánchez, G. M. B. Espinosa, H. E., Villordo, P. E., Rodríguez, G. R., Mora, A. M. A. (2017). Identificación molecular y evaluación antagónica in vitro de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Montcalm. Agrociencia 51(1): 63-79. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v51n1/1405-3195-agro-51-01-00063-en.pdf>.

- Sandoval, I., y Stefanova, M. (2000). Efectividad de biopreparados de *Trichoderma* spp. en el control de los hongos fitopatógenos del suelo. Boletín Técnico (2).
- Shoresh, M., y Harman, G. E. (2008). The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: A proteomic approach. Plant Physiol 147:2147–2163.
- Sivakumar, D., Wilson, W., Wijesundera, R. L. C., Marikar, F. M. T., Abeyesekere, M. (2000). Antagonistic Effect of *Trichoderma harzianum* on postharvest pathogens of rambután (*Nephelium lappaceum*). Phytoparasitica 28(3): 240-247.
- Szekeres, A. (2005). Echophysiological and molecular investigation of *Trichoderma* strains isolated from winter wheat rhizosphere. Dissertation Summary. Acta Biologica Szegediensis 49:61.
- Tamura, K., Nei, M., and Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 101:11030-11035.
- Teferi, D., Adugna, G., Jafuka, C., Tesfaye, S., Zeru, A., Mesfin, S. (2008). Dynamics of Sporadic Diseases of Coffee in Ethiopia: A Review. In: Diversity and Knowledge; Proceeding of National Work shop Four Decades of Coffee Research and Development in Ethiopia. pp. 267-270.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., and Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. Soil Biology and Biochemistry 40: 1–10.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols a guide to methods and applications. London, United Kingdom: Academic Press. pp. 315 - 322
- Yang, D. M., Bi, Y., Chen, X. R., Ge, Y. H. and Zhao, J. (2006). Biological control of postharvest diseases with *Bacillus subtilis* (B1 strain) on muskmelons (*Cucumis melo* L. cv. Yindi). Acta Horticulturae 712: 735-740.
- Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S. L., Mach, R. L., Fekete, C., Lorito, M., Kubicek, C. P. (1999). Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. Fungal Genetics and Biology 26: 131–140.
- Zivkovic, S., Stojanovic, S., Ivanovic, Z., Gavrilovic, V. T., Popovic and Balaz, J. (2010). Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. Biological Sciences 62: 611-623.

3.8. CONCLUSIONES GENERALES

Las cepas identificadas morfológica y molecularmente confirmaron que *P. roridum* es el agente causal de la mancha foliar en plántulas de cafeto.

Los aislamientos nativos de *Trichoderma* spp. confirman la capacidad cosmopolita de este organismo y su diversidad.

Las cepas T8 (MB) y T15 (CH1) identificadas como *Trichoderma harzianum* mostraron los mejores resultados en condiciones *in vitro* por lo que se les consideran como las de mayor potencial de biocontrol contra *Paramyrothecium roridum*.

Estos resultados contribuyen al manejo agronómico de la mancha foliar de plántulas de cafeto en México y es un precedente en la búsqueda de alternativas de biocontrol de enfermedades con bajo impacto ambiental.

Se recomienda realizar pruebas en invernadero y campo para evaluar el verdadero potencial antagónico e inhibidor de las mejores cepas determinadas en este estudio a fin de constituir una alternativa viable y ecológica para los productores de cafeto en México.