

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**“SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HONGOS PROVENIENTES DE LA FILOSFERA DEL CAFÉ (*Coffea arabica* L.) CON CAPACIDAD BIOCONTROLADORA CONTRA FITOPATÓGENOS FÚNGICOS”**

Presentada por:

**KRISTEL IRMA GUTIERREZ MANCHAY**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGA**

Lima – Perú

**2022**

---

La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación  
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HONGOS PROVENIENTES  
DE LA FILOSFERA DEL CAFÉ (*Coffea arabica* L.) CON CAPACIDAD  
BIOCONTROLADORA CONTRA FITOPATÓGENOS FÚNGICOS”**

Presentada por:

**KRISTEL IRMA GUTIERREZ MANCHAY**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGA**

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

---

Dr. Ernesto Aldo Ormeño Orrillo  
PRESIDENTE

---

Mg. Sc. Patricia Angélica Moreno Díaz de Saco  
MIEMBRO

---

Dra. Luz Leonor Mattos Calderón  
MIEMBRO

---

Mg. Sc. Katty Ogata Gutiérrez  
ASESORA

---

Dra. Doris Elizabeth Zúñiga Dávila  
Co Asesora

## **DEDICATORIA**

Con mucho cariño, a mi madre, María Manchay, por apoyarme siempre en todo momento y motivarme a ser la mejor.

A mi hermano, por su gran corazón y enseñarme a nunca rendirme, y por ser una luz en mi vida que nunca se apagará.

A mi abuelo, por ser como mi padre, por los buenos consejos y enseñanzas, además de su gran alegría en cada reunión familiar.

A todos mis seres queridos, por estar siempre ahí, apoyándome.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi patrocinadora, la Mg. Sc. Katty Ogata, por permitirme realizar este trabajo dentro de su equipo, por su confianza, consejos y asesoría en el desarrollo de este trabajo, además de su gran paciencia, comprensión y por incentivar me constantemente. A mi co-asesora la Dra. Doris Zúñiga Dávila, quien me permitió desarrollar esta investigación en las instalaciones del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología, por darme la oportunidad de poder capacitarme y desarrollarme profesionalmente en su laboratorio.

Al Proyecto N° 007-2016-INIA-PNIA/UPMSI/IE “Estudio del microbioma de plantas de café susceptibles y resistentes a la roya amarilla como fuente de diversidad de agentes controladores mediante herramientas de metagenómica” y al Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología (LEMYB) – UNALM, por el financiamiento otorgado para desarrollar esta tesis.

A mi familia, por siempre haberme incentivado con la confianza y la fortaleza necesaria para salir adelante en la vida. A mi madre, por sus cuidados, comprensión, constancia y amor incondicional, por enseñarme a ser persistente y ayudarme a superarme cada vez más en la vida.

A los biólogos Jesús Lirio Paredes y Jhoselyn Rodríguez Alvarado, por su gran apoyo, consejos y trabajo en equipo para desarrollar este trabajo de investigación. Asimismo, agradezco a todos mis compañeros del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología (LEMYB), por su apoyo y cariño brindados durante este trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

|  |      |
|--|------|
| RESUMEN.....   | viii |
| ABSTRACT .....   | ix   |
| I. INTRODUCCIÓN .....  | 1    |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA.....  | 4    |
| 2.1. El cultivo de Café en el Perú .....   | 4    |
| 2.2. Hongos Fitopatógenos del café.....  | 6    |
| 2.2.1. <i>Collectotrichum sp.</i> .....  | 7    |
| 2.2.2. <i>Phoma sp.</i> .....  | 7    |
| 2.2.3. <i>Fusarium oxysporum</i> .....   | 8    |
| 2.2.4. <i>Hemileia vastatrix</i> .....   | 8    |
| 2.3. Hongos endófitos y epifitos de la filosfera.....  | 10   |
| 2.4. Influencia de los factores climáticos para la colonización de hongos<br>endófitos y epifitos.....         | 11   |
| 2.5. Control de las enfermedades causadas por los hongos fitopatógenos .....                                   | 12   |
| 2.6. Control Biológico.....  | 13   |
| 2.7. Estudio de Microorganismos Fúngicos como Controladores Biológicos .....                                   | 13   |
| 2.8. Competencia por nutrientes y espacio.....   | 15   |
| 2.9. Micoparasitismo y la producción de enzimas extracelulares líticas de<br>los hongos biocontroladores ..... | 15   |
| 2.10. Producción de antibióticos fúngicos en hongos biocontroladores.....                                      | 17   |
| III. METODOLOGÍA.....  | 18   |
| 3.1. Lugar de Ejecución .....  | 18   |
| 3.2. Material biológico .....  | 18   |
| 3.3. Materiales .....  | 18   |
| 3.4. Equipos e instrumentos .....  | 19   |

|  |    |
|--|----|
| 3.5. Reactivos y Medios de cultivo.....  | 19 |
| 3.6. Métodos.....  | 20 |
| 3.6.1. Análisis de muestras.....   | 20 |
| 3.6.2. Recuento y Aislamiento de hongos.....   | 20 |
| 3.6.3. Caracterización morfológica macroscópica de los hongos de<br>la filosfera del café .....  | 21 |
| 3.6.4. Criopreservación de hongos.....   | 21 |
| 3.6.5. Ensayo <i>in vitro</i> para pre-seleccionar hongos con capacidad<br>antagónica contra patógenos fúngicos cultivables:<br><i>Colletotrichum sp.</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Phoma sp.</i> ..... | 22 |
| 3.6.6. Evaluación de la producción de enzimas hidrolíticas por<br>los hongos antagonistas .....  | 23 |
| 3.6.7. Caracterización morfológica microscópica de los hongos<br>antagonistas.....   | 24 |
| 3.6.8. Ensayo <i>in vitro</i> para evaluar la capacidad de inhibir la<br>germinación de las esporas de los hongos fitopatógenos<br><i>Colletotrichum sp.</i> , y <i>Fusarium oxysporum</i> .....               | 24 |
| 3.6.9. Ensayo <i>in vitro</i> para evaluar la capacidad de inhibir la<br>germinación de las esporas de <i>Hemileia vastatrix</i> .....   | 25 |
| 3.6.10. Evaluación de los componentes antifúngicos solubles presentes<br>en los cultivos filtrados de los hongos antagonistas sobre el<br>crecimiento del hongo fitopatógeno .....                             | 27 |
| 3.6.11. Ensayo <i>in vitro</i> para evaluar la capacidad de parasitar a <i>H.</i><br><i>vastatrix</i> .....  | 27 |
| 3.6.12. Análisis filogenético de los hongos antagonistas.....  | 28 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSION .....   | 31 |

|  |    |
|--|----|
| 4.1. Aislamiento y Caracterización Macroscópica de la diversidad fúngica de la filósfera del Café en plantas susceptibles y resistentes a la Roya Amarilla.....                          | 31 |
| 4.2. Primera pre-selección de los hongos de la filósfera con capacidad antagónica contra <i>Colletotricum sp.</i> .....  | 32 |
| 4.3. Segunda pre-selección de los hongos de la filósfera con capacidad antagónica contra <i>Fusarium oxysporum.</i> y <i>Phoma sp.</i> .....   | 34 |
| 4.4. Evaluación de la producción de enzimas hidrolíticas por los hongos antagonistas seleccionados .....   | 38 |
| 4.5. Caracterización Microscópica de los hongos antagonistas .....   | 43 |
| 4.6. Ensayo <i>in vitro</i> para evaluar la capacidad de inhibir la germinación de esporas de los hongos fitopatógenos necrótrofos <i>F. oxysporum</i> y <i>Colletotrichum sp.</i> ..... | 45 |
| 4.7. Ensayo <i>in vitro</i> para evaluar la capacidad de inhibir la germinación de las esporas de <i>H. vastatrix</i> .....  | 48 |
| 4.8. Evaluación de los componentes antifúngicos solubles presentes en los cultivos filtrados de los hongos antagonistas sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno.....                 | 50 |
| 4.9. Ensayo <i>in vitro</i> evaluar la capacidad de micoparasitar a <i>H. vastatrix</i> .....  | 52 |
| V. CONCLUSIONES .....  | 59 |
| VI. RECOMENDACIONES .....  | 60 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA .....  | 61 |
| VIII. ANEXOS.....  | 75 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1: Reactivos y cantidades utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....   | 30 |
| Tabla 2: Diversidad fúngica de la filosfera del café por cada variedad de cultivo.....   | 31 |
| Tabla 3: Evaluación de los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de <i>Colletotrichum</i> sp.....   | 33 |
| Tabla 4: Producción de enzimas hidrolíticas extracelulares por los hongos antagonistas seleccionados.....  | 39 |
| Tabla 5: Identificación molecular mediante el alineamiento de las secuencias del gen $\beta$ -tubulina y de la región espaciadora del transcrito interno (ITS) de las cepas antagonicas mediante análisis BLAST..... | 54 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Principales regiones de Producción de Café. Superficies cosechadas en hectáreas durante el 2016. ....  | 5  |
| Figura 2: Comportamiento de la producción nacional de Café en grano.....   | 6  |
| Figura 3: Lesiones causadas por <i>Collectotrichum</i> sp. en Café.....  | 7  |
| Figura 4: Necrosis causada por <i>Phoma</i> sp. en café.....   | 8  |
| Figura 5: Pústulas anaranjadas de la roya en la hoja de Café.....  | 8  |
| Figura 6: Proceso de infección de <i>Hemileia vastratrix</i> . 9.....  | 10 |
| Figura 7: Mecanismo de acciones implementadas por especies fúngicas antagonicas para el control de plantas enfermas con fitopatógenos.. ....   | 15 |
| Figura 8: Micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> spp. en <i>Phytium ultimum</i> .....   | 17 |
| Figura 9: Esquema de aislamiento de Hongos de la Filosfera del Café.....   | 21 |
| Figura 10: Cultivo dual entre el hongo fitopatógeno y el hongo de la filosfera del café. ....  | 22 |
| Figura 11: Cámara húmeda dividida en tres campos. ....   | 25 |
| Figura 12: Recolección de urediniosporas a partir de hojas de café infectadas con la roya amarilla. ....   | 26 |
| Figura 13: Porcentajes de inhibición del crecimiento miceliar de <i>Colletotrichum</i> sp. frente a las cepas fúngicas aisladas de la filósfera de las plantas de café. ....               | 32 |
| Figura 14: Observación de la invasión de la cepa antagonista sobre la superficie miceliar <i>Colletotrichum</i> sp. (izquierda) en el ensayo de enfrentamiento dual. ...                   | 34 |
| Figura 15: Porcentaje de inhibición del crecimiento miceliar. ....   | 35 |
| Figura 16: Enfrentamiento dual entre las cepas antagonicas seleccionadas y las cepas fúngicas fitopatógenas ( <i>Colletotrichum</i> sp, <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Phoma</i> sp.)..... | 37 |
| Figura 17: Enfrentamiento dual entre la cepa FVAH 005 y las cepas fúngicas fitopatógenas ( <i>Colletotrichum</i> sp, <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Phoma</i> sp.).....                    | 38 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 18: Caracterización macroscópica y microscópica de los hongos antagonistas de la filosfera del café .....   | 44 |
| Figura 19: Cultivo en suspensión de las cepas fúngicas antagonistas seleccionadas.<br>A. Cultivo de las cepas fúngicas antagonistas en medio Papa Dextrosa. B. Cultivos filtrados de las cepas fúngicas antagonistas ..... | 45 |
| Figura 20: Evaluación de la inhibición del crecimiento micelial del tubo germinativo de <i>Fusarium oxysporum</i> en cámara húmeda a las 24 h.....   | 46 |
| Figura 21: Evaluación de la inhibición del crecimiento micelial del tubo germinativo de <i>Colletotrichum sp.</i> en cámara húmeda a las 24 h.....   | 47 |
| Figura 22: Porcentaje de Germinación de <i>H. vastratrix</i> . .....   | 48 |
| Figura 23: Inhibición de la germinación de las urediniosporas de <i>Hemileia vastatrix</i> .....   | 49 |
| Figura 24: Ensayo de difusión en pocillos de agar de los sobrenadantes de cultivos filtrados contra los hongos fitopatógenos.....  | 51 |
| Figura 25: Interacción entre <i>H. vastatrix</i> y los hongos antagonistas. ....   | 53 |
| Figura 26: Amplificación de la región ITS y del gen Beta tubulina de los hongos antagonistas. ....   | 54 |
| Figura 27: Árbol filogenético de las cepas FV1BH026, FV1EH004, FV1EH007, FV1EH015 y FV1AH005 utilizando la secuencia de la región espaciadora del transcrito interno (ITS).. .....   | 56 |

## ÍNDICE DE ANEXOS

|   |    |
|---|----|
| Anexo 1: Tablas de resultados resultados .....  | 76 |
| Anexo 2: Diversidad fúngica y cepas con capacidad antagónica distribuida en<br>variedades resistentes y susceptibles a la roya amarilla del cafeto..... | 86 |
| Anexo 3: Análisis estadístico .....   | 91 |

## RESUMEN

El café es uno de los principales productos agrícolas de exportación en el Perú. Además, el Perú es considerado como el segundo productor y exportador de café orgánico a nivel mundial. Sin embargo, en los últimos años, el cambio climático está impactando de manera significativa sobre los rendimientos y la calidad del café, ya que ocasiona un aumento en la aparición de plagas y enfermedades. Frente a estos problemas, los agricultores optan por el uso de pesticidas, a pesar de ser considerados como tóxicos para el ser humano y el medio ambiente. Por ello, muchos investigadores han buscado otras alternativas para combatir estas plagas. En el presente trabajo, se evaluó la capacidad antagonista de los hongos provenientes de la filosfera del café contra los hongos fitopatógenos que causan los mayores daños en los cultivos de cafeto, encontrándose un alto porcentaje de hongos antagonistas capaces de inhibir el crecimiento micelial *in vitro* de estos hongos fitopatógenos. Asimismo, se evaluó la producción de enzimas líticas secretadas y la capacidad micoparasitaria de los hongos antagonistas. Dentro de las cepas seleccionadas, se encontraron que estaban relacionadas molecularmente a 3 especies: *Penicillium citrinum*, *Penicillium griseofulvum* y *Clonostachys rosea*, las cuales han sido reportadas como buenos biocontroladores en diferentes cultivos.

**Palabras clave:** *Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Phoma sp.*, aislamiento, antagonismo, secreción de enzimas líticas.

## ABSTRACT

Coffee is one of the main agricultural export products in Peru. In addition, Peru is considered the second largest producer and exporter of organic coffee worldwide. However, in recent years, climate change is having a significant impact on the yields and quality of coffee, as it causes an increase in the appearance of pests and diseases. Faced with these problems, farmers choose to use pesticides, despite being voted toxic for humans and the environment. For this reason, many researchers have looked for other alternatives to combat these pests. In the present work, the antagonistic capacity of the fungi from the coffee phyllosphere against the phytopathogenic fungi that cause the greatest damage in coffee crops was evaluated, finding a high percentage of antagonistic fungi capable of inhibiting the in vitro mycelial growth of these phytopathogenic fungi. Likewise, the production of secreted lytic enzymes and the mycoparasitic capacity of the antagonist fungi were evaluated. Among the selected strains, they were found to be molecularly related to 3 species: *Penicillium citrinum*, *Penicillium griseofulvum* and *Clonostachys rosea*, which have been reported as good biocontrollers in different cultures.

**Keywords:** *Colletotrichum sp*, *Fusarium oxysporum*, *Phoma sp.*, antagonism, secretion of lytic enzymes, mycoparasitism.

## I. INTRODUCCIÓN

La caficultura es la actividad de producción y comercialización del café, considerada como un activo comercial importante a nivel internacional (ICO, 2018). Se presume que la producción mundial es realizada por 25 millones de familias alrededor del mundo (Tan, 2020), y que aproximadamente el 70 % de este volumen mundial proviene de productores a pequeña escala, que cultivan en menos de 2 hectáreas (Acosta *et al.*, 2020).

En el Perú, el cultivo de café es el sustento económico de más de 223 mil familias de pequeños productores (Díaz & Willems, 2017), y posee aproximadamente 387 421 hectáreas destinadas a este cultivo, producidas principalmente en las regiones de Amazonas, Cajamarca, Cusco, Junín, Pasco y San Martín (Romero, 2020). Además, el Perú es considerado como el séptimo país exportador de café a nivel mundial (Romero, 2020), y el segundo productor y exportador de café orgánico a nivel mundial (Junta Nacional del café, 2020)

Sin embargo, el cambio climático está impactando de manera significativa en el rendimiento y calidad del café. La combinación de fenómenos como: temperaturas más altas, sequías prolongadas, y fuertes lluvias y heladas, influyen en la producción de café de muchas maneras: desde la disminución de las áreas aptas para el cultivo hasta la creciente presión de plagas y enfermedades (Panhuysen y Pierrot, 2018).

Las enfermedades producidas por hongos fitopatógenos tienen gran importancia en este cultivo, ya que disminuyen la producción de grano y pueden causar la muerte de la planta en muchos casos. La enfermedad que en estos últimos tiempos ha constituido un serio problema para los productores es la roya amarilla del cafeto, cuyo agente causal es el hongo biótrofo *Hemileia vastatrix*.

La roya amarilla del café fue reportada por primera vez en el Perú en el año 1979, en el departamento de Junín (Quispe *et al.*, 2017). Sin embargo, tuvo su mayor incidencia en el año 2013, ocasionado principalmente por el cambio climático, mostrando que esta enfermedad es la mayor amenaza para los cultivos de café (Canet *et al.*, 2016). El Servicio

Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) reportó daños en 290 000 ha cultivadas; de las cuales 80 mil fueron totalmente afectadas (Díaz & Willems, 2017). Desde entonces, esta enfermedad se ha ido extendiendo a gran parte de las principales zonas cafetaleras del Perú, entre ellos a Villa Rica (Región Pasco) y Quillabamba (Región Cusco) (Quispe *et al.*, 2017).

Asimismo, existen otras enfermedades que atacan el cultivo de café y causan diversos problemas a los agricultores, como la pérdida o reducción de la cosecha del grano. Algunas de las enfermedades más importantes son el mal de hilachas (*Corticium koleroga*), la antracnosis (*Colletotrichum coffeanum*), el ojo de gallo (*Mycena citricolor*), fomosis o muerte descendente del café (*Phoma spp.*), (*Phomopsis sp.*), ojo de gallo (*Mycena citricolor*) y la marchitez vascular (*Fusarium oxysporum*) (Canet *et al.*, 2016).

Durante varios años, para evitar las pérdidas ocasionadas por plagas y enfermedades en los diversos cultivos se han empleado abordado principalmente mediante el uso de 2 estrategias. El uso de pesticidas químicos y el desarrollo de variedades mejoradas. La primera de ellas, es muy costosa y perjudicial para la salud y el ambiente; mientras la segunda es más compleja de desarrollar, debido a que se requiere un alto conocimiento de las fuentes de resistencia y de la diversidad del patógeno, demandando así un mayor tiempo para su desarrollo (Quispe *et al.*, 2017). Sin embargo, durante estos últimos años, la biotecnología en la agricultura se ha orientado al uso de microorganismos provenientes de la biodiversidad para enfrentar el ataque de fitopatógenos. Esta área de investigación consiste en la selección y utilización de microorganismos antagonistas controladores de estos agentes infecciosos, y es denominada control biológico (Benítez *et al.*, 2004; Rudy *et al.*, 2011). A comparación de las técnicas tradicionales de control de fitopatógenos, el uso de biocontroladores es una forma natural de reducir o eliminar los efectos dañinos de pesticidas en las plantas o sus productos, además es económicamente aceptable y amigable con el medio ambiente (Serrano & Galindo, 2007).

En este contexto, esta investigación tiene como objetivo seleccionar y caracterizar a hongos aislados de la filósfera del café con capacidad biocontroladora contra fitopatógenos fúngicos de importancia agrícola en el cultivo de café.

Los objetivos específicos planteados fueron los siguientes:

- Aislar los hongos provenientes de la filosfera de cultivos de café.
- Evaluar el efecto antagonista de los hongos aislados contra diferentes hongos fitopatógenos del café.
- Evaluar la producción de enzimas hidrolíticas de los hongos con actividad antagónica.
- Caracterizar morfológicamente a los hongos con actividad antagónica.
- Evaluar los componentes antifúngicos solubles presentes en los cultivos filtrados de los hongos antagonistas.
- Evaluar el mecanismo de micoparasitismo presente en los hongos antagonistas.
- Analizar filogenéticamente a los hongos con mayor actividad antagónica.



## II. REVISIÓN DE LITERATURA

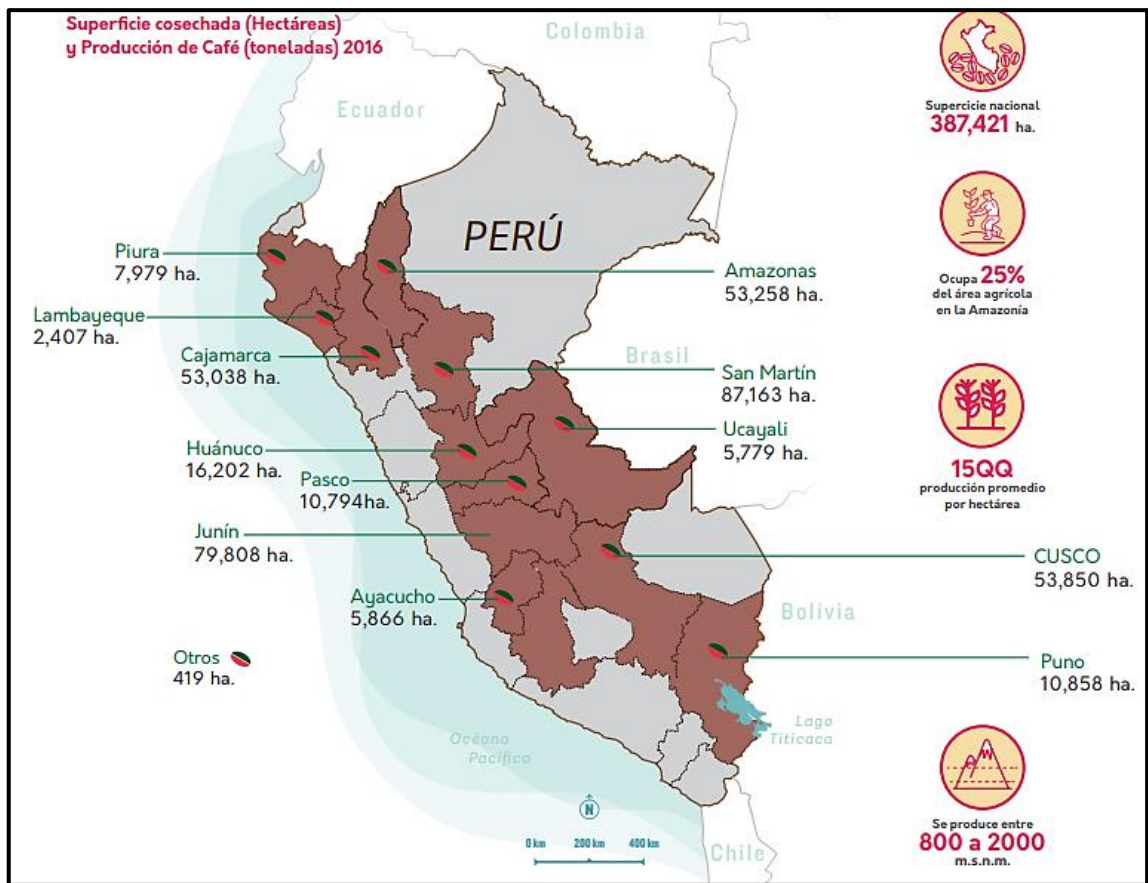
### 2.1. El cultivo de Café en el Perú

El café es uno de los principales productos de exportación agrícola en el Perú. A nivel mundial, el Perú es considerado como el séptimo país exportador. (Romero, 2020)

Según el último Censo Nacional Agropecuario – CENAGRO (INEI, 2012) un aproximado de 223 mil familias conducían 425 400 hectáreas. Sin embargo, luego del ataque de la roya ocurrido en el 2012, la superficie destinada al cultivo del café se redujo. Para el 2016, el MINAGRI reportó una superficie de 387 421 hectáreas distribuidas en 12 principales regiones dedicadas a la producción de café (Figura 1) (Ministerio de Agricultura y Riego, 2018). Este cultivo es producido principalmente en la vertiente oriental de la cordillera de los Andes, entre los 800 msnm y los 2000 msnm, zonas consideradas, respectivamente, como yunga fluvial y selva alta (Díaz & Willems, 2017).

En estas regiones, el 85% de los productores poseen menos de 5 hectáreas; el 65% son mayores de 50 años, y el 80% conduce su finca sin manejo técnico ni empresarial. Por ello, una producción sostenible contribuirá de forma significativa a mejorar la calidad de vida de miles de familias cafetaleras. (Gonzales *et al.*, 2017).

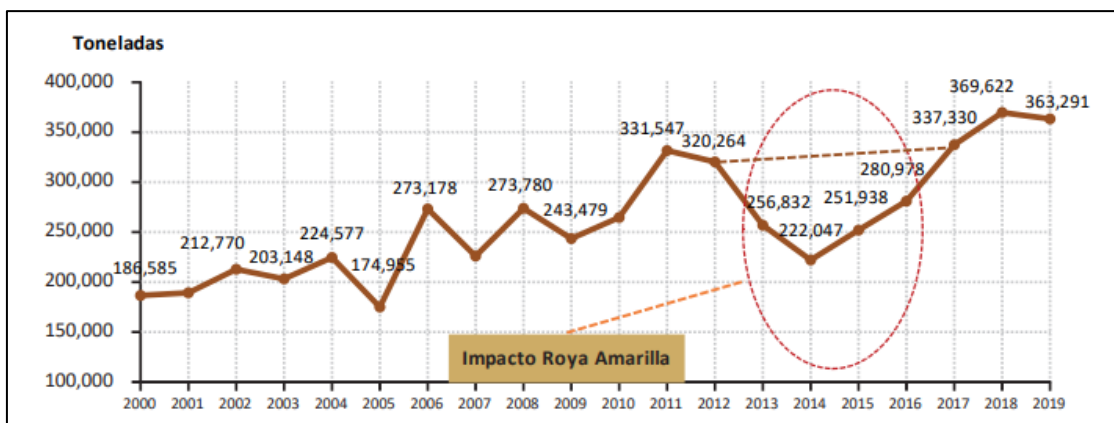
Los cafés cultivados en el Perú son de especie Arábica y las principales variedades son Typica, Caturra, Catimor, Pache y Bourbon. Hasta el 2012, la variedad más difundida era la Typica, la cual se caracteriza por un alto perfil de taza, calidad de grano, rendimiento y adaptabilidad a las condiciones climáticas del país. Sin embargo, después de la presencia del ataque de la roya, en el país se está reemplazando la variedad Typica por la Catimor, que es más resistente a la roya y tiene mayor producción, pero menor calidad de taza (Díaz & Willems, 2017).



**Figura 1:** Principales regiones de Producción de Café. Superficies cosechadas en hectáreas durante el 2016. **FUENTE:** Adaptado de “Plan Nacional de acción del Café Peruano: 2018-2030” por Ministerio de Agricultura y Riego, Perú, 2018.

En el año 2017, la producción nacional de café se reestableció del impacto que había sufrido por la “Roya Amarilla” (Figura 2). Y en el 2018, la producción aumento en un 9,5% de crecimiento respecto al año 2017. El aumento de la producción en el 2018 se debió a la entrada en producción de cafetos plantados en el 2015 (Romero, 2020).

Por ello, para el 2019 se esperaba que la producción de café superase al del año anterior. Sin embargo, la caída del precio pagado por el café en el mercado internacional afectó a cientos de productores, quienes además confrontaron la escasez de mano de obra y la presencia de plagas y enfermedades, declinándose la producción en 1.3% (Romero, 2020).



**Figura 2:** Comportamiento de la producción nacional de Café en grano.

**FUENTE:** Adaptado de “Observatorio de Commodities 2020” por Romero, 2020. Ministerio de agricultura y Riego.

Esta situación se agravó con la pandemia del Covid-19 en el 2020, debido a las restricciones de desplazamiento, interrupción de las labores de cosecha y escasez de mano de obra, estimándose que más del 20% de la producción cafetalera peruana se perderá. (Junta Nacional del Café, 2020).

## 2.2. Hongos Fitopatógenos del café

La producción agrícola se ve constantemente afectada en rendimiento y calidad de producción, debido al ataque de una gran diversidad de organismos fitopatógenos, fundamentalmente hongos y bacterias, siendo los primeros el grupo principal de agentes causales de enfermedades en las plantas (Rudy *et al.*, 2011).

Las principales enfermedades del café son causadas por hongos, como la roya (*Hemileia vastatrix*), antracnosis (*Colletotrichum coffeanum*), fosis o muerte descendente del café (*Phoma spp.*), ojo de gallo (*Mycena citricolor*), marchitez vascular (*Fusarium oxysporum*) y mal de hilachas (*Corticium koleroga*) (Álvarez *et al.*, 2016).

La persistencia de varias especies de hongos fitopatógenos ha aumentado durante los últimos años debido a los cambios que se han presentado en las prácticas agrícolas, principalmente por el uso indiscriminado de químicos (Rudy *et al.*, 2011).

La intensidad del ataque de las enfermedades depende del grado de susceptibilidad o resistencia de los hospederos y del grado de virulencia de los patógenos. Por ejemplo, en el caso de la Roya del cafeto, se conoce que al menos existen 30 razas fisiológicas de *H. vastatrix*, siendo la raza II la más dispersa y la de mayor agresividad. Los otros patógenos del cafeto, probablemente, tienen también una amplia variabilidad genética y, sin duda,

existen muchas razas y líneas, unas más virulentas que otras, debido a la alta frecuencia de mutabilidad de los hongos y su adaptabilidad a los diversos ambientes donde se cultiva café. (Sotomayor & Duicela, 1995).

### 2.2.1. *Collectotrichum sp.*

La enfermedad causada por el hongo *Collectotrichum sp.* se denomina antracnosis y ataca a las plantaciones con exceso de sombra y humedad, así como mala ventilación (Canet *et al.*, 2016). En la plantación la enfermedad se presenta en hojas de plantas jóvenes y adultas, en forma de lesiones necróticas de color café, gris o negro, que inician en los bordes y ápice de las hojas (Figura 3) y que avanzan hacia el centro de la lámina foliar (Ogoshi *et al.*, 2015). Esta enfermedad se caracteriza por provocar la pérdida de hojas, ramas, follaje y, finalmente, la pérdida de la cosecha (Canet *et al.*, 2016).



**Figura 3:** Lesiones causadas por *Collectotrichum sp.* en Café.

**FUENTE:** Adaptado de “Guía de identificación y manejo de antracnosis en café” por FUNICA (Fundación para el desarrollo Tecnológico Agropecuario y Forestal de Nicaragua), 2011.

### 2.2.2. *Phoma sp.*

La enfermedad denominada “Muerte descendente” es causada por el género *Phoma* y se produce en zonas altas o con regímenes de lluvia prolongados, a bajas temperaturas y luminosidad. Esta enfermedad se caracteriza por presentar necrosis descendente en los tejidos en desarrollo, la cual avanza hasta el tejido lignificado donde se detiene. En las hojas jóvenes ocurren manchas oscuras redondeadas con bordes irregulares (Figura 4) que se unen y las necrosan totalmente (Gil & Leguizamón, 2000).



**Figura 4:** Necrosis causada por *Phoma* sp. en café.

**FUENTE:** Adaptado de “La muerte descendente del cafeto (*Phoma* spp.)” por L. Gil y E. Leguizamón, 2000. Avances Técnicos Cenicafé, 278. p.2.

### 2.2.3. *Fusarium oxysporum*

La “Marchitez vascular” es otra enfermedad del cafeto y ocurre en áreas localizadas en las plantaciones de árboles adultos. Generalmente, los cafetos pueden estar infectados con este hongo, pero no manifiestan síntomas, sin embargo, bajo condiciones de estrés, como sequía o alta producción, se marchitan y mueren (Elliot, 2010). El síntoma inicial es la clorosis de las hojas y eventualmente defoliación. Asociado a la marchitez se encuentra la decoloración de los haces vasculares que se expresa como estrías de color oscuro en la madera de las plantas enfermas (Elliot, 2007).

### 2.2.4. *Hemileia vastatrix*

La roya del café producida por *Hemileia vastatrix* es una de las enfermedades más serias del cafeto, la cual causa grandes pérdidas en el rendimiento, debido a que su ataque provoca defoliación prematura de la planta (Barrera & Menjibar, 2004). Cuando la defoliación es moderada, las pérdidas de producción pueden estar en el rango de 20 a 40%; en tanto que una defoliación severa puede provocar la pérdida total de la capacidad productiva de las plantas (Canet *et al.*, 2016).



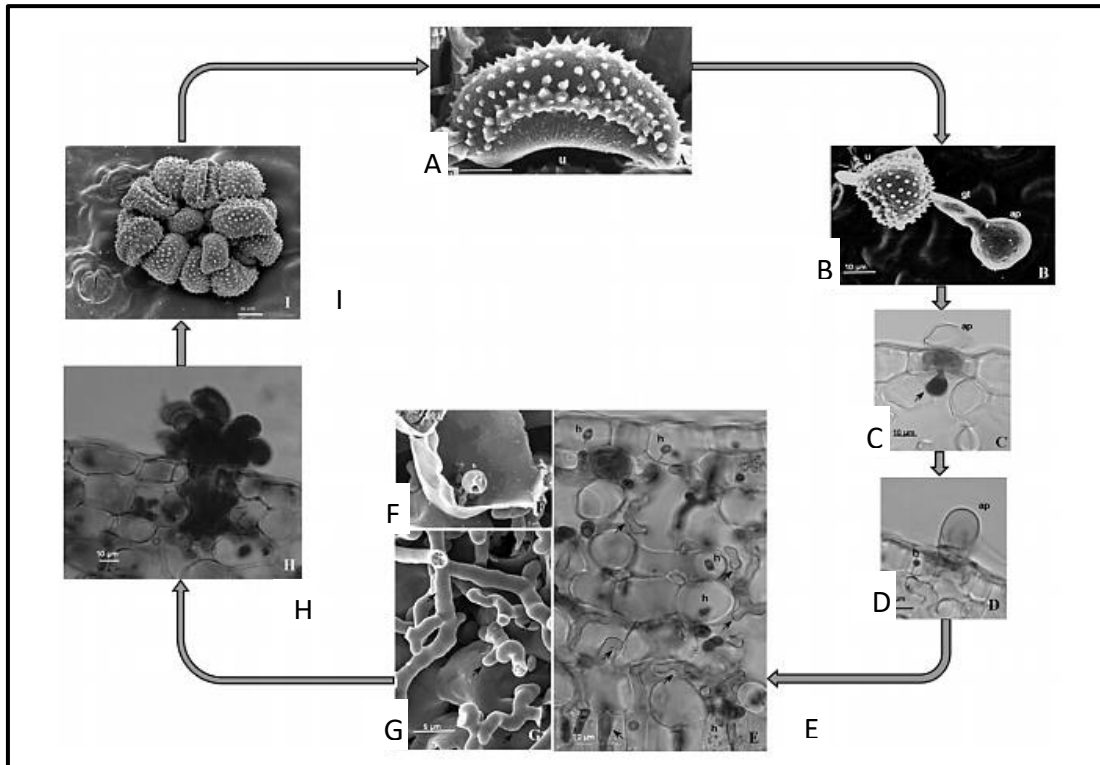
**Figura 5:** Pústulas anaranjadas de la roya en la hoja de Café.

**FUENTE:** Adaptado de “Alerta por aumento de presencia de roya del Café” por H. Solano, 2016. CRHoy. (<https://www.crhoy.com/nacionales/alerta-por-aumento-de-presencia-de-roya-del-cafe>)

Este hongo crece dentro del tejido de las hojas de café y llega a la superficie de la hoja donde produce pústulas anaranjadas (Figura 5), cada pústula libera decenas de miles de esporas que se diseminan en los cafetales por efecto del viento y la lluvia o viajan transportadas por insectos, animales y personas (Álvarez *et al.*, 2016).

Su ciclo de vida se inicia cuando una pequeña espora de la roya, llega al envés de la hoja del café. Esta espora sólo germina en presencia de humedad y cuando la temperatura del aire está entre 15 y 28 °C. Bajo estas circunstancias, el hongo infecta a la planta y se establece dentro de ella para alimentarse, finalmente su reproducción se produce mediante esporas (Hernández & Velázquez, 2016). El lapso transcurrido entre la germinación de la espora, la penetración de este a los tejidos internos de la hoja y el inicio de la producción de esporas (esporulación), es el período de latencia y su duración oscila entre 20 a 40 días. Esto varía dependiendo de qué tan favorables sean las condiciones de temperatura (entre 21-25 °C) y como factor importante la existencia de agua libre (por al menos durante seis horas) sobre la hoja requerido para completar el ciclo reproductivo del hongo (Canet *et al.*, 2016).

Durante la infección (Figura 6), el micelio de este hongo se encuentra completamente dentro del mesófilo de la hoja. En esta etapa se pueden encontrar hifas hialinas que crecen entre las células del mesófilo y penetran en ellas mediante ramificaciones cortas, filiformes, que terminan en expansiones ovales o irregulares. Estas expansiones constituyen los haustorios y sirven probablemente como órganos de absorción de alimentos. Luego, las hifas forman unas masas entretejidas de micelio en las cavidades subestomáticas, que crecen como un fascículo de filamentos finos y emergen a través de los estomas, dando lugar a las esporas. La masa de esporas es visible, por presentar aspecto pulverulento como polvillo anaranjado. La forma de las uredosporas maduras varía según su posición en el haz de estas estructuras, generalmente son angostas, triangulares y redondeadas en un corte transversal (García, 2013).



**Figura 6:** Proceso de infección de *Hemileia vastatrix*. (A) Uredospora. (B) Germinación de la uredospora. (C) Penetración de la hifa. (D) Hifa con un haustorio dentro de la célula epidérmica. (E, F y G) Hifas entre células y haustorios dentro de células epidérmicas y mesófilas. (H e I) Esporulación a través del estoma en forma de un bouquet.

**FUENTE:** Talhinhos *et al.* (2016). Adaptado de “The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics” por D, Talhinhos, D. Batista, I. Diniz, A. Vieira, D. Silva, A. Loureiro, M. Silva, 2017. *Molecular Plant Pathology*, 18(8). p. 1039.

### 2.3. Hongos endófitos y epífitos de la filosfera

La comunidad de los hongos de la filosfera está compuesta tanto por hongos epífitos como hongos endófitos. Estos ocupan dos microambientes distintos: los hongos epífitos habitan en la superficie de las hojas, mientras que los hongos endófitos habitan dentro de las hojas (Yao *et al.*, 2019).

Los hongos endófitos son muy diversos y juegan un rol importante, ya que pueden promover el crecimiento de las plantas, sintetizar metabolitos secundarios e inducir resistencia al estrés biótico y abiótico, como patógenos, sequía y salinidad. Por ello, los hongos endófitos son una alternativa de alto potencial para su aplicación en el manejo de insectos plaga y enfermedades en cultivos de importancia agrícola (Aragón y Beltrán, 2018).

Estudios previos han demostrado que la diversidad y la composición de la comunidad de hongos epífitos y endófitos de la filosfera son diferentes (Gomes *et al.*, 2018; Yao *et al.*, 2019). Sin embargo, entre los géneros encontrados frecuentemente en la filosfera se

encuentran: *Fusarium sp.*, *Curvularia sp.*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.*, *Epicoccum sp.*, y *Penicillium sp.*

#### **2.4. Influencia de los factores climáticos para la colonización de hongos endófitos y epífitos**

Las epífitas están expuestas a numerosos factores externos de estrés ambiental, como la temperatura, la humedad y la radiación solar. Por otro lado, los endófitos tienen un hábitat más protegido, pero son desafiados por las reacciones de defensa de las plantas. Los diferentes factores de estrés que enfrentan las epífitas y endófitas pueden tener efectos importantes en la composición de su comunidad (Gomes *et al.*, 2018).

Los endófitos de los bosques tropicales rara vez demuestran una especificidad por el hospedante, sino que forman comunidades distintas en especies hospedadoras coexistentes. Sin embargo, estudios recientes argumentan que a pesar del aparente generalismo de hospedadores en términos de afiliaciones, muchos hongos en los bosques tropicales demuestran una fuerte especialización funcional, interactuando con especies hospedadoras particulares, o con hospedantes que tienen rasgos particulares, de formas distintivas y ecológicamente importantes (Oita *et al.*, 2021).

En estudios que compararon comunidades de hongos epífitos y endofíticos en hojas de arbustos o plantas leñosas, como *Coffea arabica* y *Camellia japonica*, informaron que poseen comunidades distintas (Gomes *et al.*, 2018). Además, se ha destacado que existe una gran diversidad de endófitos en los bosques tropicales húmedos. En contraste, algunos estudios informan que los bosques tropicales secos no soportan una gran diversidad de endófitos. La baja diversidad de endófitos en los bosques secos, en comparación con la alta diversidad en los bosques tropicales húmedos, es un reflejo de la influencia de factores abióticos (lluvia anual, régimen de incendios) y bióticos (diversidad de herbívoros) (Amorim *et al.*, 2011). Así mismo, se encontró que las variaciones estacionales afectan a las comunidades endofíticas de hongos en la filosfera de plantas que crecen en zonas tropicales (Gomes *et al.*, 2018).

La velocidad del viento (para epífitas) y la lluvia (para endofitas) son variables climáticas que explican mejor la variación total en las estructuras comunitarias. El viento podría ser importante para la dispersión de propágulos epífitos y podría ser responsable de aumentar la diversidad de la comunidad epífita. Por otro lado, la lluvia contribuye principalmente a dar



forma a la comunidad endofítica, y podría ser importante para la dispersión de esporas de hongos y la colonización de endófitos (Gomes *et al.*, 2018).

Por lo tanto, la mayor abundancia y riqueza de hongos reportada durante la primavera podría deberse a las temperaturas más cálidas y la mayor velocidad del viento (para epífitas) o lluvias (para endófitas) en comparación con el otoño (Gomes *et al.*, 2018).

Considerando que los cultivos de café Arábico tienen un rango óptimo de temperatura entre 18 y 22°C, con pequeñas fluctuaciones estacionales, aunque puede tolerar temperaturas entre 15 °C y 25 °C (Adhikari *et al.*, 2020), se encontró que un microclima húmedo favorece el crecimiento de hongos biocontroladores, como el hongo *Lecanicillium*, que parasita a *Hemileia vastatrix* (Zewdie *et al.*, 2021).

## **2.5. Control de las enfermedades causadas por los hongos fitopatógenos**

En la agricultura comercial contemporánea, el combate de plagas y enfermedades es muy importante; y representa hasta un 20 por ciento o más del costo de producción, dependiendo de la severidad del daño (Serrano & Galindo, 2007).

Los plaguicidas y agentes químicos antimicrobianos adquirieron un papel preponderante en la protección de cultivos contra plagas y enfermedades, debido en gran parte al fuerte apoyo que recibió la investigación y desarrollo de la industria agroquímica. Sin embargo, el empleo intensivo (y a veces desmedido) de productos químicos ha tenido efectos negativos sobre el ambiente y la calidad de vida de las poblaciones humanas. Además, su eficacia puede ser de corta duración, ya que pueden tener el efecto de seleccionar poblaciones de plagas y patógenos resistentes. Asimismo, estos productos se pueden acumular en los alimentos, suelos y aguas si no se respetan las dosis, intervalos de seguridad y los productos aprobados para un cultivo, lo cual ocurre con gran frecuencia (Serrano & Galindo, 2007).

La gravedad de estos problemas demanda un cambio urgente de manejo agrícola, por lo que es necesario desarrollar nuevas alternativas que contribuyan al desarrollo agrosostenible del ambiente. Esta problemática, es posible solucionarla a través de un manejo integrado de las enfermedades, utilizando como alternativa al control biológico, el cual consiste en la utilización de productos de base biológica derivados de la biodiversidad para el control de fitopatógenos (Pérez *et al.*, 2014).

## 2.6. Control Biológico

El control biológico es un método de control alternativo, efectivo y eficiente, que consiste en el uso de organismos (o de sus metabolitos o subproductos) que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas o sus productos (Serrano & Galindo, 2007).

Para el biocontrol de fitopatógenos generalmente se emplea microorganismos (hongos o bacterias) aislados a partir del suelo o la planta. Por ejemplo, para combatir enfermedades foliares, existe un grupo especial de microorganismos que crecen en las hojas, caracterizados por alta tolerancia al "stress", al disturbio y con distintos grados de competencia interespecífica. Este grupo de microorganismos puede estar involucrado en la resistencia de la planta a insectos y patógenos (Venedikian *et al.*, 2001).

Existen numerosas investigaciones que han desarrollado tecnologías para la producción, formulación y aplicación de agentes de control biológico de fitopatógenos, aunque los éxitos comerciales son todavía limitados. Principalmente, los hongos de los géneros *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Coniothyrium* y *Candida*, y las bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus* y *Agrobacterium* son los más reportados (Serrano & Galindo, 2007).

Un agente de control biológico eficaz cuenta, generalmente, con varios mecanismos antagonistas que actúan de manera conjunta para controlar al patógeno. Entre los mecanismos antagonistas de los agentes de control biológico se encuentran, principalmente, la colonización rápida del hábitat (competencia por espacio y nutrientes), el parasitismo sobre la plaga o patógeno, la producción de enzimas capaces de perforar y destruir al patógeno (enzimas líticas); producción de antibióticos (ya sea solubles en agua o volátiles) (Serrano & Galindo, 2007).

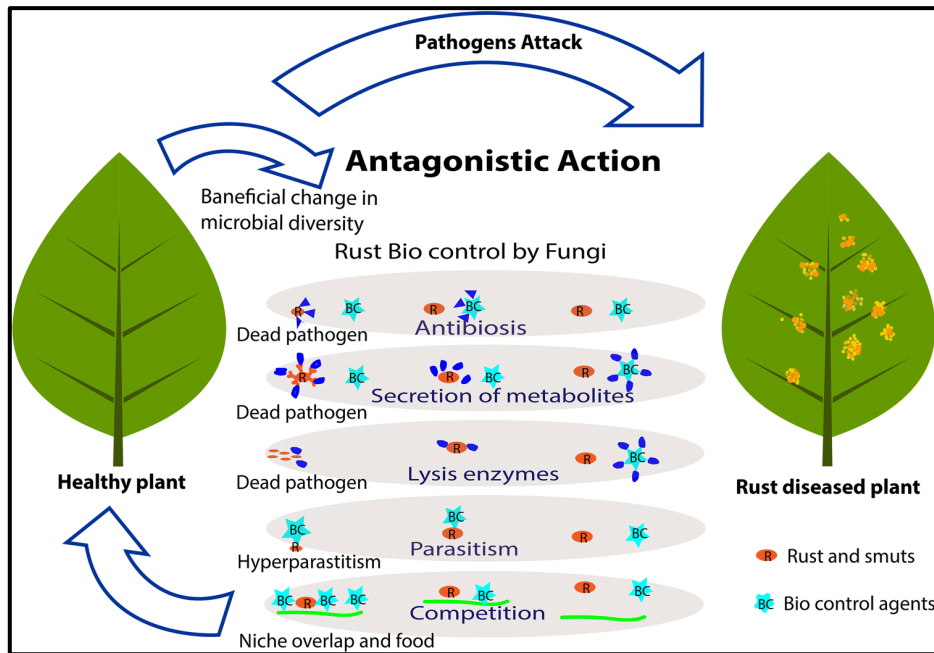
## 2.7. Estudio de Microorganismos Fúngicos como Controladores Biológicos

Varios hongos endófitos de plantas hospedantes han demostrado ser agentes de control biológico eficaces, entre ellos se encuentran: *Alternaria sp.* y *Cladosporium sp.*, aislado de trigo (Huang *et al.* 2016) y *Alternaria alternata*, aisladas de hojas de vid (Zhang *et al.* 2017). Asimismo, el uso de hongos endófitos antagonistas como agentes de biocontrol, como *Trichoderma* y *Chaetomium*, presentan una opción atractiva para manejo de ciertas enfermedades de las plantas. (Hyde *et al.*, 2019)

En el caso de los hongos, muchos estudios han enfocado sus esfuerzos en determinar su capacidad biocontroladora y su relación con la capacidad de producir enzimas extracelulares, como las quitinasas y celulasas que pueden dañar la pared celular del hongo patógeno (Campuzano *et al.*, 2017). Es por ello, que para analizar los efectos biocontroladores de los hongos de la filósfera del café se requiere de un amplio estudio, en especial, sobre la capacidad de producción de compuestos antifúngicos y la segregación de enzimas extracelulares líticas. En la Figura 7, se puede observar algunos de los mecanismos utilizados por los hongos biocontroladores, como el micoparasitismo, la antibiosis, la producción de enzimas degradadoras de la pared celular, y la competencia por nutrientes y espacio (Hyde *et al.*, 2019).

Aunque en algunos casos (como los mecanismos de antagonismo de especies del género *Trichoderma* contra hongos fitopatógenos) se cuenta con un conocimiento amplio del modo de acción, no es así para la mayoría de los agentes de control biológico. Esto es debido, en parte, a que es raro que sólo un mecanismo antagonista sea responsable del control o supresión del patógeno (Campuzano *et al.*, 2017).

Para seleccionar hongos endófitos potenciales con capacidad biocontroladora es importante realizar experimentos *in vitro* seguidos de experimentos de campo en diferentes condiciones. Además, es un requisito previo obligatorio evaluar si existe la posibilidad de una sobreproducción de micotoxinas antes de registrar agentes de biocontrol nuevos, independientemente de que los organismos productores sean endófitos. Así mismo, es fundamental tener en cuenta que las especies aisladas como endófitas de una determinada planta huésped puede ser patógeno para otras plantas (Hyde *et al.*, 2019).



**Figura 7:** Mecanismo de acciones implementadas por especies fúngicas antagonistas para el control de plantas enfermas con fitopatógenos.

**FUENTE:** Adaptado de “The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially” por K. D. Hyde, J. Xu, S. Rapior, 2019. Fungal Diversity 97, p. 29.

## 2.8. Competencia por nutrientes y espacio

La competencia por espacio sucede cuando un microorganismo cubre la superficie vegetal sin dejar que otro se desarrolle. Suele ser importante en patógenos que penetran por heridas o que necesitan una concentración inicial de inóculo para penetrar (Gonzales, 2018). En este caso es importante la relación entre la velocidad de crecimiento del patógeno y la del antagonista.

La competencia por nutrientes se basa en la habilidad del microorganismo para competir por nutrientes como el hierro, mediante la producción de sideróforos o mediante la capacidad para obtener energía de varios azúcares como celulosa, glucanos o quitina y de la eficiencia de su sistema de transporte de glucosa para obtener ATP (Gonzales 2018).

## 2.9. Micoparasitismo y la producción de enzimas extracelulares líticas de los hongos biocontroladores

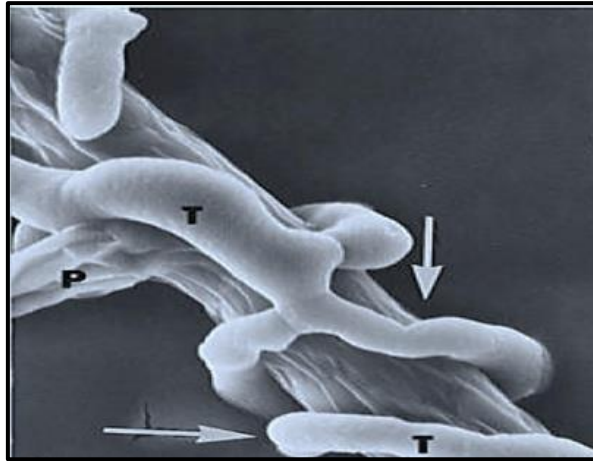
El micoparasitismo es un tipo de interacción directa entre el antagonista y el patógeno, donde el antagonista usa al patógeno como alimento, logrando una actividad de simbiosis antagonista entre organismos. Generalmente, están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasa, celulasa,  $\beta$ 1, 3-glucanasa y proteasa, que degradan parcialmente la pared

celular de los hongos patógenos (Gonzales, 2018). Estas enzimas pueden ser inducidas artificialmente, cuando estos hongos son cultivados en medios líquidos suplementados con monómeros de quitina N-acetilglucosamina o con polímeros tales como laminarina, quitina o paredes celulares de hongos (García *et al.*, 2016). La actividad de estas enzimas ha sido estudiada por Tovar *et al.* 2008, donde demostraron la eficiencia de enzimas quitinolíticas de 15 cepas de *Trichoderma* frente a fitopatógenos como *R. solani*, *Rhizoctonia meloni* y *Botrytis cinérea*. *T. harzianum* ha sido una de las especies de *Trichoderma* más estudiadas, determinándose, en esta especie, la producción de enzimas N-acetilglucosaminidasas, endoquitinasas, y quitobiosidasas, las cuales tienen funciones importantes en el control de fitopatógenos, y en la degradación de sustratos de quitina. El 25- 60% del total de los hongos filamentosos tienen esta capacidad quitinolítica lo que permite degradar la quitina tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Campuzano *et al.*, 2017).

Además, se ha estudiado otro hongo caracterizado por ser hiperparásito del orden uredinales como la roya. Por ejemplo, *Cladosporium uredinicola* es un hiperparásito necrotrófico común que puede destruir las hifas de la roya y causa la coagulación y desintegración del citoplasma celular de especies de *Puccinia*.

Las fases del micoparasitismo según Benhamou y Chet 1997 (Gonzales, 2018):

1. El microorganismo patógeno secreta exudados que atraen, por quimiotropismo, al antagonista.
2. El hongo antagonista se adhiere al patógeno mediante haustorios o apresorios (Figura 8), la degradación de la pared celular es mediante enzimas hidrolíticas (quitinasas,  $\beta$ -glucanasas, proteasas, lipasas, xilanasas, pectinasas, amilasas, fosfolipasas, RNAsas y ADNsas).
3. Ocurre una penetración en las hifas del patógeno, engrosándolas y produciendo haustorios, para absorber los nutrientes.
4. Finalmente se produce lisis de la pared celular.



**Figura 8:** Micoparasitismo de *Trichoderma spp.* en *Phytium ultimum*. Las flechas indican enrollamiento y formación de apresorios de las hifas de *Trichoderma harzianum*. (T) sobre la hifa de *P. ultimum* (P).  
**FUENTE:** Benhamou & Chet (1997).

## 2.10. Producción de antibióticos fúngicos en hongos biocontroladores

La antibiosis es la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos (Infante *et al.*, 2009). Una ventaja de este mecanismo, es que no es necesario que el patógeno y el antagonista entren en contacto y, además, el antibiótico puede permanecer en el medio incluso tras la muerte del antagonista (Marques *et al.*, 2018). Estos compuestos son estimulados de forma directa por la presencia de un microorganismo patógeno (Harman *et al.*, 2005).

Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico. Tales sustancias inhibidoras son consideradas "antibióticos". Los antibióticos volátiles tienen un efecto esencialmente fungistático, debilitando al patógeno y lo hacen más sensible a los antibióticos no volátiles (Infante *et al.*, 2009).

*Trichoderma sp.* produce antibióticos como: gliotoxina, viridina, trichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos y trichorzianina. Se plantea, que estos causan daño a nivel celular: vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis (Infante *et al.*, 2009).

## III. METODOLOGÍA

### 3.1. Lugar de Ejecución

La investigación de este proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología (LEMYB), perteneciente al Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

### 3.2. Material biológico

- Hojas de plantas de 6 variedades de *Coffea arabica* L. (Bourbon, Caturra roja, Typica, Catimor, Costa Rica 95 y Limaní) obtenidas de Villa Rica, Pasco - Perú
- Cepas fúngicas utilizadas como controles positivos para actividad enzimática: *Aspergillus fumigatus*, proporcionada por el Laboratorio de Micología y Biotecnología, *Trichoderma harzianum*, proporcionada por SENASA y *Penicillium sp.* aislado de una muestra ambiental en la UNALM.
- Esporas de *Hemileia vastatrix* recolectadas de hojas de café infectadas con este patógeno.
- *Colletotrichum sp.*, *Phoma sp.* aislados de hojas de café infectadas con estos patógenos, proporcionados por el Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología (LEMYB).
- *Fusarium oxysporum*, cepa proporcionada por el Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología (LEMYB).

### 3.3. Materiales

- Material de vidrio diverso: beakers, matraces volumétricos, probetas, pipetas, tubos de ensayo, placas Petri 90 mm, laminas porta y cubreobjetos, y botellas de tapa rosca.
- Material de plástico diverso: placas Petri descartables 90 x 15", microtubos de centrifuga, tubos de centrifuga de 50 ml y puntas para micropipetas.
- Materiales diversos: mechero Bunsen, algodón, aguja de kőlle, mascarillas, gradillas, guantes y sacabocados de 0.5 cm.

### **3.4. Equipos e instrumentos**

- Agitador orbital
- Autoclave vertical
- Balanza analítica
- Balanza de digital
- Cámara de flujo laminar
- Cámara incubadora a 28°C
- Centrífuga refrigerada
- Congeladora de -20°C
- Congeladora de -80°C
- Horno microondas
- Microscopio óptico
- Micropipetas de 2-20 µl, 20-200 µl, y 100-1000µl
- Refrigeradora
- Potenciómetro
- Vórtex

### **3.5. Reactivos y Medios de cultivo**

- Ácido clorhídrico
- Agar avena
- Agar bacteriológico
- Agar papa dextrosa (PDA)
- Agar Czapek
- Cloruro de sodio
- Dextrosa
- Extracto de levadura
- Glicerol



- Hidróxido de sodio
- Huevos
- Leche descremada
- Peptona bacteriológica
- Sacarosa
- Quitina coloidal
- Tween 80

### **3.6. Métodos**

#### 3.6.1. Análisis de muestras

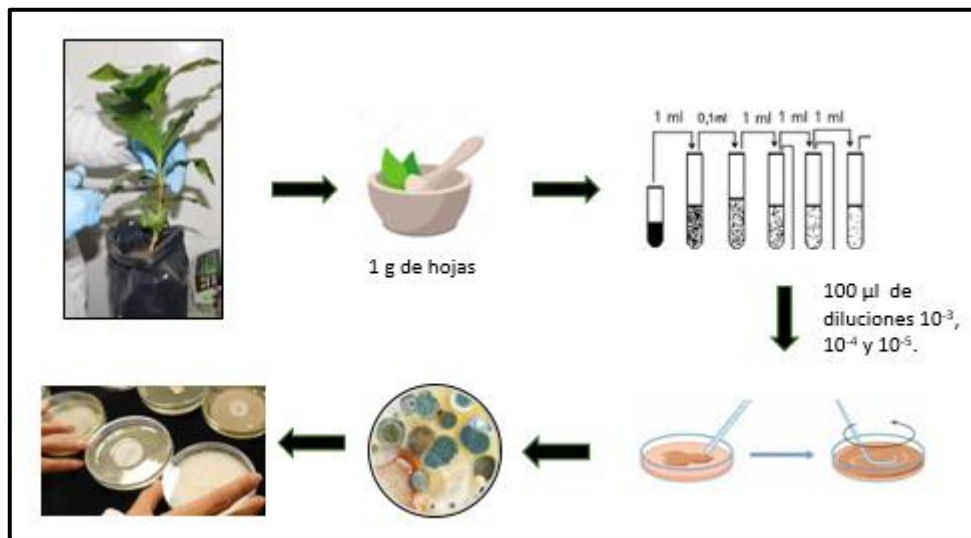
La recolección de muestras se realizó en el invernadero del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología, el cual contiene plantas de café que provienen de Villa Rica, departamento de Pasco. Para este estudio se utilizaron tres variedades de café susceptibles a la roya amarilla (Bourbon, Caturra roja y Typica), y tres variedades resistentes (Catimor, Costa rica 95 y Limaní). Para analizar la población fúngica de la filósfera se recolectaron entre 5 a 6 hojas de 6 plantas de cada variedad, por triplicado y se cortaron en pedazos pequeños asépticamente.

#### 3.6.2. Recuento y Aislamiento de hongos

Se pesó 1 gramo de hojas de café, recolectados de cada variedad para tres repeticiones y se molió con mortero y pilón con 10 ml de Tampón fosfato salino (PBS) con Tween 80 al 0.01%. Luego, se realizaron diluciones seriadas sucesivas hasta obtener las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ .

Para aislar los hongos (Figura 9), se realizó una siembra por superficie, para la cual se agregó 100  $\mu$ l de cada dilución a una placa con medio PDA con tetraciclina al 0.1 mg/ml. Luego, las placas se incubaron entre 22 y 25 °C por 3 a 5 días y se realizó el recuento de hongos encontrados con diferente morfología.

Finalmente, los hongos encontrados se sembraron en placas con PDA y se incubaron a temperatura ambiente. Las siembras se repitieron hasta aislar completamente cada hongo.



**Figura 9:** Esquema de aislamiento de Hongos de la Filosfera del Café.

### 3.6.3. Caracterización morfológica macroscópica de los hongos de la filosfera del café

La caracterización macroscópica de cada hongo se realizó después de los 15 días de incubación a temperatura ambiente en placas Petri con PDA, mediante las recomendaciones descritas por Arenas (2008). Se evaluó la forma, elevación, margen, color, textura y velocidad de crecimiento de la colonia.

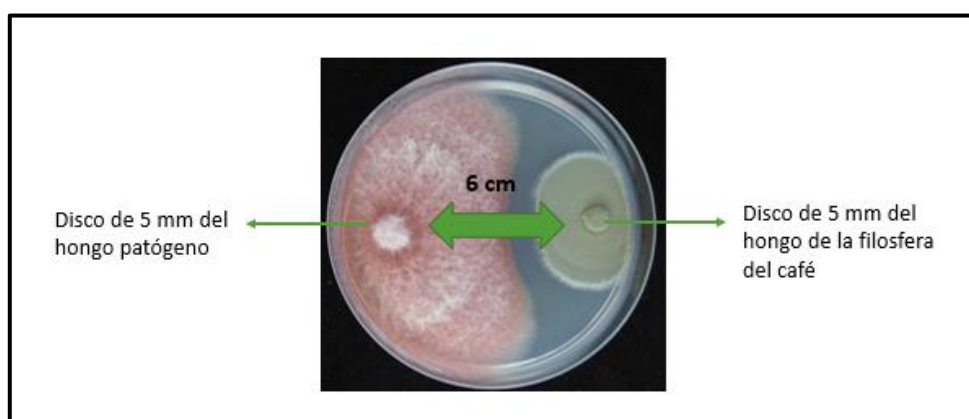
### 3.6.4. Criopreservación de hongos

El método fue desarrollado tomando como referencia los trabajos realizados por Hoffman (1987) y Kitamoto et al. (2002). Para la preparación de los cultivos stock, se emplearon el medio PDA suplementado con glicerol como agente crioprotector al 10% de concentración. Un disco de agar de los inóculos ya crecidos fue sembrado en el medio e incubado por 15 días a temperatura ambiente. Luego, de estos cultivos stock se cortaron unos 5 discos de agar por hongo y se depositaron en criotubos que contienen 1 ml de glicerol estéril al 10 % (preparado con agua destilada). Finalmente, los criotubos fueron transferidos a un criobox y colocados directamente a un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.6.5. Ensayo *in vitro* para pre-seleccionar hongos con capacidad antagonista contra patógenos fúngicos cultivables: *Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum* y *Phoma sp.*

La evaluación de la capacidad antagonista *in vitro* se efectuó por medio de la técnica de cultivos duales, según el método descrito por Bell *et al.*, (1982), colocando discos de 5 mm de diámetro del micelio del hongo antagonista en placas Petri con PDA. Posteriormente, se sembró en días diferentes al hongo patógeno, dependiendo de la tasa de crecimiento de cada hongo aislado, con el fin de que ni el hongo antagonista ni el patógeno tenga ventaja en cuanto al tiempo de crecimiento, para esto se tomaron inóculos de 5 mm del hongo patógeno y se sembraron a 6 cm de distancia del hongo antagonista (Figura 10).

La evaluación del material se realizó simultáneamente y para cada prueba se realizaron 3 repeticiones, además de los controles para el fitopatógeno. En los controles solo se sembró el hongo patógeno con 3 repeticiones. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 25 °C y se realizaron las mediciones después de cinco días de sembrar al hongo patógeno, hasta el noveno día.



**Figura 10:** Cultivo dual entre el hongo fitopatógeno y el hongo de la filosfera del café.

Para realizar la evaluación del material se midió el radio de crecimiento (mm) de ambos hongos y se calculó el porcentaje de inhibición (PI) del fitopatógeno, en base al crecimiento del radio micelial (RI) de los controles (sin el antagonista) con respecto a los que estuvieron en presencia de los antagonistas. El PI se calculó de la siguiente manera:

$$PI = ((R_c - R_i) / R_c) \times 100\%$$

Donde:

R<sub>i</sub> (radio influenciado): es el radio de crecimiento micelial del patógeno, medido en la dirección del inóculo hacia el antagonista.

R<sub>c</sub> (radio control): es el radio de crecimiento micelial del patógeno, medido en la dirección del radio máximo sin presencia del antagonista.

Por otro lado, para indicar el micoparasitismo como posible mecanismo de acción de los hongos antagonistas, se realizaron observaciones macroscópicas de los cultivos duales, teniendo en cuenta la capacidad de invasión del antagonista sobre la superficie del micelio del patógeno (Fernandez & Suárez, 2009).

Para estos ensayos, primero se realizó una pre-selección de los hongos de la filósfera contra la cepa patógena *Colletotrichum sp.*, este género fue el patógeno más frecuente en las hojas analizadas de cultivos de café infectados por hongos, por ello se seleccionó para las primeras pruebas de antagonismo. Luego, se realizó una segunda pre-selección contra las cepas patógenas *Fusarium oxysporum*. y *Phoma sp.*

### 3.6.6. Evaluación de la producción de enzimas hidrolíticas por los hongos antagonistas

Los hongos fueron evaluados por sus actividades lipolíticas, proteolíticas y quitinolíticas. Para ello, los hongos fueron sembrados en medios especiales preparados para determinar la presencia o ausencia de la enzima lítica.

#### - **Quitinasas**

Para la determinación de la producción de quitinasas se preparó un medio basal (MB) compuesto por: 0.3 g/L de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3.0 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.0 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0 g/L de ácido cítrico monohidratado, 15 g/L de agar, 200 µL/L de Tween 80, 4.5 g/L de quitina coloidal y 0.15/L g de púrpura de bromocresol, el pH se ajustó a 4.7 y luego se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min. El medio solidificado se observó de coloración amarilla brillante, se colocó un disco de 5 mm de micelio sacados de una placa con agar Czapeck, y se incubó a temperatura ambiente por 15 días. La prueba se realizó por triplicado y se evaluó el viraje de amarillo brillante a un violeta intenso (Agrawal & Kotasthane, 2012). Se consideró como control positivo al hongo quitinolítico *Trichoderma harzianum*.

### - **Proteasas**

Se empleó 10% de leche descremada en medio mínimo (0.003% de NaCl, 0.03% MgSO<sub>4</sub> y 0.015% de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) y 2% de agar (Zaferanloo *et al.*, 2014). El pH del medio fue de 6. Las placas se inocularon con discos de 5mm de diámetro con micelio de las cepas antagonicas sembradas en medio agar Avena y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 días. Se observó la producción de un halo transparente alrededor de la zona más próxima a la colonia, mientras que el resto del medio permaneció de color blanco, pues los microorganismos que producen la enzima caseínasa para hidrolizar la caseína, forman componentes de nitrógeno soluble, mostrados como una zona clara alrededor de la colonia en la placa Petri (Kedar *et al.*, 2018). Se consideró como control positivo al hongo proteolítico *Penicillium sp.*

### - **Lipasas**

Se utilizó un medio modificado para la determinación de lipasas, el cual está compuesto por (% p/v): extracto de levadura 0.5 %, peptona 0.2 %, agar 2%, suplementado con CaCl<sub>2</sub> 0.1% y Tween 80 0.1% (Ionita *et al.*, 1997). El pH del medio fue de 6. Las placas se inocularon con discos de 5mm de diámetro con micelio de las cepas antagonicas sembradas en medio Czapeck y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 días. Este método está basado en la hidrólisis del Tween 80 por lipasas, ya que contiene ésteres de ácido oleico. La liberación de los ácidos grasos unidos al calcio son incorporados en el medio, este complejo de calcio es visible como cristales alrededor del sitio de la colonia fúngica (Kumar *et al.*, 2012). Se observó una zona de opacidad alrededor de la colonia de los microorganismos, como resultado de la producción de lipasas. Se consideró como control positivo al hongo lipolítico *Aspergillus fumigatus*.

#### 3.6.7. Caracterización morfológica microscópica de los hongos antagonistas

La caracterización microscópica para hongos filamentosos se realizó mediante la técnica de microcultivo que consiste en obtener un cultivo sobre un portaobjetos y observar el hongo sin deterioro de su morfología (Trujillo & Echeverry, 2015).

#### 3.6.8. Ensayo *in vitro* para evaluar la capacidad de inhibir la germinación de las esporas de los hongos fitopatógenos *Colletotrichum sp.*, y *Fusarium oxysporum*.

Los hongos antagonistas que fueron evaluados son los pre-seleccionados en el ensayo anterior (metodología 3.6.5.), que presentaron porcentajes de inhibición mayores al 50 %. El método que se utilizó será el descrito por Moricca *et al.* (2001). En matraces Erlenmeyer

de 250 ml con 100 ml de medio PDC (Caldo papa dextrosa) se inoculó 1 ml de  $1 \times 10^7$  esporas de los hongos con actividad antagónica e incubados a 28 °C bajo agitación a 150 rpm por 14 días. El medio fue separado del micelio por filtración con papel filtro Whatman N° 1, luego fue centrifugado a 10 000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue esterilizado a través de filtros de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore).

Luego, en portaobjetos estériles con una capa fina solidificada del medio agar-agua (2 %) en la cara superior dividida en tres campos separados, se depositaron 40, 60 y 80  $\mu\text{l}$  del cultivo filtrado con 20  $\mu\text{l}$  de  $1 \times 10^6$  esporas/ml del hongo fitopatógeno. Finalmente, se incubó a 22 °C en placas Petri con cámara húmeda (Figura 11) y se evaluó la germinación de esporas después de las 6 y 12 horas. Se realizó 3 repeticiones para cada cultivo filtrado de los hongos antagónicos y como control, se agregó PDC sobre la capa fina de agar con las esporas inoculadas.

En las evaluaciones se contabilizó las esporas germinadas y no germinadas. Se consideró como germinada aquella que desarrolló un tubo germinativo igual o mayor al diámetro de la espora.



**Figura 11:** Cámara húmeda dividida en tres campos.

### 3.6.9. Ensayo *in vitro* para evaluar la capacidad de inhibir la germinación de las esporas de *Hemileia vastatrix*

Para la obtención de las urediniosporas, se recolectaron hojas de café de cultivos con signos de roya amarilla; es decir, presentaban lesiones foliares con pústulas naranjas sobre ellas, en donde se encontraban las urediniosporas. Estos cultivos fueron localizados en el distrito de Villa Rica, provincia de Oxapampa (selva central). Luego, las urediniosporas fueron trasladadas en condiciones de frío hasta el laboratorio. Posteriormente, se recogieron las

urediniosporas directamente de las hojas con un pincel estéril y se depositaron en un recipiente estéril (Figura 12) (Deepak, 2012).

Una suspensión de esporas de roya fue preparada, empleando una solución de agua destilada y tween 80 al 0.1 % previamente esterilizada, la cual se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^5$  urediniosporas por mililitro, con ayuda de una cámara de Neubauer.



**Figura 12:** Recolección de urediniosporas a partir de hojas de café infectadas con la roya amarilla.

Los hongos antagonistas evaluados fueron los pre-seleccionados en el ensayo anterior (metodología 3.6.5.), que presentaron porcentajes de inhibición mayores al 50 %.

Se utilizó el sobrenadante de cultivo filtrado obtenido con el método anterior. En matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio PDC (Caldo papa dextrosa) se inoculó 1 ml de  $1 \times 10^7$  esporas de los hongos con actividad antagónica e incubados a 28 °C bajo agitación a 150 rpm por 14 días. El medio fue separado del micelio por filtración con papel filtro Whatman N° 1, luego fue centrifugado a 10 000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue esterilizado a través de filtros de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore).

Las pruebas fueron hechas en portaobjetos estériles con una fina capa solidificada del medio agar-agua (2%) en la cara superior dividida en tres campos separados (Figura 10). Luego, sobre ella se depositó 60  $\mu\text{l}$  del cultivo filtrado con 20  $\mu\text{l}$  de una suspensión con  $1 \times 10^5$  urediniosporas/ml y se esparció empleando un asa de Digrafsky sobre el medio (Holst *et al.*, 2017).

Las láminas se colocaron dentro de una cámara húmeda. Se realizaron 3 repeticiones y se incubaron a temperatura ambiente, en oscuridad, durante 24 horas. En las evaluaciones se contabilizaron las urediniosporas germinadas y no germinadas. Se consideró como

germinada aquella que desarrolló un tubo germinativo igual o mayor al diámetro de la espora. Para el control, se colocó 20 µl de agua destilada estéril en lugar del cultivo filtrado.

#### 3.6.10. Evaluación de los componentes antifúngicos solubles presentes en los cultivos filtrados de los hongos antagonistas sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno

El método que se utilizó será el descrito por Suresh & Nelson (2016). En matraces con 100 ml de medio PDC (Caldo papa dextrosa), se inoculó con  $1 \times 10^7$  esporas de los hongos con actividad antagónica y fueron incubados a 28 °C bajo agitación a 150 rpm por 14 días. El medio fue separado del micelio por filtración con papel filtro Whatman N° 1, luego fue centrifugado a 10 000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue esterilizado a través de filtros de 0.22 µm (Millipore).

Luego, se empleó la técnica de difusión en pocillos de agar descrita por Magaldi *et al.* (2004). En una placa Petri con 15 ml de PDA, se perforó asépticamente un orificio de 6 mm de diámetro con un sacabocado estéril y se introdujo en el pocillo un volumen 100 µL del sobrenadante de cultivo filtrado de cada antagonista. Luego, se esperó a que el sobrenadante se difunda en el medio de agar por 6 h. Después, se colocó un disco de agar de 5 mm de diámetro de cada patógeno en el centro de la placa Petri. Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente por 9 días por triplicado. Los pocillos con 100 µl de medio PDC fueron usados como control. Se midió el diámetro de la colonia y se calculará el porcentaje de inhibición del crecimiento radial.

#### 3.6.11. Ensayo *in vitro* para evaluar la capacidad de parasitar a *H. vastatrix*

Los hongos antagonistas evaluados fueron los hongos pre-seleccionados en los ensayos de la sección 3.3.5 y 3.3.6, los cuales presentaron como mecanismo de acción al micoparasitismo, ya que son capaces de invadir la superficie del micelio del patógeno y secretar enzimas líticas que degradan la pared fúngica.

Para los ensayos de micoparasitismo se utilizó el método descrito por Holst *et al.*, 2017. Las pruebas fueron hechas en portaobjetos estériles con una fina capa solidificada del medio agar-agua (2 %) en la cara superior, sobre ella se depositó una alícuota de 10 µl de la suspensión de conidios del hongo a probar ( $1 \times 10^6$  conidios por mililitro) y una hora después, se colocarán 20 µl de la suspensión de urediniosporas ( $1 \times 10^5$  esporas/ml) previamente preparada. Las láminas se colocaron dentro de una cámara húmeda a temperatura ambiente, conformada por una placa Petri con papel absorbente al fondo, humedecido con agua destilada, todos estos materiales fueron previamente autoclavados.



Para cada hongo se realizaron 3 repeticiones y se evaluaron después de las 24, 48 y 72 h. En las evaluaciones se observó microscópicamente si existen interacciones como penetración o enrollamiento entre las hifas del hongo antagonista con las del hongo patógeno.

### 3.6.12. Análisis filogenético de los hongos antagonistas

El análisis filogenético se realizó para las cepas fúngicas con mayor capacidad antagónica.

#### a) Extracción de ADN

Cada hongo se colocó en matraces de 250 ml conteniendo 50 ml de medio PDC y se incubó a 28°C con agitación de 100 rpm durante 5 días (Vanegas *et al.*, 2014). El micelio obtenido fue colectado en papel filtro, lavado con agua destilada estéril 2 a 3 veces y triturado con el uso de nitrógeno líquido. El micelio molido fue utilizado para la extracción de ADN. Para ello, se utilizó el kit DNeasy PowerSoil y se siguió el protocolo establecido por el fabricante, con los siguientes pasos descritos:

En los tubos PowerBead se agregó 0,13 g de micelio molido y se homogenizó en vortex. Se adicionó 60 µl de la solución C1 y se mezcló por inversión. Luego, se llevó al vortex por 15 minutos a velocidad máxima y se centrifugó a 10000 x g durante 30 segundos. El sobrenadante se transfirió a un tubo colector de 2 ml y se adicionó 250µl de solución C2. Se agitó durante 5 segundos y se incubó a 4 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 x g y se transfirió el sobrenadante a un tubo colector limpio de 2 ml. Se adicionó 200µl de la solución C3, se homogenizó en vortex y se incubó a 4 °C durante 5 minutos. Luego, se centrifugó a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 x g y se transfirió 750µl de sobrenadante a un tubo limpio de 2 ml, se añadió 1200µl de la solución C4 al sobrenadante y se agitó durante 5 segundos. En una columna spin MB, primero se cargó solo 675 µl del sobrenadante y se centrifugó a 10.000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se descartó el fluido y se añadió 675 µl restantes de sobrenadante, luego se centrifugó a 10.000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Este último paso se repitió, se cargó el sobrenadante restante en la columna y se centrifugó a 10.000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Después, se añadió 500µl de Solución C5 y se centrifugó a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000 x g. Se descartó el fluido y se centrifugó de nuevo a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10000 x g. Finalmente se añadió 100 µl de la Solución C6 al centro de la membrana del filtro blanco de la columna spin MB y se centrifugó a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000 x g. Se descartó la columna spin MB y se almacenó el ADN a -20°C.

Además, la calidad del ADN se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % en tampón Tris-Borato-EDTA (Tampón TBE) (Syamsia *et al.*, 2019). Se mezclaron con 5 µl del ADN extraído y 1 µl de buffer de carga loading dye 6X. La corrida electroforética se llevó a cabo a 80 V por 60 min. Para el revelado del gel al término de la corrida se empleó una solución acuosa de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) durante 15 min. Posteriormente se transfirió el gel a una bandeja con agua destilada y se dejó reposar durante 10 min para su lavado. La presencia de bandas se evaluó a través de un foto-documentador de luz UV (Clever Scientific, Reino Unido). Luego, se determinó la concentración y pureza del ADN. Para ello, se tomó 1 µl de muestra de ADN y se introdujo en la lente del espectrofotómetro Nanodrop 2000 de la marca Thermo Scientific (Thermo, E.E. U.U.), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

**b) Amplificación de la región espaciadora interna (ITS) y genes Beta tubulina (B-tub) mediante PCR convencional**

El análisis filogenético de los hongos con capacidad antagónica se realizó en base a las amplificaciones por PCR de la región espaciadora interna (ITS) y el gen  $\beta$ - tubulina. Los cebadores utilizados fueron los cebadores universales ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (White *et al.*, 1990) y los cebadores btubF (5' TGGGCYAARGGYCACTACACYGA 3') y btubR (5' TCAGTGA ACTCCATCTCRTCCAT 3') (Tartar *et al.*, 2002)

La PCR se realizó para ambas amplificaciones en una mezcla de reacción de 25 µl, de acuerdo a la Tabla 1.

El programa utilizado para la amplificación fue el mismo para las secuencias de primers: 5 min de desnaturalización inicial a 95°C, seguido de 35 ciclos de amplificación (desnaturalización: 95 °C por 1 min, alineamiento: 60°C a 30 s y polimerización: 72 °C por 1 min) y una extensión final de 3 min a 72°C. Luego, se procedió a analizar el producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE a 100V por 1 hora.

**Tabla 1:** Reactivos y cantidades utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

| Reactivos                               | Volumen por reacción de 25 $\mu$ l | Concentración Final |
|---|------------------------------------|---------------------|
| Buffer con KCl (10X)                    | 2.5 $\mu$ l                        | 1X                  |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)               | 1.5 $\mu$ l                        | 1.5 mM              |
| Mix de dNTPs (25 mM)                    | 0.2 $\mu$ l                        | 0.2 mM              |
| Cebador Forward 10 $\mu$ M              | 0.5 $\mu$ l                        | 0.2 $\mu$ M         |
| Cebador Reverse 10 $\mu$ M              | 0.5 $\mu$ l                        | 0.2 $\mu$ M         |
| <i>Taq</i> DNA polymerase (5U/ $\mu$ l) | 0.2 $\mu$ l                        | 0.04 U/ $\mu$ L     |
| ADN (10 ng/ $\mu$ l)                    | 5 $\mu$ l                          | 2 ng/ $\mu$ l       |
| Agua MilliQ                             | c.s.p. 25 $\mu$ l                  | -                   |

### c) Análisis Filogenético

Los productos de PCR purificados de las secuencias ITS fueron enviados a secuenciar a Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur) de acuerdo con las especificaciones de la compañía. Luego, los resultados de las secuencias fueron examinadas y editadas con el programa BioEdit (Hall, 1999). Con la base de datos pública GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y la herramienta BLASTn (Basic Local Alignment Tool for nucleotides) se identificaron las secuencias conocidas más similares, las cuales junto con las secuencias de este estudio fueron alineadas con el programa Clustal X 2.1.10 (Thompson *et al.*, 1994). La matriz obtenida fue empleada para realizar análisis filogenéticos basados en los algoritmos de Neighbor Joining (NJ), con distancia genética calculada por el método de Kimura dos-parámetros (Vanegas *et al.*, 2014), mediante el software Mega 7.0 (Kumar *et al.*, 2016).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. Aislamiento y Caracterización Macroscópica de la diversidad fúngica de la filósfera del Café en plantas susceptibles y resistentes a la Roya Amarilla

Se aisló en total 118 cepas fúngicas diferentes, de las cuales 48 cepas pertenecen a las variedades susceptibles (Bourbon, Caturra roja y Typica) y 70 cepas pertenecen a las variedades resistentes (Catimor, Costa rica 95 y Limaní). En este grupo de cepas fúngicas aisladas se encuentran tanto hongos epífitos como endófitos, ya que el aislamiento fue a partir de hojas trituradas.

**Tabla 2:** Diversidad fúngica de la filósfera del café por cada variedad de cultivo

| Variedad de Cultivo de Café | Nº de cepas fúngicas diferentes encontradas |
|-----------------------------|---|
| Bourbon                     | 10  |
| Caturra roja                | 29  |
| Typica                      | 8   |
| Catimor                     | 9   |
| Costa Rica 95               | 26  |
| Limaní                      | 36  |

Nota: Para diferenciar cada cepa, se realizó una caracterización macroscópica de todas las cepas (Anexo 1).

La diversidad fúngica de la filósfera reportada en otros cultivos como la manzana (*Malus domestica*), fue de 107 cepas fúngicas diferentes aisladas a partir de 5 variedades (Fiss *et al.*, 2000). Asimismo, en el eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) se encontraron 33 cepas fúngicas diferentes (Kharwar *et al.*, 2010) y en la cebolla (*Allium cepa*) se aislaron 20 cepas fúngicas diferentes (Mohamed, 2001). De manera similar, en este estudio, se aislaron aproximadamente 20 cepas diferentes por cada variedad de Café, considerándose esta cantidad de cepas diferentes como una diversidad fúngica común en varios cultivos.

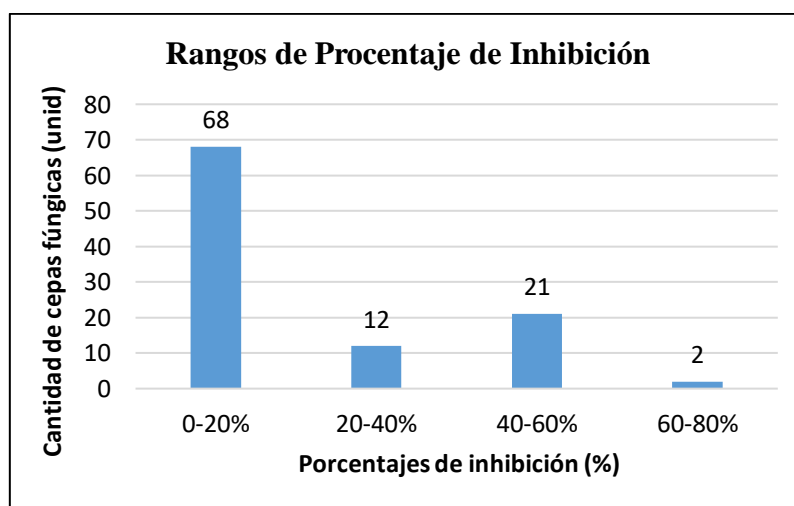
La caracterización macroscópica de los hongos aislados de la filósfera se muestra en el Anexo 1. El 17% de estas cepas fúngicas presentaban una textura cremosa, de colores blanco,

crema y rosados, característico de las levaduras. Mientras que el 83% restante, pertenece a la morfología miceliar, donde el 29% presentaban una textura aterciopelada, de colores oscuros, el 10% presentaba una textura algodonosa de color blancuzco y el 41% presentaba una textura pulverulenta de colores naranjas y verdosos. Estas cepas se encuentran criopreservadas en el cepario del laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología - UNALM.

#### 4.2. Primera pre-selección de los hongos de la filósfera con capacidad antagonica contra *Colletotrichum sp.*

Todas las 118 cepas fúngicas fueron evaluadas mediante el método de enfrentamiento dual y se obtuvo que 48 cepas (41%) presentaban actividad antifúngica. Este alto porcentaje de hongos antagonistas también se ha encontrado en otros cultivos, como en el arroz (50% contra *Cercospora oryzae*) (Mardani y Hadiwiyono, 2018), en la cebolla (52.75% contra *Alternaria porri*) (Abdel *et al.*, 2015), en el manzano (23.34% contra *Venturia inaequalis*) (Fiss *et al.*, 2015). Esto indica que gran parte de la población fúngica de la filósfera podría cumplir un rol importante en la defensa contra los patógenos fúngicos.

Según las variables estudiadas, se encontró que 35 cepas inhiben más del 20% del crecimiento miceliar de *Colletotrichum sp.* y que 15 cepas fueron capaces de invadir el micelio de *Colletotrichum sp.* Las imágenes del enfrentamiento dual de las cepas antagonicas contra *Colletotrichum sp.* se encuentran en el Anexo 2.



**Figura 13:** Porcentajes de inhibición del crecimiento miceliar de *Colletotrichum sp.* frente a las cepas fúngicas aisladas de la filósfera de las plantas de café.

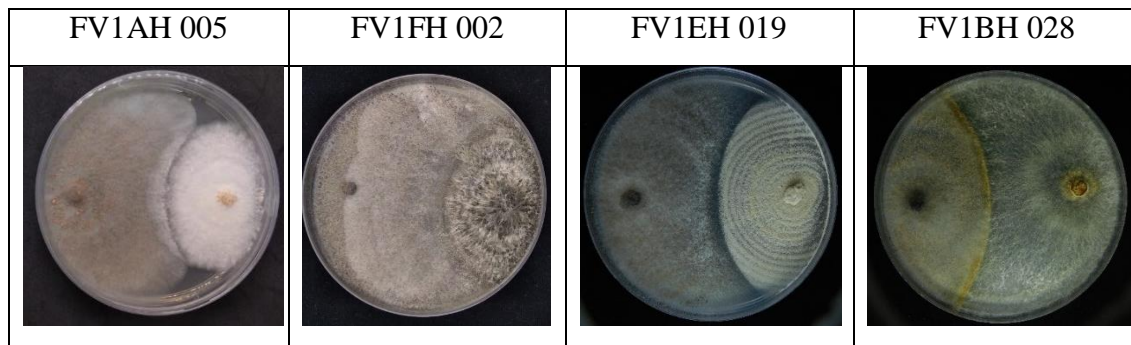
Los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum sp.* frente a las cepas fúngicas aisladas de la filósfera se pueden observar en la Figura 13. Un total de 23 cepas fúngicas inhiben más del 40 % del crecimiento micelial de *Colletotrichum sp.*, estos porcentajes se muestran en la Tabla 3. A partir de estos datos, se preseleccionaron las cepas que producen una inhibición micelial mayor al 45%, (19 cepas fúngicas), ya que la inhibición producida por estos hongos presenta mayores diferencias significativas.

**Tabla 3:** Evaluación de los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum sp.*

| <b>Tratamiento</b><br>(Cepa fúngica vs <i>Collectotrichum sp.</i> ) | <b>Porcentaje de Inhibición (%)</b> |
|---|-------------------------------------|
| FV1EH 007   | 63.606125 a                         |
| FV1CH 002   | 61.435323 b                         |
| FV1BH 027   | 57.065600 c                         |
| FV1EH 021   | 56.084740 cd                        |
| FV1EH 012   | 53.753683 d                         |
| FV1FH 006   | 53.448372 de                        |
| FV1FH 008   | 53.043575 de                        |
| FV1BH 026   | 52.970919 de                        |
| FV1BH 018   | 52.643968 de                        |
| FV1EH 003   | 52.021204 e                         |
| FV1EH 015   | 51.930384 e                         |
| FV1EH 004   | 51.834374 e                         |
| FV1EH 014   | 50.588846 fg                        |
| FV1BH 011   | 47.454266 fg                        |
| FV1FH 023   | 46.625442 g                         |
| FV1DH 002   | 45.798751 gh                        |
| FV1EH 010   | 45.593757 gh                        |
| FV1EH 013   | 45.531481 gh                        |
| FV1FH 017   | 45.238263 gh                        |
| FV1BH 002   | 43.157192 hi                        |
| FV1FH 022   | 42.845810 hij                       |
| FV1BH 001   | 41.512057 ijk                       |
| FV1FH 021   | 40.391081 ijkl                      |
| Control   | 0.000                               |

Nota: Tratamientos seguidos por la misma letra no difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Rangos Múltiples ( $p < 0.05$ ).

Al evaluar el micoparasitismo como mecanismo de acción de las cepas fúngicas antagonistas, se encontró que las hifas de las cepas antagonistas solo mostraban una invasión de alrededor de 1/4 de la superficie de la colonia de *Colletotrichum sp.* (Figura 14), con excepción de la cepa FV1FH 002, la cual invadió más de la mitad de la superficie de *Colletotrichum sp.* Estas cepas serán evaluadas más adelante por la producción de enzimas líticas. Las cepas diferentes preseleccionadas que invaden la superficie de la colonia fueron 4: FV1AH 005, FV1FH 002, FV1EH 009 y FV1BH 028.



**Figura 14:** Observación de la invasión de la cepa antagonista sobre la superficie micelial *Colletotrichum sp.* (izquierda) en el ensayo de enfrentamiento dual.

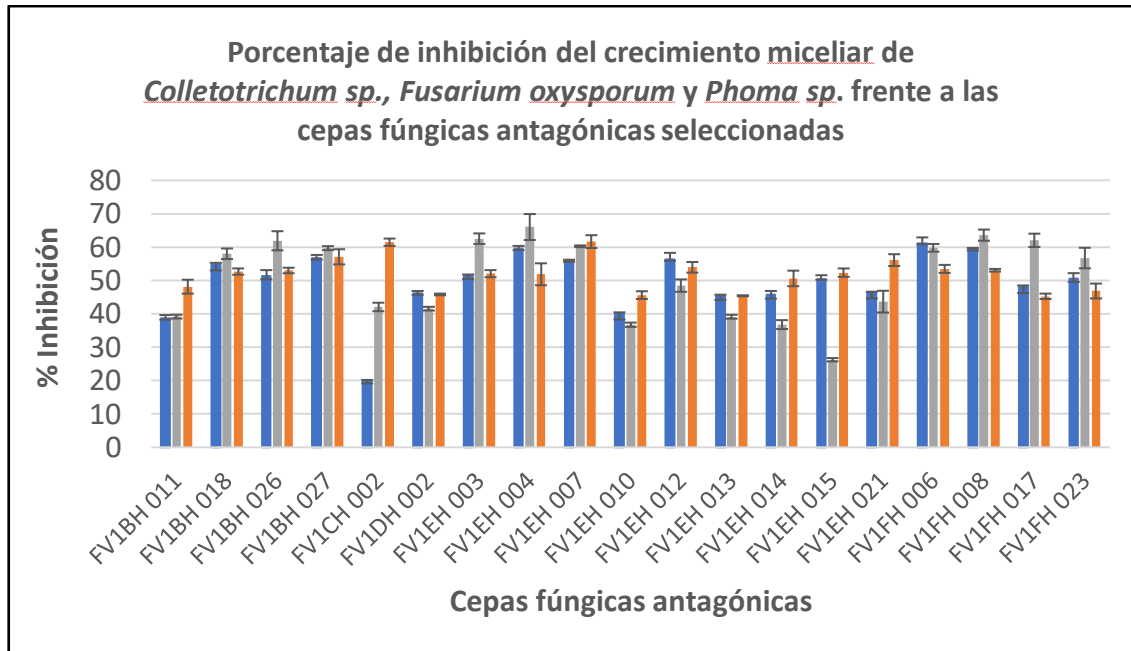
#### 4.3. Segunda pre-selección de los hongos de la filósfera con capacidad antagonica contra *Fusarium oxysporum*. y *Phoma sp.*

Las 19 cepas fúngicas pre-seleccionadas que inhiben el crecimiento micelial de *Collectotrichum sp.* fueron evaluadas mediante el enfrentamiento dual *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* y *Phoma sp.*

Según Harman (2005), para que un producto sea considerado como biocontrolador efectivo en campo, debe arrojar al menos 60% de inhibición en la técnica de enfrentamiento dual en laboratorio. Por ello, se seleccionaron las cepas que inhiben el crecimiento micelial en más del 50%.

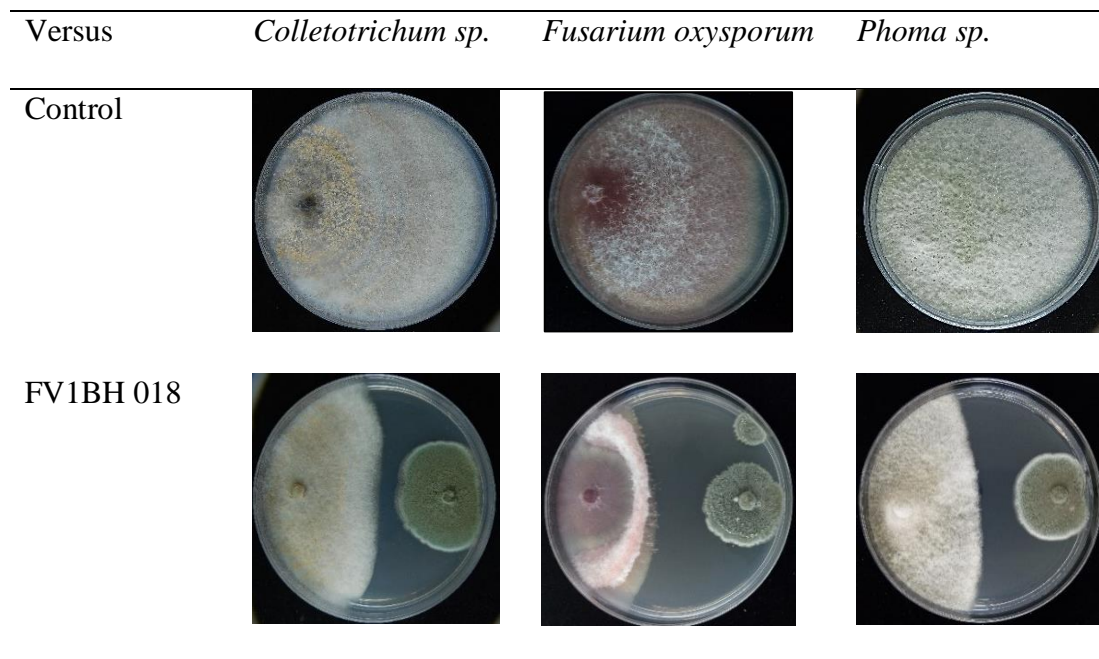
Los resultados se pueden observar en la Figura 15, donde solo 11 cepas inhibieron más del 50% del crecimiento micelial de al menos dos hongos fitopatógenos.

La mayoría de estas 11 cepas pertenecen al género *Penicillium*, identificadas mediante sus características microscópicas. La actividad antagonica por especies de *Penicillium* contra fitopatógenos han sido observadas, y estas han sido reportadas en relación a la producción de enzimas líticas extracelulares, secreción de antibióticos y metabolitos secundarios tóxicos para hongos (Nicoletti *et al.*, 2004, Abdel *et al.*, 2015, Mardani y Hadiwiyono, 2018).



**Figura 15:** Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* (barras azules), *Phoma sp.* (barras plomas) y *Colletotrichum sp.* (barras naranjas) frente a las cepas fúngicas antagonistas seleccionadas

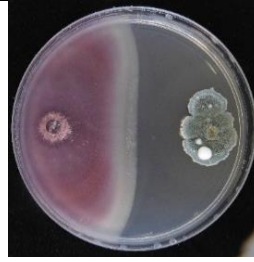
En el enfrentamiento dual, se observa que estos hongos causan una reducción de la esporulación en el borde de la zona de inhibición (Figura 16), lo cual podría ser debido a la secreción de sustancias antibióticas circulantes en el medio de cultivo. (Barakat *et al.*, 2014).





Continuación ...

FV1BH 026



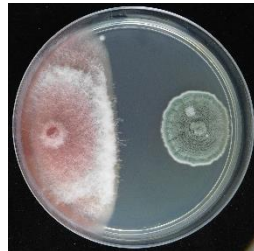
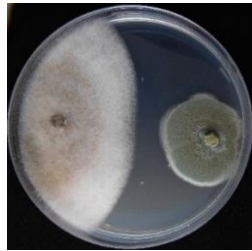
FV1BH 027



FV1EH 003



FV1EH 004



FV1EH 007



FV1EH 012



Continuación ...

FV1EH 015



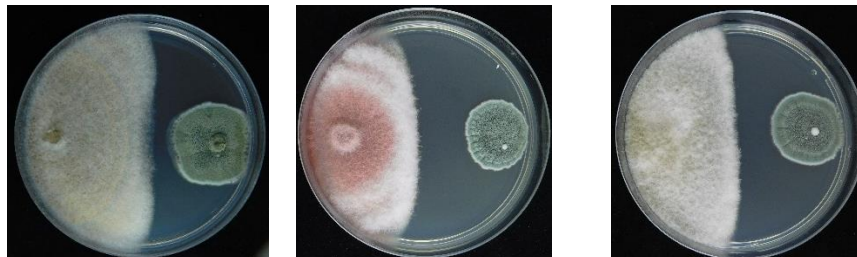
FV1FH 006



FV1FH 008

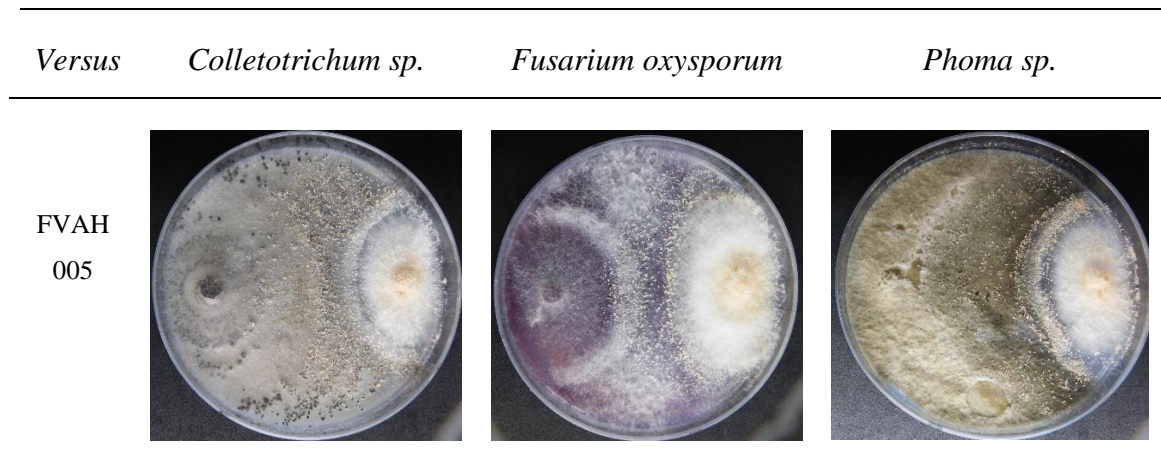


FV1FH 023



**Figura 16:** Enfrentamiento dual entre las cepas antagonicas seleccionadas y las cepas fúngicas fitopatógenas (*Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum* y *Phoma sp.*).

Las 4 cepas pre-seleccionadas que invadían la superficie de la colonia de *Colletotrichum sp.* también fueron evaluadas mediante el enfrentamiento dual *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* y *Phoma sp.* y se encontró que solo la cepa FVAH 005 también invadía la superficie de los otros dos hongos fitopatógenos (Figura 17).



**Figura 17:** Enfrentamiento dual entre la cepa FVAH 005 y las cepas fúngicas fitopatógenas (*Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum* y *Phoma sp.*).

#### 4.4. Evaluación de la producción de enzimas hidrolíticas por los hongos antagonistas seleccionados

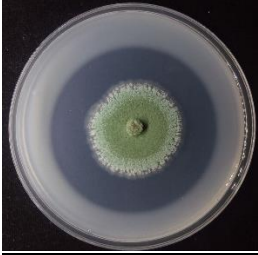
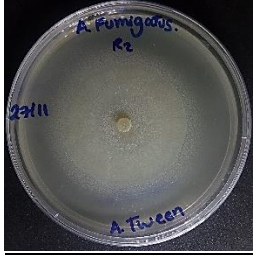
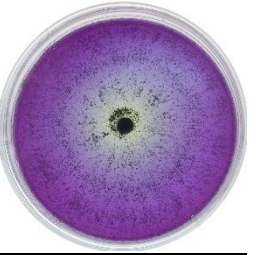
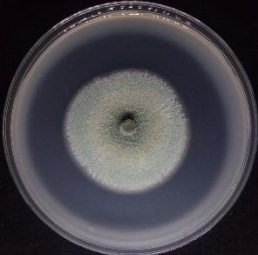


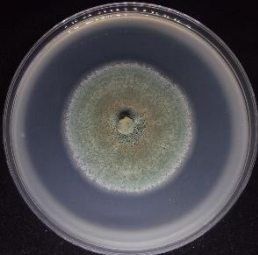

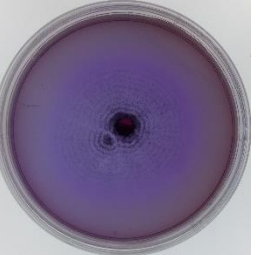




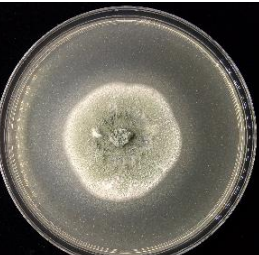

Las 11 cepas fúngicas, que producen una inhibición micelial mayor al 50%, y los 4 hongos seleccionados, que invaden la superficie de los patógenos, fueron evaluadas para determinar la producción extracelular de enzimas líticas.

En la Tabla 4, se observa que todos los hongos que secretan compuestos antifúngicos, como los *Penicillium*, producen enzimas extracelulares líticas. Sin embargo, no todos los hongos que son capaces de invadir el micelio de los patógenos fúngicos, producen enzimas extracelulares.

Además de la antibiosis, los hongos antagonistas tienen otros mecanismos para atacar a los hongos patógenos, como la competencia por nutrientes y el micoparasitismo. El micoparasitismo, consiste en la secreción de enzimas extracelulares, como las proteasas, lipasas y quitinasas, para degradar y perforar la pared celular de los hongos filamentosos (Parmar *et al.*, 2015). Por ello, se determinó la producción de estas enzimas.



**Tabla 4:** Producción de enzimas hidrolíticas extracelulares por los hongos antagonistas seleccionados.

|              | <u>Proteasa</u>   | <u>Lipasa</u>  | <u>Quitinasa</u>  |
|--------------|---|--|---|
| Control      |    |    |    |
| FV1BH<br>018 |    |    |    |
|              | Reacción: +++   | Reacción: ++   | Reacción: +++   |
| FV1BH<br>026 |   |   |   |
|              | Reacción: +++   | Reacción: ++   | Reacción: +++   |
| FV1BH<br>027 |  |  |  |
|              | Reacción: +++   | Reacción: ++   | Reacción: +   |
| FV1EH<br>003 |  |  |  |
|              | Reacción: +++   | Reacción: ++   | Reacción: ++  |

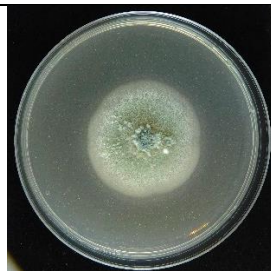
Continuación ...

FV1EH

004



Reacción: +++



Reacción: -



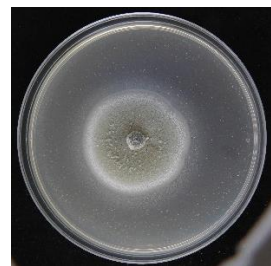
Reacción: ++

FV1EH

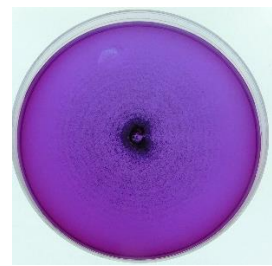
007



Reacción: +++



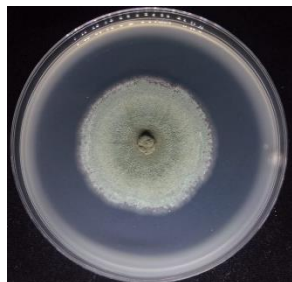
Reacción: ++



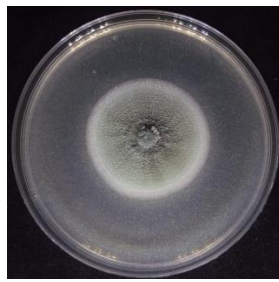
Reacción: +++

FV1EH

012



Reacción: +++



Reacción: ++



Reacción: ++

FV1EH

015



Reacción: +



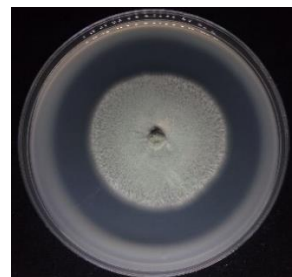
Reacción: +



Reacción: +

FV1FH

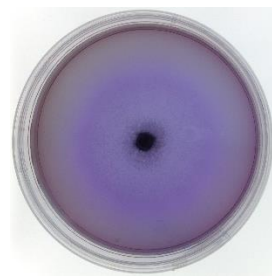
006



Reacción: +++



Reacción: ++



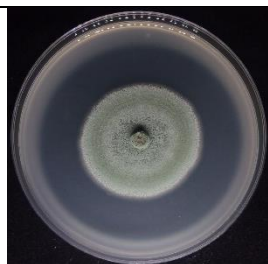
Reacción: +++



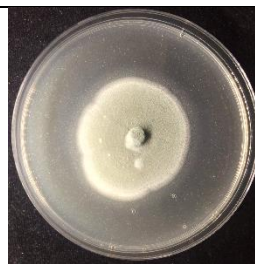
Continuación ...

FV1FH

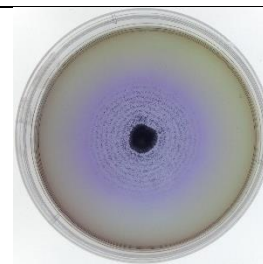
008



Reacción: +++



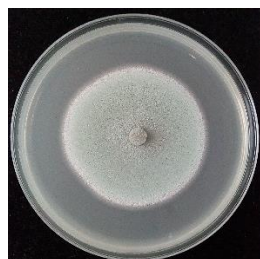
Reacción: ++



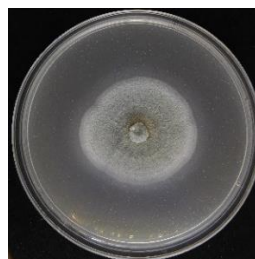
Reacción: ++

FV1FH

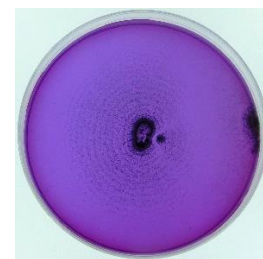
023



Reacción: +++



Reacción: ++



Reacción: +++

FV1AH

005



Reacción: +++



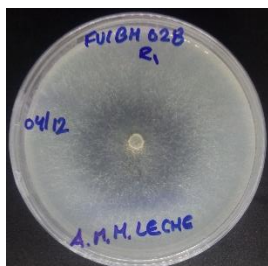
Reacción: -



Reacción: +++

FV1BH

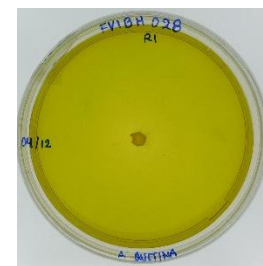
028



Reacción: -



Reacción: -



Reacción: -

Nota: (-): negativo; (+): la reacción ocupa menos del 50% de la placa; (++) : la reacción ocupa el 50% de la placa; (+++): la reacción ocupa más del 50% de la placa.

El medio suplementado con quitina coloidal y púrpura de bromocresol se utilizó para determinar la producción de enzimas quitinasas. Debido a que la quitina no es fácilmente soluble en agua, la quitina a menudo se modifica químicamente para formar quitina coloidal, con un tamaño de partícula pequeño que se manipula más fácilmente para obtener una distribución homogénea en el medio de agar (Murthy & Bleakley, 2012). En el medio preparado, la quitina coloidal está compuesta por moléculas del polisacárido, formando puentes de hidrogeno entre la matriz de quitina y el colorante. La quitobiosa es un mínimo

de unidades repetidas de quitina, y están formadas por dos moléculas de N-acetilglucosamina unidas por el enlace B 1,4 glucosídico. En todo residuo de N-acetilglucosamina, hay dos grupos hidroxilos, un grupo carbonil y una imina, que podrían actuar como un sitio de unión reactivo para colorantes aniónicos, como el púrpura de bromocresol, produciendo un complejo de unión-color (en este caso, amarillo) (Agrawal & Kotasthane, 2012).

La producción de quitinasas se determina por el cambio de color del medio (de amarillo a púrpura), debido a un cambio de pH hacia la alcalinidad, causado por la ruptura de la quitina a moléculas N- acetilglucosaminas (Agrawal & Kotasthane, 2012).

Los hongos quitinolíticos encontrados, con alta producción de quitinasas, son las cepas FV1AH 005, FV1BH 026, FV1BH 021, FV1EH 007, FV1FH 006 y FV1FH 023.

El medio suplementado con leche descremada se utilizó para identificar hongos proteolíticos capaces de hidrolizar la caseína. Los microorganismos utilizan la enzima caseínasa para hidrolizar la caseína y formar componentes de nitrógeno soluble, mostrados como una zona clara alrededor de la colonia en la placa Petri (Kedar *et al.*, 2018). Los hongos proteolíticos encontrados, con alta producción de caseínasas, son las cepas FV1AH 005, FV1BH 018, FV1BH 021, FV1BH 026, FV1BH 027, FV1EH 003, FV1EH 007, FV1FH 006 y FV1FH 008 y FV1FH 023.

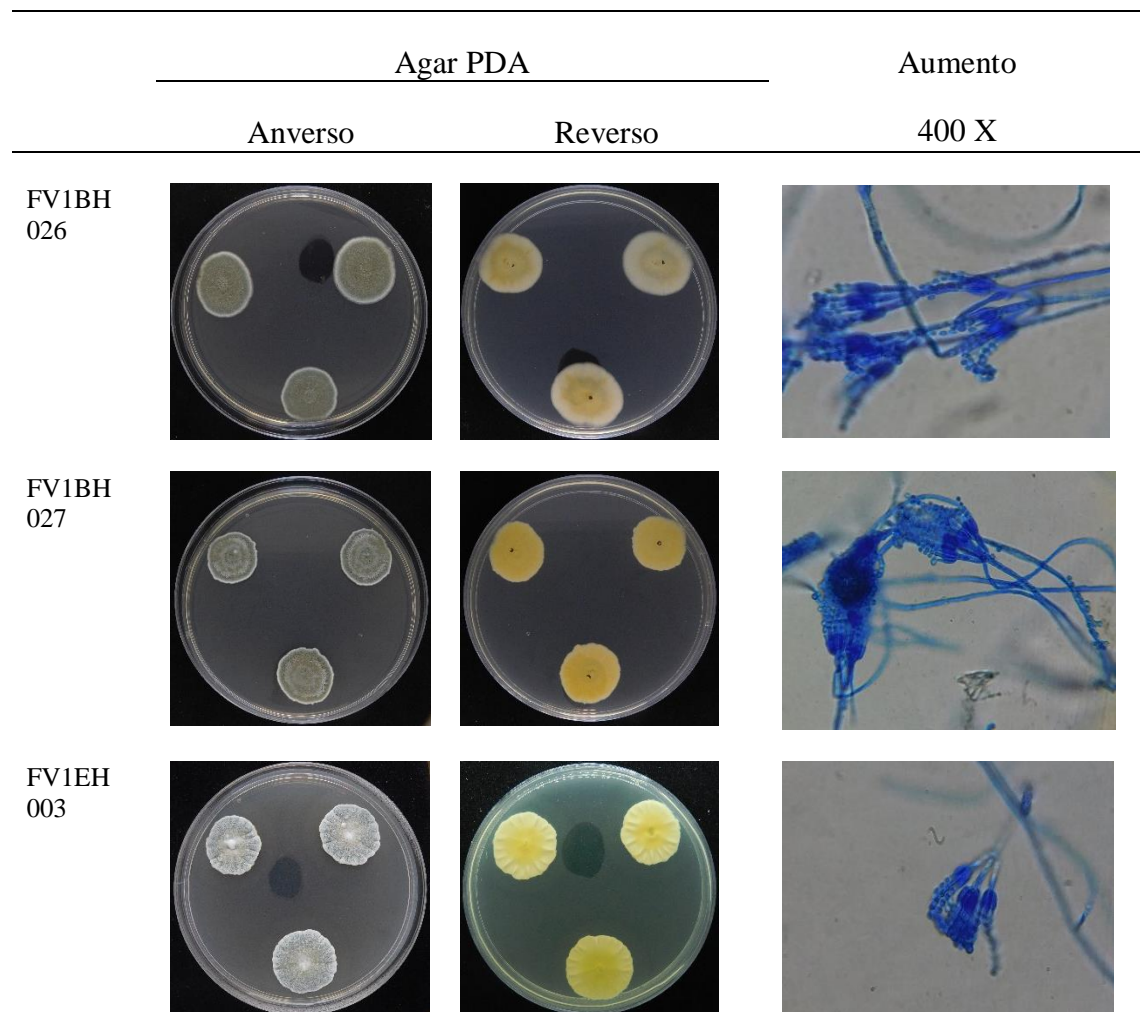
El medio suplementado con tween 80 y cloruro de calcio es utilizado para detectar microorganismos productores de enzimas lipasas. El tween 80 es hidrolizado mayormente por lipasas, ya que contiene esteres de ácido oleico. Este método está basado en la precipitación, ya que las sales de calcio de los ácidos grasos son liberadas por la hidrolisis del tween. La liberación de los ácidos grasos unidos al calcio son incorporados en el medio, este complejo de calcio es visible como cristales alrededor del sitio de la colonia fúngica (Kumar *et al.*, 2012). Los hongos lipolíticos encontrados, con alta producción de lipasas, son las cepas FV1BH 021, FV1BH 026, FV1BH 027, FV1EH 003 y FV1FH 006.

Estos resultados indica, que los hongos antagonistas estudiados que secretan gran cantidad de estas enzimas, son las cepas FV1AH 005, FV1BH 026, FV1BH 021, FV1EH 007, FV1FH 006 y FV1FH 023 quienes podrían parasitar a los hongos fitopatógenos.

#### 4.5. Caracterización Microscópica de los hongos antagonistas

Son 8 los hongos capaces de inhibir el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos, fueron caracterizados en cultivos con PDA (Figura 18). Microscópicamente presentaban las características de los hongos miceliares del género *Penicillium*, con hifas hialinas septadas, conidióforos con ramas secundarias, denominadas métulas. Estas son de forma cilíndrica, con paredes lisas y portan de 3 a 6 fiálides, de las cuales surgen largas cadenas sin ramificar de esporas o conidios formando el penacho o pincel característico del género (Soriano, 2007).

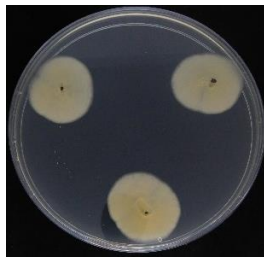
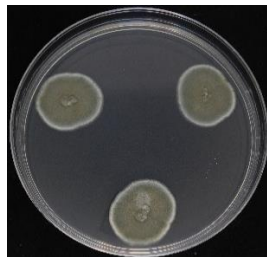
Otro hongo micelial caracterizado fue la cepa FVAH 005, este hongo presentaba una textura algodonosa y granulosa, de color blanco con bordes y surcos anaranjados claros. Microscópicamente, esta cepa presenta hifas hialinas y septadas, con conidióforos verticilados.



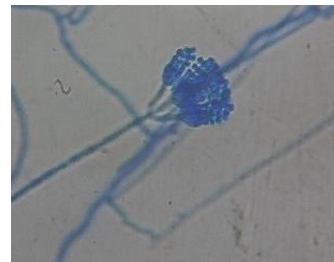
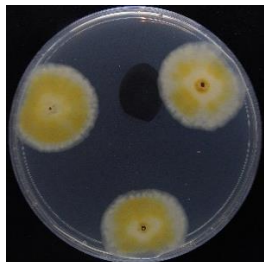
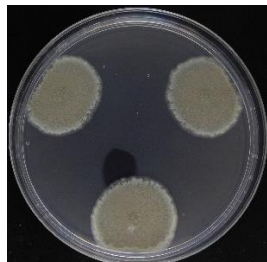


Continuación ...

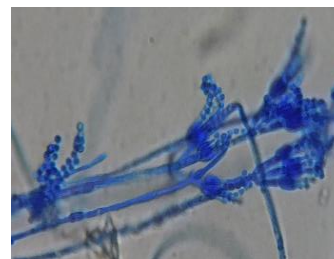
FV1EH  
004



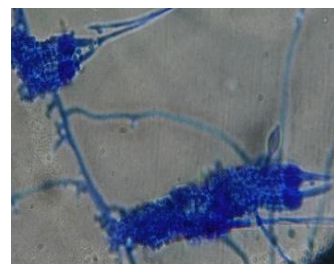
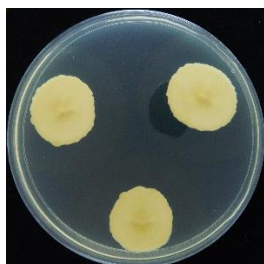
FV1EH  
015



FV1FH  
006



FV1FH  
023



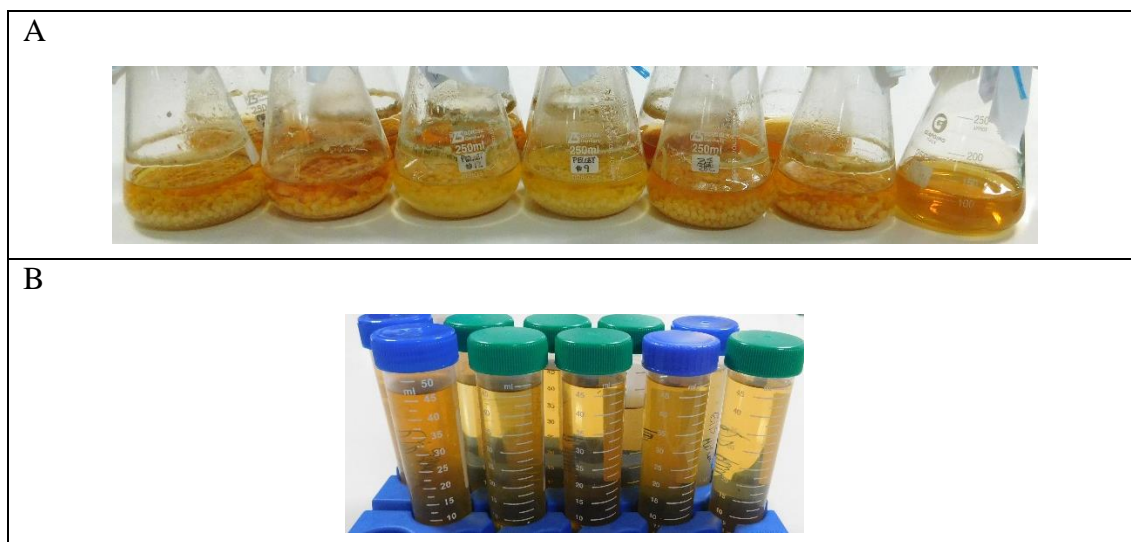
FV1AH  
005



**Figura 18:** Caracterización macroscópica y microscópica de los hongos antagonistas de la filosfera del café

#### 4.6. Ensayo *in vitro* para evaluar la capacidad de inhibir la germinación de esporas de los hongos fitopatógenos necrótrofos *F. oxysporum* y *Colletotrichum sp.*

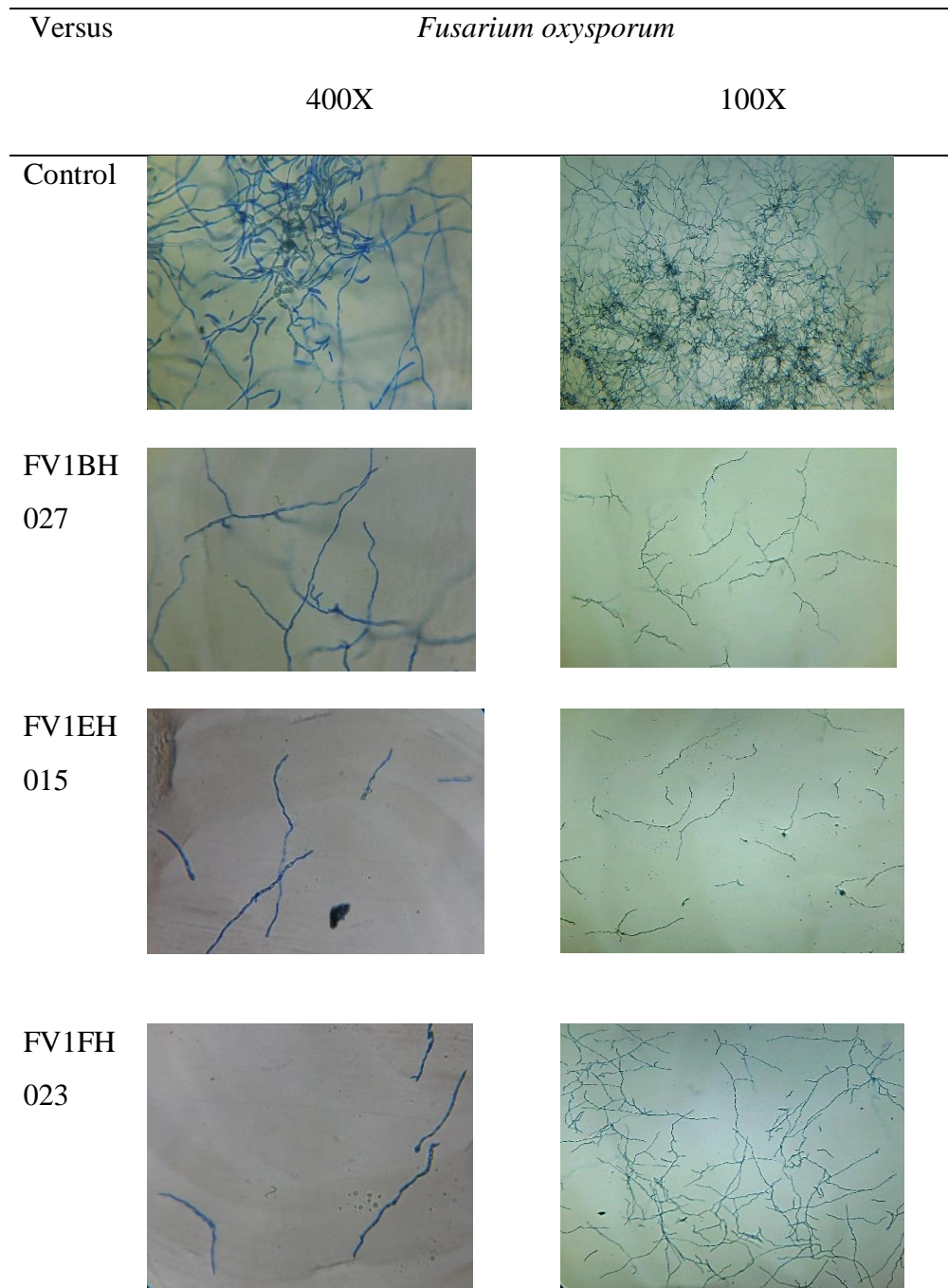
Los cultivos filtrados de las 11 cepas fúngicas seleccionadas capaces de inhibir el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos (Figura 19) fueron evaluadas para inhibir la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum sp.*



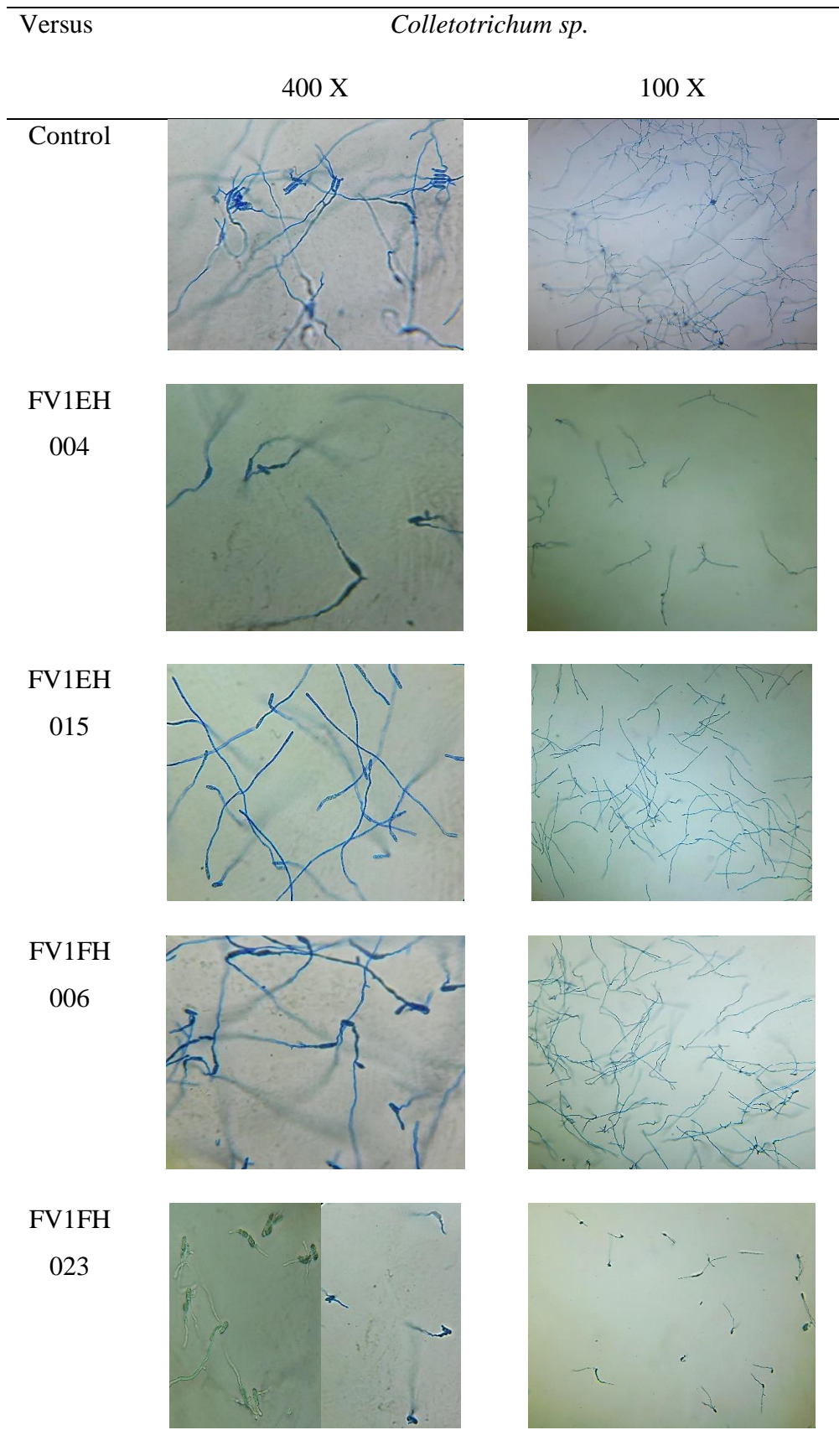
**Figura 19:** Cultivo en suspensión de las cepas fúngicas antagonistas seleccionadas. A. Cultivo de las cepas fúngicas antagonistas en medio Papa Dextrosa. B. Cultivos filtrados de las cepas fúngicas antagonistas

En este ensayo, no se observó una inhibición de esporas con ninguno de los tratamientos, pero si se observó la inhibición del crecimiento micelial del tubo germinativo de los hongos fitopatógenos. Los resultados se pueden observar en la Figura 20 y Figura 21, donde solo 2 cepas (FV1EH 015 Y FV1FH 023) inhibieron el crecimiento micelial del tubo germinativo de ambos hongos fitopatógenos.

La cantidad de cultivo filtrado utilizado para inhibir el crecimiento micelial del tubo germinativo del patógeno fue de 60  $\mu$ l. Antes de iniciar este ensayo, se probó diferentes cantidades (40, 60 y 80  $\mu$ l), y se encontró que utilizando 40  $\mu$ l, la inhibición era menor, y con 80  $\mu$ l, era muy parecida a la de 60  $\mu$ l, por ello se eligió esta cantidad.



**Figura 20:** Evaluación de la inhibición del crecimiento micelial del tubo germinativo de *Fusarium oxysporum* en cámara húmeda a las 24 h.

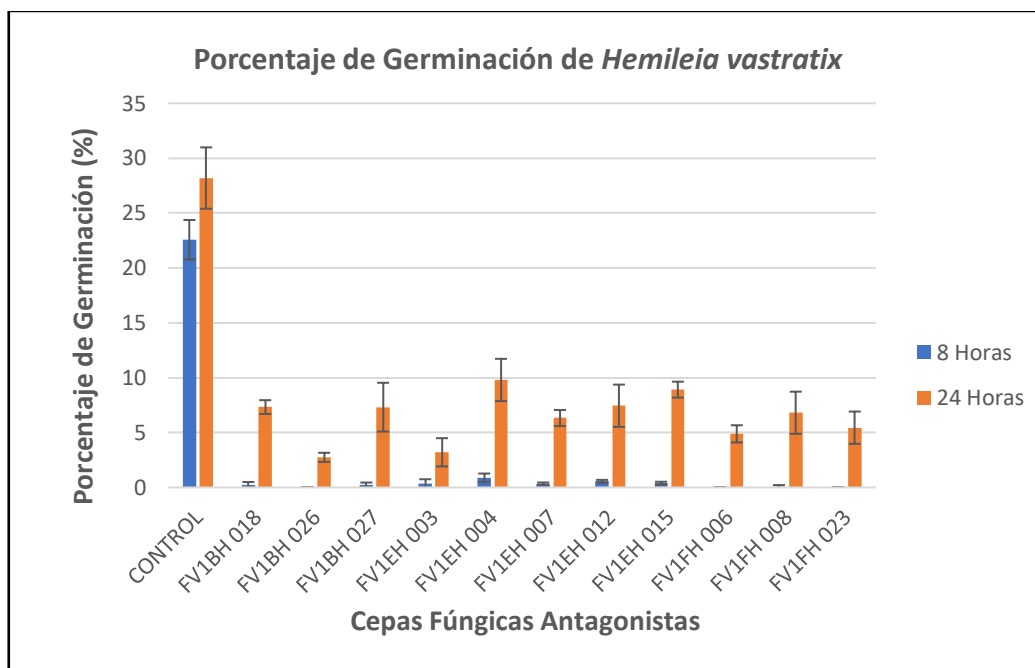


**Figura 21:** Evaluación de la inhibición del crecimiento micelial del tubo germinativo de *Colletotrichum sp.* en cámara húmeda a las 24 h.



#### 4.7. Ensayo *in vitro* para evaluar la capacidad de inhibir la germinación de las esporas de *H. vastatrix*

Las 11 cepas fúngicas seleccionadas, las cuales producen una inhibición miceliar mayor al 50% en al menos dos hongos fitopatógenos, fueron cultivadas en caldo papa dextrosa por 14 días, y luego filtradas. El cultivo filtrado fue probado para evaluar su capacidad de inhibir la germinación de las esporas de *H. vastatrix*. Los resultados se pueden observar en la Figura 22.

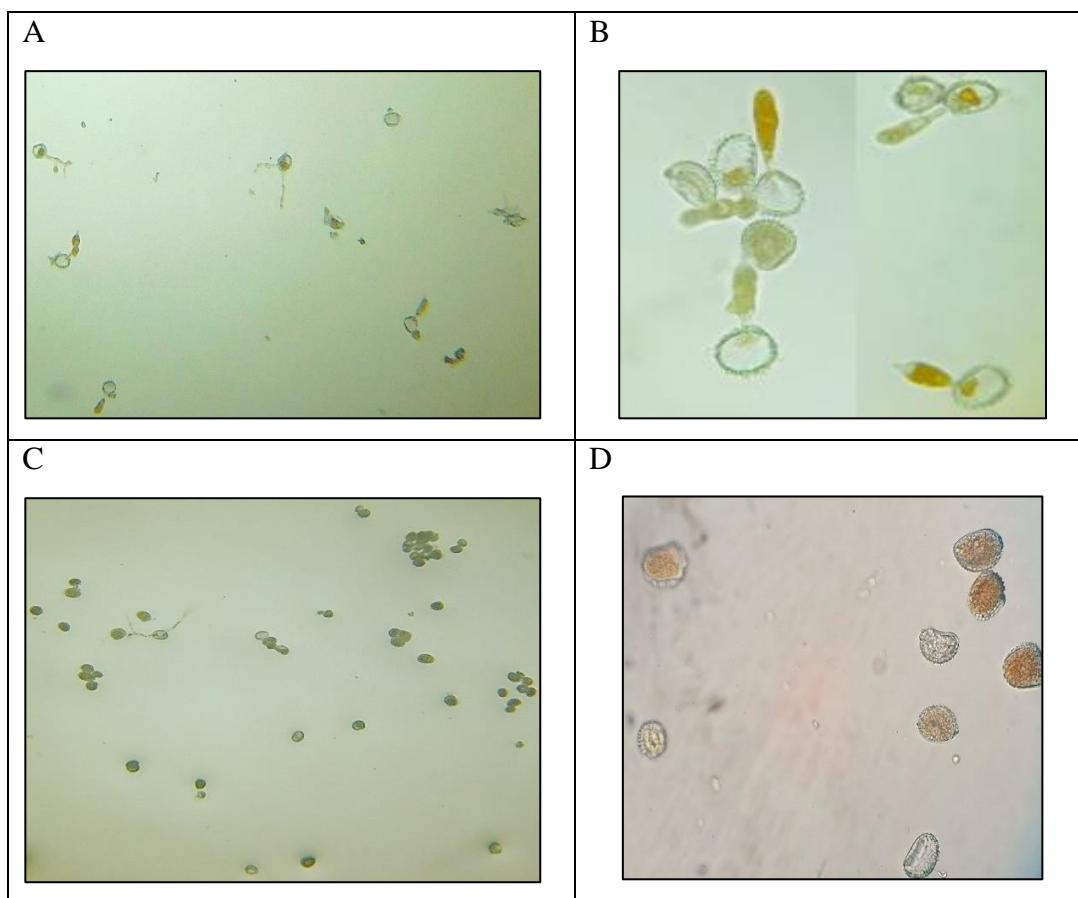


**Figura 22:** Porcentaje de Germinación de *H. vastratix*. Porcentaje de Germinación de *H. vastratix* en 8 horas (barras azules) y 24 horas (barras naranjas) después de inocular sus urediniosporas con los cultivos filtrados de las cepas fúngicas antagónicas seleccionadas.

Se encontró que los cultivos filtrados de los hongos antagonistas sí inhiben la germinación de *H. vastatrix*. En la Figura 23 se puede observar la germinación de las urediniosporas de manera *in vitro*. Los hongos antagonísticos con mayor porcentaje de inhibición son las cepas FV1BH 026 (89%) y la cepa FV1FH 003 (87%).

La fase de infección temprana de las urediniosporas es extremadamente sensible y su proceso de infección en las hojas podría ser susceptible a la interferencia de microorganismos antagonistas. *H. vastatrix*, es un patógeno biótrofo; por lo tanto, depende de las células hospederas para su nutrición, crecimiento y multiplicación. Se ha reportado que la germinación de las urediniosporas requiere de agua libre sobre la hoja, señalización de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>, y componentes de la hoja como la sucrosa (Stephen *et al.*, 2005). En este estudio, la germinación de las urediniosporas de la roya fue llevada de manera *in vitro*, y solo fue

inducida por agua libre, esta podría ser la razón por la que hubo un porcentaje bajo (30%) de urediniosporas germinadas en el control.



**Figura 23:** Inhibición de la germinación de las urediniosporas de *Hemileia vastatrix*. A y B: Control a 100X y 400X. C y D: Urediniosporas con 60 µl de cultivo filtrado de FV1BH 026.

Los hongos del género *Penicillium* producen importantes componentes antibacterianos, pero solo pocos han sido reportados como productores de sustancias antifúngicas (Khokhar *et al.*, 2011). Se han reportado diversas especies de *Penicillium* antagonistas de hongos fitopatógenos, como: *P. restrictum* (Nicoletti & Stefano, 2012), *P. canescens*, *P. janczewskii*, *P. sulphurellum* y *P. camemberti*, antagonistas de *Rizoctonia solani* (Dimerci *et al.*, 2011), *P. oxalicum* y *P. polonicum*, antagonistas de *Fusarium oxysporum* (Mejdoub *et al.*, 2017), *P. digitatum* antagonista de *Phytophthora palmivora* (Adebola & Amadi, 2012) y *P. citrinum* antagonista contra *Botrytis cinerea* (Sreevidya & Gopalakrishnan, 2016) y *Aspergillus welwitschiae* (Lopes *et al.*, 2019)

Además, se ha estudiado los componentes antifúngicos que secretan este género, como *Penicillium chrysogenum*, que secreta abundantemente una pequeña proteína altamente básica denominada PAF (Penicillium antifungal protein), esta proteína inhibe el crecimiento

y reduce la germinación de conidias de diversos hongos filamentosos, incluyendo patógenos de humanos y fitopatógenos, sin dañar a las bacterias y levaduras (Kaiserer *et al.*, 2003).

Otro componente antifúngico es el 3-o-methylfunicone producido por *Penicillium pinophilum*, la cual inhibe completamente el crecimiento de *Rhizoctonia solani* y otras especies de hongos fitopatógenos cultivados en agar a una concentración de 0.1 mg/ml (Salvatore *et al.*, 1999).

El antagonismo producido por las cepas estudiadas, puede ser debido a una proteína, componentes volátiles o no volátiles y/o por enzimas líticas extracelulares, ya que este género es conocido por producir estos diferentes componentes para inhibir a los hongos filamentosos.

#### **4.8. Evaluación de los componentes antifúngicos solubles presentes en los cultivos filtrados de los hongos antagonistas sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno**

Los cultivos filtrados de las 11 cepas fúngicas seleccionadas, capaces de inhibir el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos, fueron evaluados para inhibir el crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *Colletotrichum sp* (Figura 24).

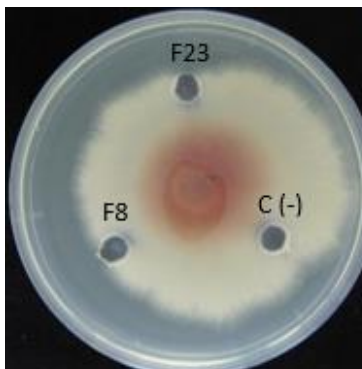
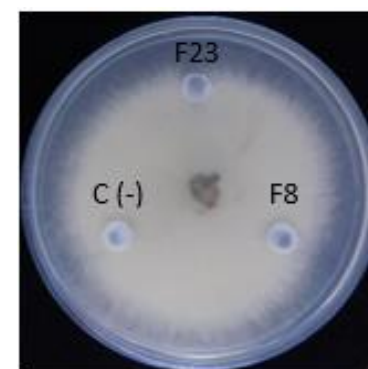
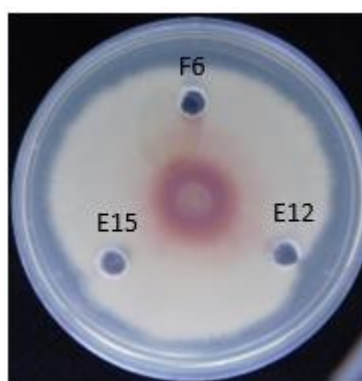
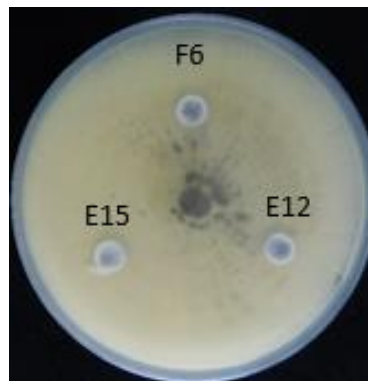
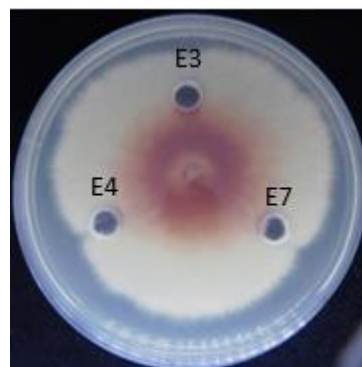
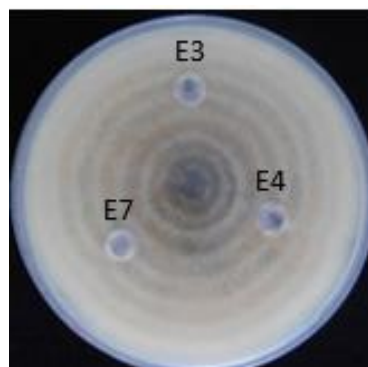
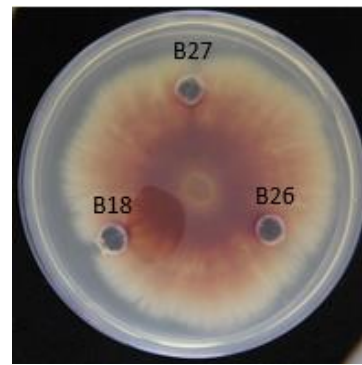
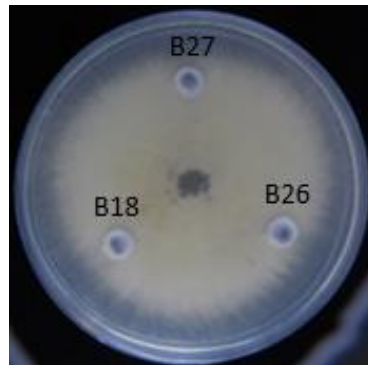
Se encontró que los filtrados de cultivo de los hongos probados en este estudio no mostraron un efecto inhibitor sobre el crecimiento del patógeno, mediante el ensayo de difusión en agar con 100 *ul* de cultivo filtrado.

---

*Colletotrichum sp.*

*F. oxysporum*

---



**Figura 24:** Ensayo de difusión en pocillos de agar de los sobrenadantes de cultivos filtrados contra los hongos fitopatógenos.



Los compuestos antifúngicos son secretados extracelularmente durante los procesos de fermentación, en algunos casos en pequeñas cantidades dependiendo de las especies, cepas y las condiciones de cultivo. En muchas de las formulaciones actuales de bioplaguicidas solo se utilizan las esporas de los hongos y estos compuestos son desperdiciados en los medios usados después de la fermentación. Sin embargo, estos podrían ser agregados a la formulación de los bioplaguicidas actuales para mejorar su efectividad y agilizar su tiempo de acción (Bautista *et al.*, 2018).

En este estudio solo se utilizó el cultivo filtrado de las cepas fúngicas crecidas en medio PDB, sin embargo, los compuestos antifúngicos se pueden extraer mediante diferentes métodos basados en la solubilidad de estos compuestos (Sierra *et al.*, 2018), para mejorar la efectividad de la actividad antagonista a partir de estos cultivos filtrados.

Por otro lado, se ha reportado que la secreción de algunos compuestos antifúngicos son estimulados de forma directa por la presencia de un microorganismo patógeno (Harman *et al.*, 2004; Druzhinina *et al.*, 2005). Ya que algunos genes antagonistas están regulados por la presencia del patógeno (Duffy *et al.*, 2003). Esto se pudo observar en los ensayos de cultivos duales de las cepas antagonistas seleccionadas.

#### **4.9. Ensayo *in vitro* evaluar la capacidad de micoparasitar a *H. vastatrix***

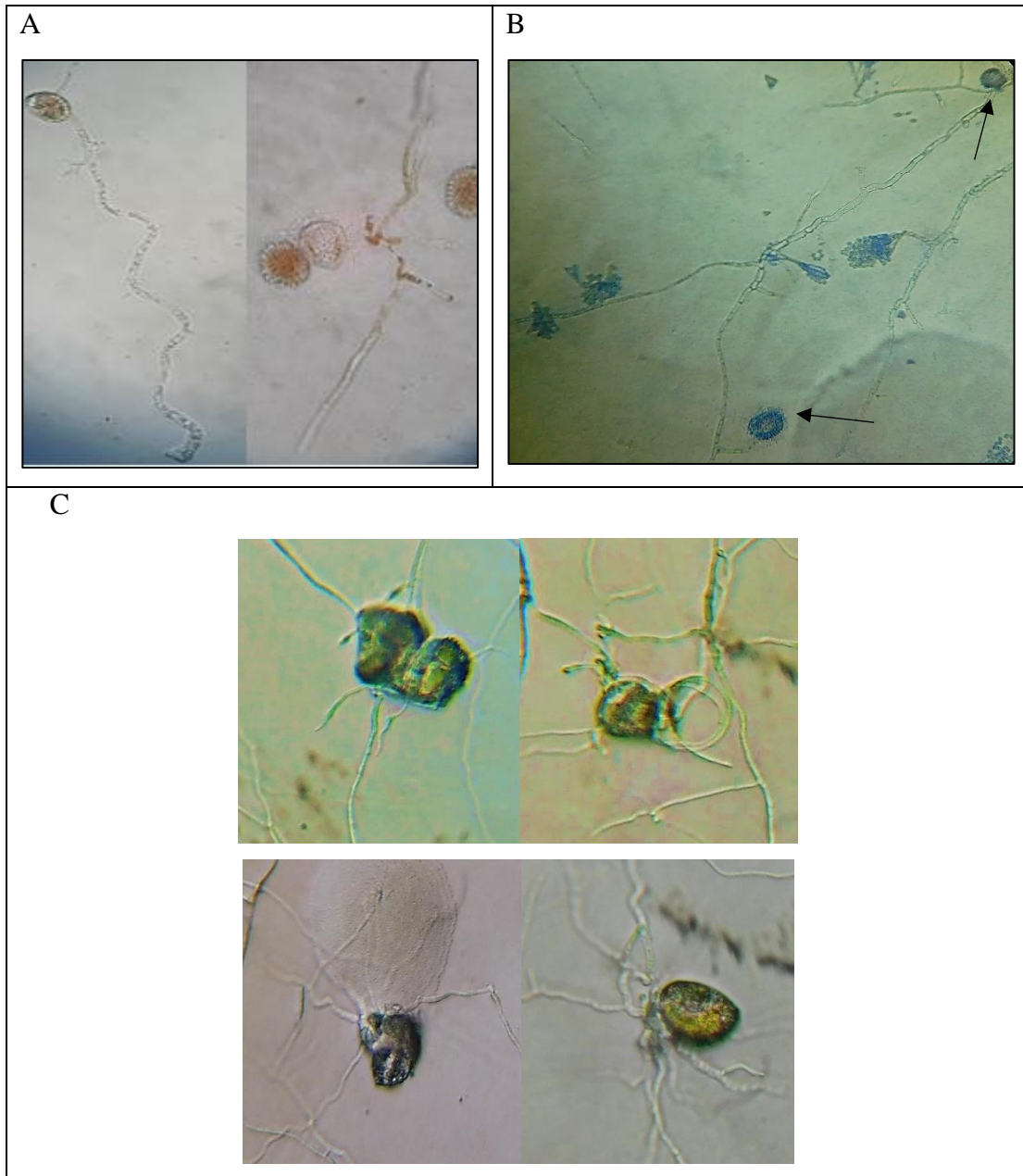
En los ensayos anteriores, de los 4 hongos seleccionados capaces de invadir la superficie del crecimiento micelial de *Collectotrichum sp.*, se encontró que solo la cepa FV1AH 005 producía enzimas líticas extracelulares e invadía la superficie de la colonia de los tres hongos fitopatógenos, la cual fue evaluada en este ensayo (Figura 25).

Se observó que la cepa FVAH005 inhibió al 100% la germinación de *H. vastatrix* en el ensayo en microcultivo. Además, a las 72 horas de incubación se observaron diferentes estructuras en las hifas, como enrollamiento y penetración de las urediniosporas, comportamiento característico de hongos micoparasitos. Asimismo, en otros estudios, los hongos micoparasitos de los hongos de la roya, como *Eudarluca caricis* o *Lecanicillium muscarium*, penetran y/o lisan las urediniosporas o su tubo germinativo (Gams *et al.*, 2004).

#### **4.10. Análisis Filogenético de los hongos antagonistas**

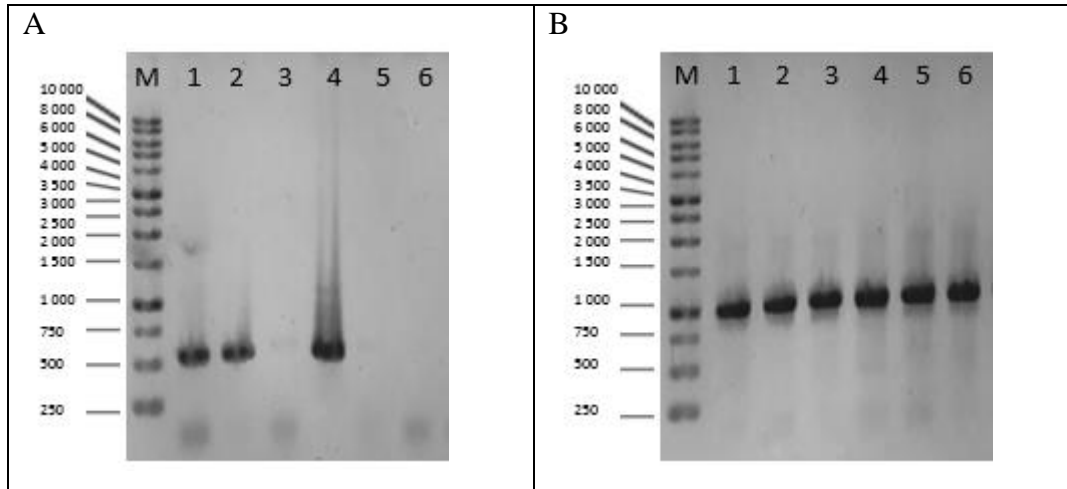
Con el objetivo de complementar la caracterización morfológica de las cepas seleccionadas, se realizó la identificación molecular de estas mediante la amplificación de las secuencias de identificación usando los cebadores ITS y el gen  $\beta$ -Tubulina. La Figura 25 muestra las

amplificaciones de la región ITS y del gen  $\beta$ -Tubulina. Luego, las secuencias fueron analizadas mediante la herramienta BLASTn (Basic Local Alignment Tool for nucleotides), determinando el porcentaje de similitud con especies cercanamente relacionadas y reportadas en la base datos de NCBI (Tabla 4).



**Figura 25:** Interacción entre *H. vastatrix* y los hongos antagonistas. A: Control a 400X. B y C: Interacción entre *H. vastatrix* (Flechas negras) y la cepa FV1AH 005 a 400X.

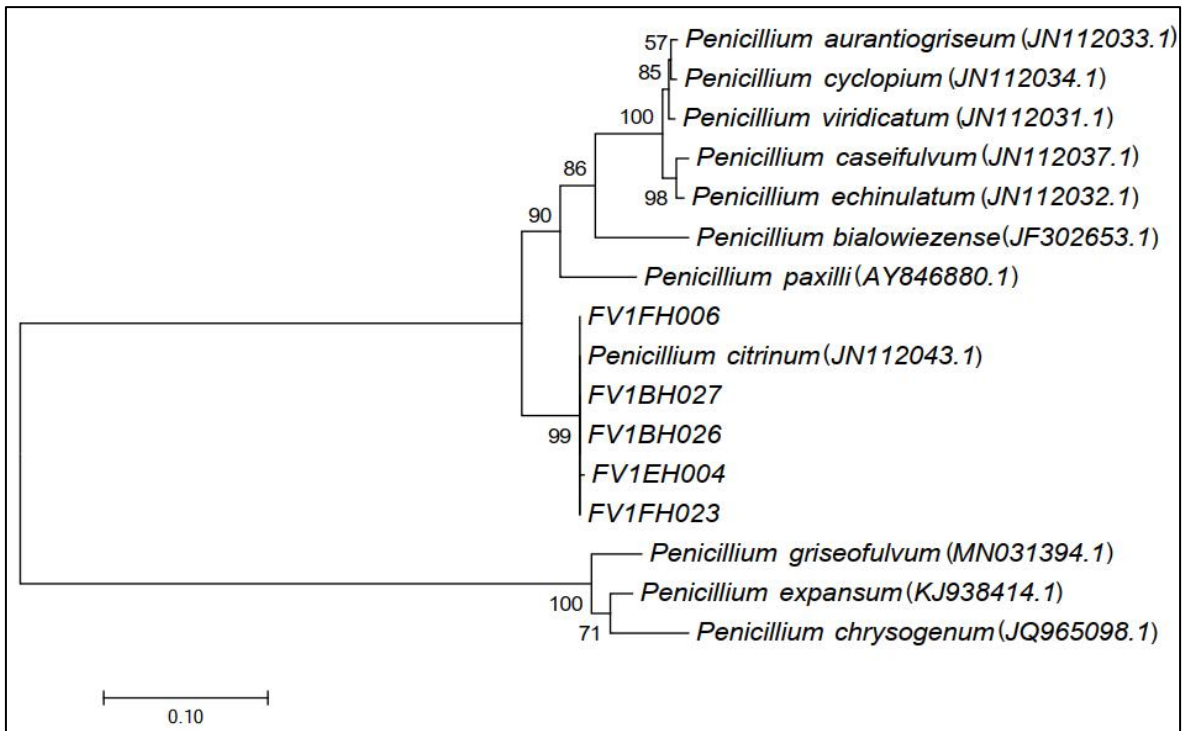
Posteriormente, se realizó el análisis de alineamiento múltiple y filogenético que permiten identificar la relación filogenética de las cepas antagonicas mediante su árbol filogenético (Figura 27 y Figura 28).



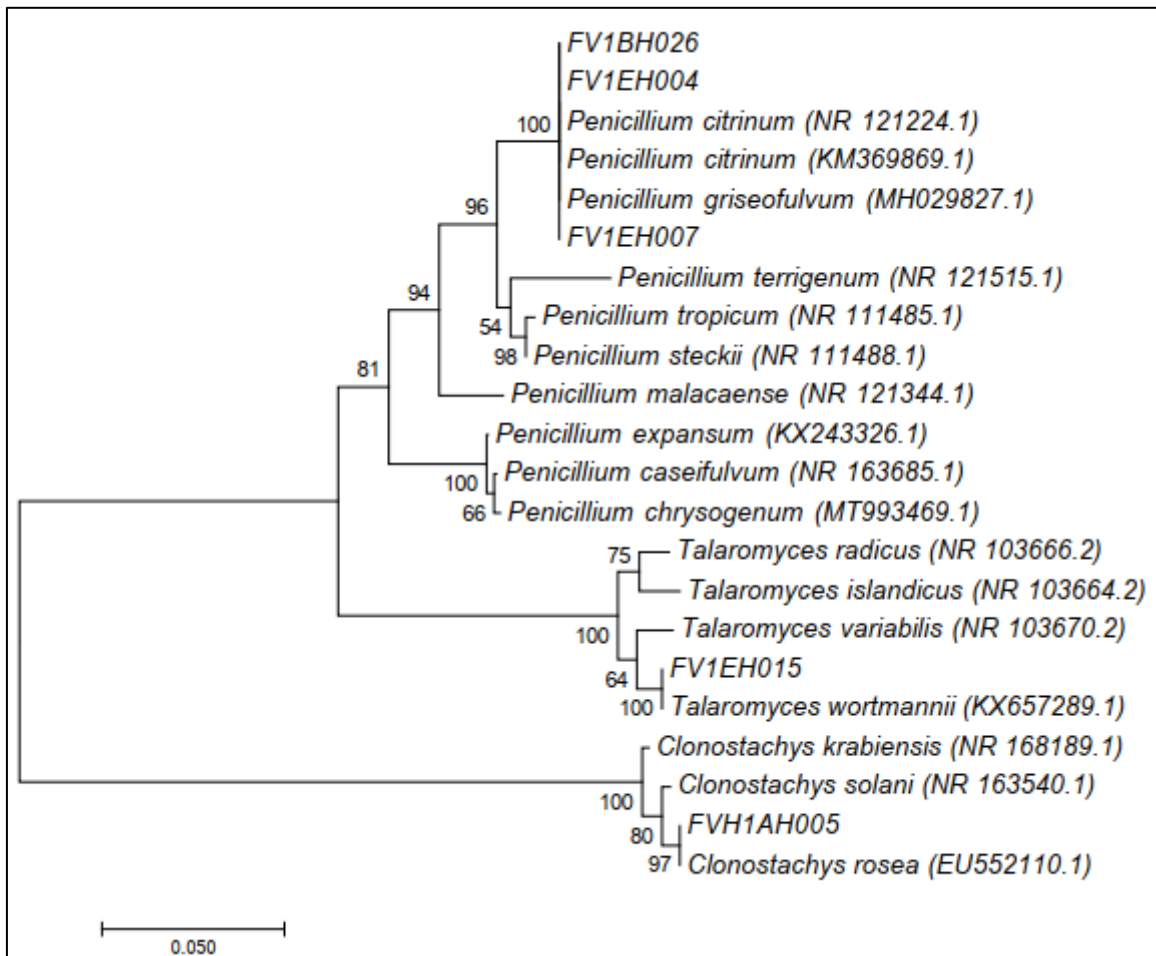
**Figura 26:** Amplificación de la región ITS y del gen Beta tubulina de los hongos antagonistas. A) Gel de electroforesis de la amplificación de la región ITS. B) Gel de electroforesis de la amplificación del gen Beta tubulina. M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder. 1: Cepa FV1EH 007, 2: Cepa FV1BH 026, 3: Cepa FV1BH 027, 4: Cepa FV1AH 005, 5: Cepa FV1FH 023, 6: Cepa FV1FH 006.

**Tabla 5:** Identificación molecular mediante el alineamiento de las secuencias del gen  $\beta$ -tubulina y de la región espaciadora del transcrito interno (ITS) de las cepas antagónicas mediante análisis BLAST

| Muestra    | Cebadores        | Tamaño de secuencia (pb) | Especie Relacionada             | Cobertura | % Identidad | Accesión    |
|------------|------------------|--------------------------|---------------------------------|-----------|-------------|-------------|
| FV1AH 005  | ITS1_f<br>ITS4_r | 539                      | <i>Clonostachys rosea</i>       | 99%       | 100%        | EU552110.1  |
| FV1BH 026  | ITS1_f<br>ITS4_r | 528                      | <i>Penicillium citrinum</i>     | 99%       | 100%        | KM369869.1  |
|            | Bt_f<br>Bt_r     | 876                      | <i>Penicillium citrinum</i>     | 96%       | 99.88%      | JN112043.1  |
| FV1BH 027  | Bt_f<br>Bt_r     | 926                      | <i>Penicillium citrinum</i>     | 94%       | 99.89%      | JN112043.1  |
| FV1EH 004  | ITS1_f<br>ITS4_r | 488                      | <i>Penicillium citrinum</i>     | 100%      | 100%        | NR_121224.1 |
|            | Bt_f<br>Bt_r     | 885                      | <i>Penicillium citrinum</i>     | 97%       | 99.77%      | JN112043.1  |
| FV1EH 007  | ITS1_f<br>ITS4_r | 534                      | <i>Penicillium griseofulvum</i> | 100%      | 99.89%      | MH029827.1  |
| FV1EH 0015 | ITS1_f<br>ITS4_r | 521                      | <i>Talaromyces wortmannii</i>   | 100%      | 99.43%      | KX657289.1  |
| FV1FH 006  | Bt_f<br>Bt_r     | 931                      | <i>Penicillium citrinum</i>     | 93%       | 99.81%      | JN112043.1  |
| FV1FH 023  | Bt_f<br>Bt_r     | 915                      | <i>Penicillium citrinum</i>     | 95%       | 99.89%      | JN112043.1  |



**Figura 27:** Árbol filogenético de las cepas FV1BH026, FV1EH004, FV1FH023, FV1FH006 Y FV1BH027 utilizando las secuencias del gen  $\beta$ -tubulina. El método de reconstrucción filogenética fue Neighbour-joining (NJ) y las distancias fueron calculadas de acuerdo al método de Kimura-2 parámetros. Los valores en los puntos de ramificación indican soporte de bootstrap (1000 pseudoreplicas)



**Figura 28:** Árbol filogenético de las cepas FV1BH026, FV1EH004, FV1EH007, FV1EH015 y FV1AH005 utilizando la secuencia de la región espaciadora del transcrito interno (ITS). El método de reconstrucción filogenética fue Neighbour-joining (NJ) y las distancias fueron calculadas de acuerdo al método de Kimura-2 parámetros. Los valores en los puntos de ramificación indican soporte de bootstrap (1000 pseudoreplicas).

En este estudio, se encontró que las cepas FV1BH 026, FV1BH027, FV1EH004, FV1FH006 y FV1FH023 están relacionadas filogenéticamente con la especie *Penicillium citrinum*. Se ha reportado, que este hongo es un hongo endófito del café y de diferentes cultivos como el maíz, arroz, soya, cebada (Posada et al., 2007) y otras. Además, se ha estudiado su potencial como agente biocontrol en diversos cultivos, como en el ají (Ganga et al., 2016) y el sisal (Lopes et al., 2019). En otros estudios, los investigadores han logrado purificar una proteína antifúngica de *P. citrinum*, PcPAF (Wen et al., 2014) y dos policétidos que tienen actividad antifúngica, citrinina y emodina (Luo et al., 2019). Se ha reportado que la Emodina tiene capacidad antifúngica contra 6 hongos patógenos de plantas (Luo et al., 2019), mostrando la mayor actividad hacia el hongo patógeno *Botrytis maydis*. Los resultados del mecanismo de emodina en el patógeno revelan que la emodina podría afectar la morfología de la colonia,

destruir la integridad de la membrana celular e influir en la síntesis de proteínas de la célula fúngica probada.

En otro estudio, se detectaron otros posibles compuestos antifúngicos de *P. citrinum*, se encontró que un alcaloide, la citrinadina A, está involucradas en la respuesta de *P. citrinum* contra otros microorganismos en co-cultivos. Además, se encontró que el tetrapéptido D -Phe- L -Val- D -Val- L -Tyr tiene actividad inhibitoria contra *Fusarium virguliforme*. (Costa *et al.*, 2019).

Además, se encontró que la cepa FV1EH007 está relacionada filogenéticamente con la especie *Penicillium griseofulvum*. *P. griseofulvum* es un hongo conocido principalmente por sus aplicaciones médicas, la griseofulvina que produce es un antibiótico ampliamente utilizado para el tratamiento clínico de las infecciones fúngicas de la piel y la cutícula (Zhang *et al.* 2017). Este hongo, ha sido aislado de la rizosfera de plantas de fresas sanas y se ha demostrado su eficacia como controlador de una patógeno de la pudrición de la raíz de la fresa (*Cylindrocarpon macrodidyma*) y varios patógenos de la papa (por ejemplo, *Fusarium solani*, *Fusarium sulphureum* y *Rhizoctonia solani*) (Shen *et al.* 2012; Chen *et al.* 2013).

Asimismo, se encontró que la cepa FV1EH015 está relacionada filogenéticamente con la especie *Talaromyces wortmannii*. *Talaromyces* es un subgénero de *Penicillium*, que produce muchos metabolitos secundarios bioactivos novedosos, incluidos alcaloides, péptidos, lactonas y compuestos de tipo estructura miscelánea. Se han aislado diferentes componentes de *T. wortmannii*, (Componentes A, B, C, D y otros) (Yang *et al.*, 2020). Se ha demostrado la actividad antibacteriana y antiinflamatoria del componente C, un compuesto de flavomanina (Pretsch *et al.*, 2014), pero faltan más estudios para determinar la actividad de los demás componentes.

Otra cepa antagónica identificada fue la cepa FV1AH 005 y se encontró que está relacionada filogenéticamente con la especie *Clonostachys rosea*. *C. rosea* o también llamada *Gliocladium roseum*, pertenece al filo Ascomycota característico por colonizar de manera endófitas raíces, tallos, hojas, frutos y semillas de plantas (Gonzales, 2018). Además, se ha reportado que *C. rosea* controla enfermedades causadas por una amplia gama de hongos fitopatógenos, en cultivos como la papa y la fresa contra *Rhizoctonia solani* (Salamone *et al.*, 2018), la uva (*Vitis vinifera*) contra *Botrytis cinerea* (Rodriguez y Chico, 2013), y en estudios *in vitro* contra *Alternaria solani* y *F. oxysporum* (Flores *et al.*, 2015), *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium graminearum* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Nygren *et al.*, 2018).

Se ha informado varios mecanismos de biocontrol en *C. rosea* como el micoparasitismo directo de hongos patógenos y nemátodos, antibiosis, producción de enzimas que degradan la pared celular de los hongos, inducción de reacciones de defensa de las plantas, y promoción del crecimiento de las plantas (Nygren *et al.*, 2018). También se ha informado que la tolerancia y la desintoxicación de los metabolitos tóxicos producidos por las presas fúngicas es un rasgo importante de control biológico en *C. rosea* (Nygren *et al.*, 2018).

A partir de la germinación de esporas, *C. rosea* produce hifas finas, de rápido crecimiento, que puede entrar en contacto con el hongo patógeno. Estas estructuras pueden actuar por actividad enzimática o por acción física. El principal método de acción observado es el enrollamiento de las hifas alrededor de las del huésped (Castillo *et al.*, 2016). Además, se ha reportado que *C. rosea* secreta dos policétidos, Clonorosein A y B que tienen fuerte actividad contra *Fusarium graminearum* y *B. cinerea* (Umma *et al.*, 2018).

## V. CONCLUSIONES

- La filósfera de plantas de café presentó una diversidad fúngica de 118 cepas diferentes, provenientes de cultivos de café de la región Villa Rica, Pasco – Perú, de las cuales 48, pertenecen a las variedades susceptibles (Bourbon, Caturra roja y Typica) y 70, pertenecen a las variedades resistentes (Catimor, Costa rica 95 y Limaní).
- Se encontró 11 cepas antagónicas que inhiben el crecimiento miceliar de al menos 2 patógenos estudiados en más del 50% y 1 cepa que invade la superficie miceliar de los 3 patógenos.
- Diez de los hongos antagónicos seleccionados secretan las tres enzimas líticas estudiadas (proteasa, lipasa y quitinasa), las cuales pueden favorecer su efecto antagonista mediante los mecanismos de micoparasitismo y competencia por nutrientes.
- La mayoría de los hongos antagónicos encontrados presentaron características morfológicas del género *Penicillium*, con excepción de la cepa FV1AH 005.
- Los componentes antifúngicos solubles presentes en los cultivos filtrados de los hongos antagónicos inhibieron la germinación de *H. vastratrix* (FV1BH 026 y FV1EH 003) y el crecimiento miceliar del tubo germinativo de *Colletotrichum sp.* y *Fusarium oxysporum* (FV1EH 015 y FV1FH 023). Sin embargo, no se pudo observar la inhibición del crecimiento miceliar de hifas maduras (ensayo de difusión en agar).
- El mecanismo de micoparasitismo fue analizado en la cepa FVAH005, la cual presentó diferentes estructuras en las hifas, como enrollamiento y penetración sobre las urediniosporas de *H. vastratrix*, además de inhibir su germinación.
- Las cepas antagónicas FV1BH 026, FV1BH027, FV1FH006 y FV1FH023 están relacionadas filogenéticamente con la especie *Penicillium citrinum* y la cepa FV1EH007, con la especie *Penicillium griseofulvum*, las cuales son reportadas por secretar compuestos antifúngicos. Además, la cepa FV1AH 005 está relacionada filogenéticamente con la especie *Clonostachys rosea*, considerada como un hongo biocontrolador, ya que posee características micoparasitarias.



## **VI. RECOMENDACIONES**

- Evaluar a nivel de plántulas in vitro a todas las cepas con capacidades antagónicas encontradas en este estudio, en especial las cepas seleccionadas, para analizar su capacidad como hongos biocontroladores contra hongos fitopatógenos.
- Realizar ensayos para determinar otras capacidades que presentan los hongos aislados, como promotores del crecimiento vegetal, producción de sideróforos, metabolitos volátiles, etc.
- Optimizar la técnica para analizar la producción de los compuestos antifúngicos con el medio Caldo Papa Dextrosa y otros medios de cultivo.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, I.; Boissy, J.; Chia, E. & Andrieu, N. (2020). Integrating diversity of smallholder coffee cropping systems in environmental analysis. *The International Journal of Life Cycle Assessment* 25, 252–266. doi: 10.1007/s11367-019-01689-5
- Adbel, S.; Kamal, M. & Adbel, I. (2015). Leaf surface and endophytic fungi associated with onion leaves and their antagonistic activity against *Alternaria porri*. *Czech Mycology* 67(1): 1–22.
- Adebola, M. & Amadi, J. (2012). Studies on *Penicillium digitatum*, *Botryodiplodia theobromae*, *Alternaria tenuis* and *Trichoderma harzianum* for Bicontrol of *Phytophthora palmivora* Cocoa Black Pod Disease Pathogen. *American-Eurasian Journal of Agronomy* 5 (2): 30-34.
- Adhikari, M.; Paterson, R. & Maslin, M.A. (2020). A Review of Potential Impacts of Climate Change on Coffee Cultivation and Mycotoxigenic Fungi. *Microorganisms*, 8(10), 1625.
- Agrawal, T. & Kotasthane, A.S. (2012). Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *SpringerPlus*, 1(1): 73. doi: 10.1186/2193-1801-1-73
- Aguilar, W.; Arce, P. & Rivera, M. (2016). Identificación y caracterización molecular del hongo causante de la pudrición blanca en *Allium cepa*, en Llano Grande de Cartago, Costa Rica. [Edición especial]. *Tecnología en Marcha. Biocontrol*, 1: 51-56. doi: 10.18845/tm.v29i7.2705

- Alvarez, G.A. (2016). Formulación y evaluación de *Cladosporium hemileiae* biocontrolador de *Hemileia vastatrix*. Informe final del Programa universitario de investigación en ciencias básicas. Ramírez, SS. Guatemala. 37 p. Universidad de San Carlos de Guatemala. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/317399898\\_Formulacion\\_y\\_evaluacion\\_de\\_Cladosporium\\_hemileiae\\_biocontrolador\\_de\\_Hemileia\\_vastatrix](https://www.researchgate.net/publication/317399898_Formulacion_y_evaluacion_de_Cladosporium_hemileiae_biocontrolador_de_Hemileia_vastatrix)
- Amorim, M.; Oliveira, F.; Yumi, O.; Rodrigues, L.; Santos, J. & Augusto, R. (2011). Distribution of the endophytic fungi community in leaves of *Bauhinia brevipes* (Fabaceae). Acta Bot. Bras., 25 (4).
- Arenas, R. (2008). Micología Médica Ilustrada. 3ed. México, México. McGraw Hill Interamericana. 447 p.
- Aragón, S.M. & Beltrán, C. (2018). Endophytic fungi in biological control of phytopathogens and insect pests. En A. Marina (Ed). Control Biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros. Volumen 2. Aplicaciones y perspectivas (pp.850 - 877). Mosquera, Colombia: Agrosavia.
- Barrera, Y.I. & Menjívar, J.E. (2004). Reproducción masiva de tres cepas de *Verticillium sp.* hiperparásito de la “roya del café” (*Hemileia vastatrix*), en fermentadores artesanales a tres concentraciones diferentes de melaza. Tesis de pregrado para optar el título de Biología. Universidad Autónoma de México.
- Barakat, F.; Abada, K. & Abou-Zeid, N. (2014). Effect of volatile and non-volatile compounds of *Trichoderma spp.* on *Botrytis fabae* the causative agent of faba bean chocolate spot. American Journal of Life Sciences 2(6-2): 11-18.
- Bautista, E.; Mesa, L. & Gomez, M. (2018). Alternativas de producción de bioplaguicidas microbianos a base de hongos: el caso de América Latina y El Caribe. Scientia Agropecuaria, 9(4): 585 – 604.

- Bell, D.; Wells, H. & Markham, C. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72: 379-382. doi: 10.1094/Phyto-72-379.
- Benhamou, N. & Chet, I. (1997). Cellular and Molecular Mechanisms Involved in the Interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Applied and Environmental Microbiology* 63(5): 2095-2099.
- Benítez, T.; Rincón, A.; Limón, C. & Codón, A. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains *International Microbiology* 7(4): 249-260.
- Campuzano, S.E.; Urquijo, L. & Valderrama, J. (2017). Evaluación de la actividad celulolítica y quitinolítica de hongos filamentosos aislados de rizósfera de cultivos de papa para control de *Rhizoctonia solani*. *NOVA* 15 (28): 45-55.
- Canet Brenes, G.; Soto Víquez, C.; Ocampo Thomason, P.; Rivera Ramírez, J. & Navarro Hurtado, A.; Guatemala Morales, GM.; Villanueva Rodríguez, S. (2016). La situación y tendencias de la producción de café en América Latina y el Caribe. San José, Costa Rica, IICA. 136 p.
- Castillo, H.; Rojas, R. & Villalta, M. (2015). *Gliocladium, sp.* agente biocontrolador con aplicaciones prometedoras. *Tecnología en marcha*, 65–73.
- Costa, J.H.; Wassano, C.I.; Angolini, C.F.F.; Scherlach, K.; Hertweck, C., & Pacheco Fill, T. (2019). Antifungal potential of secondary metabolites involved in the interaction between citrus pathogens. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. doi: 10.1038/s41598-019-55204-9
- Correa, G.; Leonor, L.; Galindo, M. & Afanador, L. (2007). Uso de métodos multivariantes para la agrupación uso de métodos multivariantes para la agrupación de aislamientos de *Colletotrichum spp.* con base en características morfológicas y culturales en características morfológicas y culturales. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 60(1):3671-3690.

- Cota, L.; Maffia, L.; Mizubuti, E. & Macedo, P. (2009). Biological control by *Clonostachys rosea* as a key component in the integrated management of strawberry gray mold. *Biological Control*, 50: 222-230.
- Díaz, C. & Willems, M.C. (2017). Línea de base del sector café en el Perú. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo – PNUD. Lima, Perú. 58 p.
- Dimerci, E.; Dane, E. & Eken, C. (2010). In vitro antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia on potato tubers against *Rhizoctonia solani*. *Turkey Journal Biology* 35: 457-462.
- Elliot, M. (2010). Marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum*. *Palmas*. 31(1): 366-375.
- Fatema, U.; Broberg, A.; Jensen, D.F.; Karlsson, M. & Dubey, M. (2018). Functional analysis of polyketide synthase genes in the biocontrol fungus *Clonostachys rosea*. *Sci Rep*, 8(1):15009.
- Fernandez, R. & Suárez, L. (2009). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* rifai sobre *Fusarium oxysporum* schlecht f. Sp passiflorae en maracuyá (*Passiflora edulis* sims var. Flavicarpa) del municipio zona bananera colombiana. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 62(1): 4743-4748.
- Fiss, M.; Kucheryava, N.; Schönherr, J.; Kollar, A.; Arnold, G. & Auling, G. (2000). Isolation and characterization of epiphytic fungi from the phyllosphere of apple as potential biocontrol agents against apple scab (*Venturis inaequalis*). *Journal of Plant Diseases and Protection* 107(1):1-11.
- Flores, W.; Chico, J.; & Cerna, L. (2015). Artículo Original Actividad antagónica *in vitro* de *Clonostachys rosea* sobre *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* Antagonistic. *Rebiol*, 35(1), 34–42.
- Ganga, P. & Audipudi, A. (2016). *Penicillium citrinum* AVGE1 an Endophyte of *Acorus calamus* its role in Bio control and PGP in Chilli Seedlings. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(5): 657-667.

- García, D.A. (2013). Incidencia y severidad de la roya del café (*Hemileia vastatrix*) y evaluación de alternativas químicas para su control. Tesis Lic. Escuintla, Guatemala. Universidad Rafael Landívar. 61 p.
- García Espejo, C.N.; Mamani Mamani, M.M.; Chávez Lizárraga, G.A. & Álvarez Aliaga, M.T. (2016). Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible biocontrolador. *Journal of the Selva Andina Research Society* 7(1): 20-32.
- Gil, L. & Leguizamón, J. (2000). La muerte descendiente del cafeto (*Phoma* spp.). Colombia: Cenicafe, Avances técnicos 278. Recuperado de <https://www.cenicafe.org/es/publications/avt0278.pdf>
- Gomes, T.; Pereira, J.A.; Benhadi, J.; Lino, T. & Baptista P. (2018). Endophytic and Epiphytic Phyllosphere Fungal Communities Are Shaped by Different Environmental Factors in a Mediterranean Ecosystem. *Microbial Ecology*, 76: 668–679.
- Gonzales, B.J. (2018). Evaluación de técnicas de infección en plántulas de *Allium cepa* L. (Blanca barletta) por *Fusarium oxysporum* y de la interacción in vitro entre *Clonostachys rosea*, *Trichoderma harzianum* y *Fusarium oxysporum*. Tesis para obtener el título de maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, México.
- Gonzales, D.; Sánchez, C.; Fernández, K. & Céspedes, J. (2017). Estudio de Mercado del Café Peruano. Lima, Perú. Cooperación Suiza – SECO. 41p.
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Harman, G. (2005). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp., *Phytopatology* 96(1):190-194.

- Hyde, K.D.; Xu, J. & Rapior, S. (2019). The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity* 97, 1–136. doi: 10.1007/s13225-019-00430-9
- Hernández, G. & Velázquez, T. (2016). Análisis integral sobre la roya del café y su control. *Revista Internacional de Desarrollo Regional Sustentable*, 1 (1): 92-99. Recuperado de <http://rinderesu.com/index.php/rinderesu/article/view/9>
- Hoffman, P. (1987). Cryopreservation of fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 7:92–94.
- Holst, K.; Rivera, G.; Villalobos, K.; Orozco, R. & Orozco, S. (2017). Pruebas in vitro de hongos antagonistas para combatir la roya de mora en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 41(1): 19-32. doi: 10.15517/RAC.V41I1.29746
- ICO (Junio, 2018). International coffee organization. Statistical production data. Recuperado en <http://ico.org/prices/po-production.pdf>.
- Infante, D.; Martínez, B.; González, N. & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*
- Ionita, A.; Moscovici, M.; Popa, C.; Vamanu, A.; Popa, O. & Dinu, L. (1997). Screening of yeast and fungal strains for lipolytic potencial and determination of some biochemical properties of microbial lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 3: 147-151. doi: 10.1016/S1381-1177(96)00044-6
- Junta Nacional del Café (2020). El café de Perú. *Fórumcafé*, 82:6-10.
- Kaiserer, L.; Oberparleiter, C.; Wolfgang, W.; Leiter, E. & Marx, F. (2003). Characterization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. *Archives of Microbiology* 180(3): 204-210.
- Kharwar, N.; Gond, K.; Kumar, A. & Mishra, A. (2010). A comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citriodora* Hook, and their antimicrobial activity. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 26:1941–1948.

- Kedar, S.; Arun Vashistht, M.; Prashanth, A.; Parveen, N.; Chakraborty, S. & Sindhu, S. (2018). Isolation, partial purification, biochemical characterization and detergent compatibility of alkaline protease produced by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* obtained from sea wáter samples. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 16 (2018): 39–46.
- Khokhar, I.; Mukhtar, I.; & Mushtaq, S. (2011). Antifungal effect of *Penicillium* metabolites against some fungi. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44(14), 1347–1351. doi: 10.1080/03235408.2010.496584
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2): 111-120. Recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01731581>
- Kitamoto, Y.; Suzuki, A. & Shimada, S. (2002). A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. 43:143–149.
- Kumar, D.; Kumar, L.; Nagar, S.; Raina, C.; Parshad, R. & Kumar, V. (2012). Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus sp.* strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. *Archives of Applied Science Research* 4 (4):1763-1770.
- Kumar, S.; Stecher, G. & Tamura, K. (2016). Mega 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7): 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
- Li, Y.; Guo, Q.; Wei, X.; Xue, Q.; & Lai, H. (2019). Biocontrol effects of *Penicillium griseofulvum* against monkshood (*Aconitum carmichaelii* Debx.) root diseases caused by *Sclerotium rolfsii* and *Fusarium spp.* *Journal of Applied Microbiology*, 127(5), 1532–1545. doi: 10.1111/jam.14382



- Lopes, D.; Oliveira, J.; Mota, R. & Oliveira, C. (2019). *Penicillium citrinum* as a Potential Biocontrol Agent for Sisal Bole Rot Disease. *Journal of Agricultural Science*, 11(10): 207-216.
- Luo, H.; Qing, Z. & Deng, Y. (2019). Two Polyketides Produced by Endophytic *Penicillium citrinum* DBR-9. From Medicinal Plant *Stephania kwangsiensis* and Their Antifungal Activity against Plant Pathogenic Fungi. *Natural Product Communications*, 1:1-6.
- Magaldi, S.; Mata-Essayaga, S.; Hartung de Capriles, C.; Perez, C.; Colella, T., Olaizola S. & Ontiveros, J. (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases*, 8(1):39-45.
- Mardani, A. & Hadiwiyono. (2012). Antagonism of rice phylloplane fungi against *Cercospora oryzae*. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 142.
- Marqués, E.; Martins, I. & Marques, C.S. (2018). Antifungal potential of crude extracts of *Trichoderma* spp. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnología, Controle Biológico, Biotaneotropica, Brasília, Brazil. ISSN 1676-0611.
- Michel, A.C.; Otero, M.A.; Rebolledo, O.; Lezama, R. & Ochoa, M.E. (2005). Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp, en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum in vitro*. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11(2): 273-278.
- Mohamed, A. (2001). Antagonistic interactions between fungal pathogen and leaf Surface fungi of onion (*Allium cepa* L.). *Pakistan Journal of biological Sciences* 4(7): 838-842.
- Mejdoub, B.; Abdallah, A.; Nawaim, A. & Mejda, D. (2017). Antifungal Potential of Extracellular Metabolites from *Penicillium* spp. and *Aspergillus* spp. Naturally Associated to Potato against *Fusarium* species causing Tuber Dry Rot. *Journal of Microbial and Biochemical Technology* 9(4): 181-190.

- Ministerio de Agricultura y Riego (2018). Plan Nacional de acción del Café Peruano: 2018-2030. Lima, Perú: MINAGRI. Recuperado de [https://www.undp.org/content/dam/peru/docs/Publicaciones%20medio%20ambiente/PNA-Cafe%20\(pliegos\)%2018Oct2018%20\(1\).pdf](https://www.undp.org/content/dam/peru/docs/Publicaciones%20medio%20ambiente/PNA-Cafe%20(pliegos)%2018Oct2018%20(1).pdf)
- Mora, J. (2001). Control biológico de la pudrición radicular por *Fusarium oxysporum* en semilleros de café usando endomicorriza y *Trichoderma harzianum*. Tesis para optar título de ingeniero agrónomo.
- Moricca, S.; Ragazzi, A.; Mitchelson, K. & Assante, G. (2001). Antagonism of the two-needle pine stem rust fungi *Cronartium flaccidum* and *Peridermium pini* by *Cladosporium tenuissimum* in vitro and in planta. *Phytopathology* 91:457-468. doi: 10.1094/PHYTO.2001.91.5.457
- Murthy, N. & Bleakley, B. (2012). Simplified Method of Preparing Colloidal Chitin Used For Screening of Chitinase- Producing Microorganisms. *The Internet Journal of Microbiology* 10(2). Recuperado de <https://print.ispub.com/api/0/ispub-article/14186>
- Nicoletti, R.; De Stefano, M. & De Stefano, S. 2004. Antagonism against *Rhizoctonia solani* and fungitoxic metabolite production by some *Penicillium* isolates. *Mycopathologia* 158:465-474.
- Nicoletti, R. & De Stefano, M. (2012). *Penicillium restrictum* as an Antagonist of Plant Pathogenic Fungi. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology* 6(2): 61-69.
- Nygren, K.; Dubey, M.; Zapparata, A.; Iqbal, M.; Tzelepis, G.D.; Durling, M.B. & Karlsson, M. (2018). The mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea* responds with both common and specific gene expression during interspecific interactions with fungal prey. *Evolutionary Applications*, 11(6), 931–949. doi: 10.1111/eva.12609

- Oita, S.; Ibáñez, A.; Lutzoni, F. & Arnold, E. (2021) Climate and seasonality drive the richness and composition of tropical fungal endophytes at a landscape scale. *Commun Biol*, 4, 313.
- Ogoshi, C.; Moretti, F.; Santos, H.; Marques, B.; Sobral, M. & Vilela, M. (2015). Viability and susceptibility of propagation material from coffee plants to *Colletotrichum sp.* *Semina: Ciências Agrárias*. 36(6): 3539-3551.
- Panhuysen, S. & Pierrot, J. (2018). Coffee Barometer 2018. Recuperado de <https://www.hivos.org/assets/2018/06/Coffee-Barometer-2018.pdf>
- Parmar, H.; Bodar, N.; Lakhani, H.; Patel, S.; Unrania, V. & Hassan, M. (2015). Production of lityc enzymes by *Trichoderma* strains during in vitro antagonism with *Sclerotium rolfsii*, the causal agente of stem rot of groundnut. *African Journal of Microbiology Research* 9(6): 365-372.
- Posada, F.; Aime, M.; Peterson, S.; Rehner, S. & Vega, F. (2007). Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Micological Research*, 3: 748- 757.
- Pretsch, A.; Nagl, M.; Schwendinger, K.; Kreiseder, B. & Wiederstein, M. (2014) Antimicrobial and anti-inflammatory activities of endophytic fungi *Talaromyces wortmannii* extracts against acne-inducing bacteria. *PLoS ONE* 9(6): e97929.
- Raut, I.; Badea, M.; Calin, M.; Oancea, F.; Vasilescu, G.; Sesan, T. & Gecu, L. (2014). Effect of Volatile and Non-Volatile Metabolites from *Trichoderma spp.* against Important Phytopathogens. *Revista de Chimie –Bucharest* 65(11): 1285-1288.
- Rodríguez, J. & Ruíz, M.R. (2013). Efecto antagónico in vitro de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* procedente de cultivos de *Vitis vinífera*. *Rebiol*, 33(2), 42–49.
- Romero, C.A. (2020). Observatorio de commodities: Café. Lima, Perú: MINAGRI.
- Rudy, N.; Smeltekop, H.; Almanza, J.C. & Loza, M. (2011). Evaluación de la capacidad biocontroladora de cepas nativas de *Trichoderma spp* sobre

- Rhizoctonia* sp y *Fusarium* sp en café (*Coffea arabica*) en condiciones experimentales. Journal of the Selva Andina Research Society 2(1):43-52.
- Salamone, A.; Gundersen, B. & Ann, D. (2018). *Clonostachys rosea*, a potential biological control agent for *Rhizoctonia solani* AG-3 causing black scurf on potato. Biocontrol science and technology. Short Communication.
- Salvatore, De S.; Nicoletti, R.; Milonea, A. & Salvatore, Z. (1999). 3-o-Methylfunicone, a fungitoxic metabolite produced by the fungus *Penicillium pinophilum*. Phytochemistry 52(8): 1399-1401.
- Serrano Carreón, L. & Galindo Fentanes, E. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos. Ciencia 77-88.
- Sierra, M.; Barros, R.; Gómez, D.; Mejía, A. & Suarez, D. (2018). Productos naturales: metabolitos secundarios y aceites esenciales. Uniagraria. Bogotá, Colombia. p. 56.
- Solano, H. (2016). Alerta por aumento de presencia de roya del Café. CRHoy. Recuperado de <https://www.crhoy.com/nacionales/alerta-por-aumento-de-presencia-de-roya-del-cafe>.
- Soriano, J.M. (2007). Micotoxinas en Alimentos. España. Ediciones Diaz de Santos. p. 32-34.
- Sotomayor, I. & Duicela-Guambi, L. (1995). Control Integrado de las principales Enfermedades Foliares del Cafeto en el Ecuador. Ecuador: Programa nacional de cacao y café. Quevedo. Recuperado de <http://repositorio.iniap.gob.ec/jspui/handle/41000/1617?mode=ful>
- Stephen, J.; Bakkeren, G.; Klosterman, S.; García, M. & Gold, S. (2005). Genetics and Morphogenesis in Basidiomycetes. Applied Mycology and Biotechnology. 5:353-422.
- Sreevidya, M. & Gopalakrishnan, S. (2016). *Penicillium citrinum* VFI-51 as biocontrol agent to control charcoal rot of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). African Journal of Microbiology Research, 10(19), 669-674.

- Suresh, N. & Nelson, R. (2016). Isolation of antagonistic fungi and evaluation of antifungal activity of the separated metabolite against the red rot of sugarcane pathogen. *European Journal of Experimental Biology*, 6(1): 15-21.
- Quispe Apaza, C.S.; Mansilla Samaniego, R.C.; López Bonilla, C.F.; Espejo Joya, R.; Villanueva Caceda, J. & Monzón, C. (2017). Diversidad genética de *Hemileia vastatrix* de dos zonas productoras de café en el Perú. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 418-436.
- Talhinhas, D.; Batista, D.; Diniz, I.; Vieira, A.; Silva, D.; Loureiro, A. & Silva, M. (2017). The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology*, 18(8): 1039-1051. doi: 10.1111/mpp.12512
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22): 4673-4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673
- Trujillo, L.C. & Echeverry-Hernández, S. (2015). Aislamiento y caracterización de levaduras presentes en el fruto del *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L.M Perry (pomorroso) en la comuna 1 de la ciudad de Neiva- Huila. *Revista Ingeniería y Región*, 13(1):37-45. doi: 10.25054/22161325.707
- Vanegas-Berrouet, K.; Gutiérrez-Sánchez, P. & Marín-Montoya, M. (2014). Identificación molecular de hongos aislados de tejidos de fríjol con síntomas de antracnosis. *Acta biológica Colombiana*, 19(2):143-154. doi: 10.15446/abc.v19n2.39154
- Venedikian, N.; Bonaventura, S.M. & Godeas A.M. (2001). Estudio de las comunidades fúngicas de la filósfera de *Pinus taeda* L. (Pinaceae) i. Variación estacional. *Gayana Botánica*. 58(2):11-21.
- Vethavalli, S. & Sudha, S.S. (2012). In vitro and in silico studies on biocontrol agent of bacterial strains against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Research in Biotechnology* 3. 22-31. Recuperado de

<https://updatepublishing.com/journal/index.php/rib/article/view/2395/2373>

- Virginio, E. & Astorga, C. (2015). Prevención y control de la roya del café: Manual de buenas prácticas para técnicos y facilitadores. (1° ed). Turrialba: CATIE. Recuperado de <https://worldcoffeeresearch.org/work/prevencion-y-control-de-la-roya-del-cafe-prevention-and-control-coffee-leaf-rust/>
- White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S. & Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J.; editors. PCR Protocols: A guide to methods and applications. New York: Academic Press.
- Wen, C.; Guo, W. & Chen, X. (2014). Purification and Identification of a Novel Antifungal Protein Secreted by *Penicillium citrinum* from the Southwest Indian Ocean. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(10): 1337–1345.
- Yao, H.; Sun, X.; He, C.; Maitra, P.; Li, X & Guo, L.D. (2019). Phyllosphere epiphytic and endophytic fungal community and network structures differ in a tropical mangrove ecosystem. *Microbiome*, 7(59).
- Yang, B.; Yang, Z.; Xiao-Fei, L. & Zong-Mei, S. (2020). Secondary metabolites of the endophytic fungi *Talaromyces wortmannii* cultivated in maize medium and their bioactivity. *Chemistry of Natural Compounds*, 56(6): 1143-1145.
- Zaferanloo, B.; Quang, T.; Daumoo, S.; Ghorbani, M.; Mahon, P. & Palombo, E. (2014). Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata*, isolated from an Australian native plant. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. doi: 10.1007/s11274-014-1598-z
- Zewdie, A.; Biruk, G.; & Sileshi, K. (2021) Temporal dynamics and biocontrol potential of a hyperparasite on coffee leaf rust across a landscape in Arabica coffee's native range, *Agriculture, Ecosystems & Environment* (311)

Zhang, L.; Fang, L.; Gang, C.; Jiao, B. Yue-Hu, P. (2017). Two new compounds from a marine-derived *Penicillium griseofulvum* T21-03. *Journal Asian Natural Product Research*, 19(7):678-683.

## **VIII. ANEXOS**



**Anexo 1: TABLAS DE RESULTADOS**

**Tabla 6:** Caracterización macroscópica de los hongos de la filósfera del café de la variedad Bourbon

| Cepa      | Morfología general (Forma, Elevación, Margen, Superficie, Tamaño)   | Pigmentación en anverso                     | Pigmentación en reverso              | Difusión del pigmento | Textura       | Velocidad de crecimiento |
|-----------|---|---|--------------------------------------|-----------------------|---------------|--------------------------|
| FV1AH 001 | Circular, convexa, entero, lisa, crecimiento limitado.              | Melón                                       | Crema                                | -                     | Cremosa       | Lento                    |
| FV1AH 002 | Circular, convexa, lobulada, lisa, crecimiento limitado.            | Blanco                                      | Crema                                | -                     | Cremosa       | Lento                    |
| FV1AH 003 | Irregular, plana, desflecada, crateriforme, crecimiento limitado    | Blanco con zonas negras en el centro        | Blanco con zonas negras en el centro | -                     | Aterciopelada | Moderado                 |
| FV1AH 004 | Circular, limitada, entero, plegada, crecimiento limitado.          | Melón                                       | Melón con estrías                    | -                     | Aterciopelada | Lento                    |
| FV1AH 005 | Circular, elevada, rizoide, -, crecimiento invasivo.                | Melón con blanco                            | Crema                                | -                     | Algodonosa    | Rápido                   |
| FV1AH 006 | Circular, limitada, entero, -, crecimiento limitado.                | Marrón claro                                | Marrón oscuro                        | -                     | Aterciopelada | Moderado                 |
| FV1AH 007 | Circular, extendida, lobulado, -, crecimiento limitado.             | Plomo oscuro                                | Plomo oscuro                         | -                     | Aterciopelada | Moderado                 |
| FV1AH 008 | Circular, extendida, lobulado, desflecado, -, crecimiento limitado. | Marrón verdoso oscuro                       | Plomo oscuro                         | -                     | Aterciopelada | Moderado                 |
| FV1AH 009 | Circular, elevada, desflecada, plegada, crecimiento invasivo.       | Verde oliva y marrón dorado en la periferia | Negro con estrías                    | -                     | Aterciopelada | Rápido                   |
| FV1AH 010 | Circular, plana, desflecada, surcos radiales, crecimiento limitado  | Blanco crema                                | Crema                                | -                     | Pulverulenta  | Rápido                   |

**Tabla 7:** Caracterización macroscópica de los hongos de la filósfera del café de la variedad Caturra roja

| Cepa      | Morfología general (Forma, Elevación, Margen, Superficie, Tamaño)        | Pigmentación en anverso                      | Pigmentación en reverso               | Difusión del pigmento | Textura       | Tiempo del crecimiento |
|-----------|--|--|---------------------------------------|-----------------------|---------------|------------------------|
| FV1BH 001 | Circular, elevada, entero, surcos radiales, crecimiento limitado.        | Marrón dorado y oscuro                       | Marrón dorado y oscuro                | -                     | Aterciopelado | Lento                  |
| FV1BH 002 | Circular, limitada, rizoide, plegado, crecimiento limitado.              | Verde oscuro, con filamentos delgados cremas | Crema con filamentos verdes y estrías | -                     | Pulverulenta  | Moderado               |
| FV1BH 003 | Circular, elevada, lobulado, plegado en el margen, crecimiento limitado. | Crema verdoso                                | Crema                                 | -                     | Aterciopelada | Lento                  |
| FV1BH 004 | Circular, limitado, lobulado, -, crecimiento limitado.                   | Crema brillante                              | Crema                                 | -                     | Cremosa       | Lento                  |
| FV1BH 005 | Circular, limitada, rizoide, -, crecimiento limitado.                    | Blanco con manchas negras                    | Blanco y manchas marrones negras      | -                     | Algodonosa    | Rápido                 |
| FV1BH 006 | Circular, plana, desflecada, surcos radiados, crecimiento limitado.      | Crema  | Crema                                 | -                     | Pulverulenta  | Rápido                 |
| FV1BH 007 | Circular, limitada, lobulado, plegada, crecimiento limitado.             | Blanco opaco                                 | Crema                                 | -                     | Cremosa       | Moderado               |
| FV1BH 008 | Circular, plana, convexa, entero, rugosa, crecimiento limitado.          | Crema  | Crema                                 | -                     | Cremosa       | Moderado               |
| FV1BH 009 | Circular, plana, rizoide, surco radiado, crecimiento invasivo.           | Crema y surco ámbar                          | Crema y surco ámbar                   | -                     | Algodonosa    | Rápido                 |
| FV1BH 010 | Circular, limitado, rizoide, -, crecimiento limitado.                    | Oliva oscuro                                 | Crema y margen verde                  | -                     | Pulverulenta  | Lento                  |
| FV1BH 011 | Circular, limitado, rizoide, -, crecimiento limitado.                    | Verde oscuro                                 | Crema y margen verde                  | -                     | Pulverulenta  | Lento                  |
| FV1BH 012 | Circular, plana, desflecada, -, crecimiento limitado.                    | Verde oliva oscuro                           | Negro                                 | -                     | Pulverulenta  | Moderada               |
| FV1BH 013 | Circular, limitada, lobulado, -, crecimiento limitado.                   | Verde menta oscuro                           | Crema                                 | -                     | Pulverulenta  | Moderada               |
| FV1BH 014 | Circular, plana, rizoide, -, crecimiento invasivo.                       | Crema y margen naranja                       | Crema y margen naranja                | -                     | Algodonosa    | Rápido                 |
| FV1BH 015 | Circular, limitada, desflecada, surcos radiados, crecimiento limitado.   | Verde  | Crema con filamentos rojo lacre       | Rojo                  | Pulverulenta  | Moderada               |
| FV1BH 016 | Irregular, elevada, rizoide, cerebriforme, crecimiento limitado.         | Marrón oscuro                                | Negro                                 | -                     | Pulverulenta  | Lento                  |

Continuación ...

|           |  |                              |                                   |          |                     |          |
|-----------|--|------------------------------|-----------------------------------|----------|---------------------|----------|
| FV1BH 017 | Circular, plana, lobulado, - , crecimiento limitado.   | Crema                        | Crema                             | -        | Cremosa             | Moderada |
| FV1BH 018 | Circular, plana, rizoide, plegada, crecimiento limitado.   | Verde oscuro                 | Crema y fillos verdes con estrías | Amarillo | Pulverulenta        | Lento    |
| FV1BH 019 | Circular, limitada, entero, lisa, crecimiento limitado.  | Crema                        | Crema                             | -        | Cremosa             | Lento    |
| FV1BH 020 | Irregular, limitada, lobulado, lisa, crecimiento limitado.   | Crema                        | Crema                             | -        | Cremosa             | Lento    |
| FV1BH 021 | Circular, limitada, desflecada, surco radiado, crecimiento limitado.                                 | Verde oscuro                 | Crema con estrías                 | -        | Pulverulenta        | Lento    |
| FV1BH 022 | Circular, plana, desflecada, surcos radiales, crecimiento limitado.                                  | Crema                        | Crema                             | -        | Pulverulenta        | Rápido   |
| FV1BH 023 | Circular, limitado, entero, con surcos, limitado, entero, con surcos radiados, crecimiento limitado. | Rojo naranja                 | Rojo naranja                      | -        | Cremosa<br>brillosa | Lento    |
| FV1BH 024 | Circular, elevado, lobulado, plegado, con surco radiado, crecimiento limitado.                       | Verde pistachio              | Crema con estrías                 | -        | Pulverulenta        | Lento    |
| FV1BH 025 | Circular, lobulado, - , crecimiento limitado.  | Verde oscuro                 | Crema y ámbar en los fillos       | -        | Pulverulenta        | Lento    |
| FV1BH 026 | Circular, limitado, rizoide, lobulada, crecimiento limitado.   | Verde Esmeralda              | Crema                             | -        | Pulverulenta        | Lento    |
| FV1BH 027 | Circular, plana, desflecado, 1 surco radiado, crecimiento limitado.                                  | Verde oscuro pistachio       | Amarillo                          | -        | Pulverulenta        | Moderada |
| FV1BH 028 | Circular, plana, rizoide, - , crecimiento invasivo.  | Crema y naranja en el centro | Crema y marrón en el centro       | -        | Algodonosa          | Rápido   |
| FV1BH 029 | Circular, plana, entera, rugosa, crecimiento limitado.   | Crema                        | Crema                             | -        | Cremosa             | Moderado |

**Tabla 8:** Caracterización macroscópica de los hongos de la filósfera del café de la variedad Typica

| Cepa      | Morfología General (Forma, Elevación, Margen, Superficie y Tamaño)        | Pigmentación en anverso         | Pigmentación en reverso    | Difusión del pigmento | Textura       | Velocidad de Crecimiento |
|-----------|---|---------------------------------|----------------------------|-----------------------|---------------|--------------------------|
| FV1CH 001 | Circular, plana, entero, con surcos radiados y crecimiento limitado.      | Naranja oscuro y naranja claro. | Naranja                    | Naranja claro         | Aterciopelada | Lento                    |
| FV1CH 002 | Circular, plana, entero, con surcos radiados y crecimiento limitado.      | Naranja                         | Naranja                    | Naranja               | Aterciopelada | Lento                    |
| FV1CH 003 | Circular, limitada, lobulado, - , y crecimiento limitado.                 | Verde oscuro y margen blanco    | Crema claro                | -                     | Pulverulenta  | Lento                    |
| FV1CH 005 | Circular, convexa, entero, lisa y de crecimiento limitado.                | Salmón                          | Melón                      | -                     | Cremosa       | Lento                    |
| FV1CH 006 | Circular, extendida, rizoide, - , crecimiento limitado.                   | Crema                           | Crema                      | -                     | Aterciopelada | Moderado                 |
| FV1CH 007 | Circular, plana, rizoide, con surcos, radiados y crecimiento limitado.    | Marrón crema                    | Crema y negro en el centro | -                     | Aterciopelada | Moderado                 |
| FV1CH 009 | Circular, limitada, rizoide, - , crecimiento invasivo.                    | Crema                           | Crema                      | -                     | Algodonosa    | Rápido                   |
| FV1CH 010 | Circular, plana, desflechado, con surcos, radiados, crecimiento limitado. | Crema                           | Crema                      | -                     | Pulverulenta  | Rápido                   |

**Tabla 9:** Caracterización macroscópica de los hongos de la filósfera del café de la variedad Catimor

| Cepa      | Morfología General (Forma, Elevación, Margen, Superficie y Tamaño)                 | Pigmentación en anverso              | Pigmentación en reverso             | Difusión del pigmento | Textura       | Velocidad de Crecimiento |
|-----------|--|--------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|---------------|--------------------------|
| FV1DH 001 | Circular, extendida, rizoide, plegada y de crecimiento limitado.                   | Crema con centro negro               | Crema                               | -                     | Aterciopelada | Lento                    |
| FV1DH 002 | Circular, elevada, desflecado, plegada con surcos radiados y crecimiento limitado. | Crema con anillo negro en periferia. | Crema con anillo negro en el medio. | -                     | Vellosa       | Lento                    |
| FV1DH 003 | Circular, plana, desflecada, con un surco radiado y crecimiento limitado.          | Crema                                | Crema                               | -                     | Aterciopelada | Rápido                   |
| FV1DH 004 | Circular, elevada, rizoide, con surcos radiados y crecimiento limitado.            | Marrón                               | Negro                               | -                     | Aterciopelada | Rápido                   |
| FV1DH 005 | Circular, limitada, desflecado lobulado, - y crecimiento limitado.                 | Plomo con filos blancos              | Plomo oscuro y crema alrededor.     | -                     | Aterciopelada | Moderado                 |
| FV1DH 006 | Circular, limitada, rizoide, - y crecimiento invasivo.                             | Blanco                               | Crema con filos y crema alrededor.  | -                     | Algodonosa    | Rápido                   |
| FV1DH 007 | Circular, plana, entero, plegada, con surcos radiados y crecimiento invasivo.      | Crema                                | Crema                               | -                     | Pulverulenta  | Rápido                   |
| FV1DH 008 | Circular, limitada, rizoide, - y crecimiento limitado.                             | Verde oscuro                         | Crema verde limón                   | -                     | Pulverulenta  | Rápido                   |

**Tabla 10:** Caracterización macroscópica de los hongos de la filósfera del café de la variedad Costa Rica 95

| Cepa      | Morfología General (Forma, Elevación, Margen, Superficie y Tamaño)            | Pigmentación en anverso                           | Pigmentación en reverso    | Difusión del pigmento | Textura      | Velocidad de Crecimiento |
|-----------|---|---|----------------------------|-----------------------|--------------|--------------------------|
| FV1EH 001 | Circular, limitado, entero, lisa, crecimiento limitado.                       | Salmón  | Melón                      | Ámbar                 | Cremosa      | Lento                    |
| FV1EH 002 | Irregular, plana, lobulado, - , crecimiento limitado.                         | Crema y verde en el centro                        | Crema                      | -                     | Pulverulenta | Lento                    |
| FV1EH 003 | Circular, limitada, rizoide, plegada con surco radiado, crecimiento limitado. | Verde y blanco en el margen                       | Crema                      | -                     | Pulverulenta | Lento                    |
| FV1EH 004 | Circular, elevada, entero, plegada, - , crecimiento limitado.                 | Verde oscuro                                      | Ámbar con estrías          | -                     | Pulverulenta | Lento                    |
| FV1EH 005 | Circular, plana, rizoide, surcos radiados, crecimiento limitado.              | Crema   | Crema                      | -                     | Pulverulenta | Moderada                 |
| FV1EH 006 | Circular, limitada, entero, lisa, crecimiento limitado.                       | Blanca brillante                                  | Crema                      | Ámbar                 | Cremosa      | Lenta                    |
| FV1EH 007 | Circular, limitada, entero, plegada, crecimiento limitado.                    | Verde oscuro en el centro y turquesa en el margen | Crema con estrías          | -                     | Pulverulenta | Lento                    |
| FV1EH 008 | Circular, plana, entero, surcos radiados, crecimiento limitado.               | Crema   | Crema con estrías          | -                     | Pulverulenta | Moderada                 |
| FV1EH 009 | Circular, plana, entero, - , crecimiento limitado.                            | Crema y surco dorado en la periferia              | Crema                      | -                     | Pulverulenta | Moderada                 |
| FV1EH 010 | Circular, plana, desflecada, - , crecimiento limitado.                        | Verde   | Naranja                    | -                     | Pulverulenta | Lento                    |
| FV1EH 011 | Irregular, plana, lobulado, - , crecimiento limitado.                         | Verde mar   | Crema verdoso              | -                     | Pulverulenta | Moderada                 |
| FV1EH 012 | Circular, limitada, rizoide, - , crecimiento limitado.                        | Verde oscuro                                      | Crema                      | -                     | Pulverulenta | Lento                    |
| FV1EH 013 | Circular, limitada, rizoide, - , crecimiento limitado.                        | Verde   | Crema con centro ocre      | -                     | Pulverulenta | Lento                    |
| FV1EH 014 | Circular, plana, desflecada, surcos radiados, crecimiento limitado.           | Verde limón en el centro y verde en el margen     | Naranja                    | -                     | Pulverulenta | Lento                    |
| FV1EH 015 | Circular, limitada, rizoide, - , crecimiento limitado.                        | Verde palta                                       | Crema y verde en el margen | -                     | Pulverulenta | Lento                    |

Continuación ...

|              |  |                                 |                                 |       |                                     |          |
|--------------|--|---------------------------------|---------------------------------|-------|-------------------------------------|----------|
| FV1EH<br>016 | Circular, plana, desflecada, rugoso, crecimiento limitado.             | Crema                           | Crema                           | -     | Centro vellosa y algodonosa, húmeda | Rápido   |
| FV1EH<br>017 | Circular, plana, rizoide, rugoso, crecimiento limitado.                | Crema                           | Crema                           | -     | Centro vellosa, húmeda              | Rápido   |
| FV1EH<br>018 | Circular, plana, rizoide, surcos radiados, crecimiento invasivo.       | Crema con manchas marrón dorado | Crema con manchas marrón dorado | -     | Algodonosa                          | Rápido   |
| FV1EH<br>019 | Circular, plana, desflecada, surcos radiados, crecimiento limitado.    | Crema                           | Crema                           | -     | Pulverulenta                        | Rápido   |
| FV1EH<br>020 | Irregular, limitada, lobulada, surcos radiados, crecimiento limitado.  | Melón                           | Melón                           | -     | Cremosa                             | Lento    |
| FV1EH<br>021 | Circular, limitada, desflecada, surcos radiados, crecimiento limitado. | Verde limón y filos amarillos   | Crema con centro rojo y estrías | -     | Pulverulenta                        | Moderada |
| FV1EH<br>022 | Circular, plana, desflecada, surco radiado, crecimiento limitado.      | Crema                           | Crema                           | -     | Pulverulenta                        | Rápido   |
| FV1EH<br>023 | Circular, limitada, desflecada, crecimiento limitado.                  | Verde y filos blancos           | Crema y centro rojo con estrías | Rojo  | Pulverulenta                        | Moderada |
| FV1EH<br>024 | Circular, plana, ondulada, - , crecimiento limitado.                   | Verde menta                     | Ocre                            | Ámbar | Pulverulenta                        | Lento    |
| FV1EH<br>025 | Irregular, limitado, entero, - , crecimiento limitado.                 | Marrón                          | Negro con estrías               | -     | Aterciopelada                       | Lento    |
| FV1EH<br>026 | Circular, limitada, plegado, entero, crecimiento limitado.             | Blanco con centro verde menta   | Crema                           | -     | Aterciopelada                       | Lento    |

**Tabla 11:** Caracterización macroscópica de los hongos de la filósfera del café de la variedad Limaní

| Cepa      | Morfología General (Forma, Elevación, Margen, Superficie y Tamaño)            | Pigmentación en anverso                            | Pigmentación en reverso                               | Difusión del pigmento | Textura       | Velocidad de Crecimiento |
|-----------|---|--|---|-----------------------|---------------|--------------------------|
| FV1FH 001 | Circular, limitada, desflecado, -, crecimiento limitado.                      | Marrón pardo                                       | Marrón con estrías                                    | -                     | Aterciopelado | Lento                    |
| FV1FH 002 | Circular, elevada, lobulado, surcos radiados, crecimiento limitado.           | Blanco con manchas negras                          | Crema con manchas negras.                             | -                     | Algodonosa    | Moderado                 |
| FV1FH 003 | Circular, limitada, entera, plegada, crecimiento limitado.                    | Verde blanco y margen blanco                       | Ocre y estrías  | -                     | Aterciopelada | Lento                    |
| FV1FH 004 | Circular, limitada, lobulada, -, crecimiento limitado.                        | Blanco y beige                                     | Beige   | -                     | Granuloso     | Lento                    |
| FV1FH 005 | Circular, plana, entera, con surcos radiados, crecimiento limitado.           | Surco olivo y centro plomo oscuro                  | Crema en el margen, surco olivo y centro plomo oscuro | -                     | Aterciopelada | Lento                    |
| FV1FH 006 | Circular, limitada, entera, plegada, surco radiado, crecimiento limitado.     | Verde oscuro en el centro y esmeralda en el margen | Crema con estrias                                     | -                     | Pulverulenta  | Lento                    |
| FV1FH 007 | Circular, limitada, entera, lisa, opáca, crecimiento limitado.                | Crema  | Crema   | -                     | Cremosa       | Lento                    |
| FV1FH 008 | Circular, limitada, desflecada, surco radiado, crecimiento limitado.          | Verde y margen verde menta                         | Amarillo  | Amarillo              | Pulverulenta  | Lento                    |
| FV1FH 009 | Circular, plana, rizoide, -, crecimiento limitado.                            | Verde military                                     | Crema   | -                     | Pulverulenta  | Lento                    |
| FV1FH 010 | Circular, elevada, lobulada, -, crecimiento limitado.                         | Blanco   | Crema   | -                     | Algodonoso    | Lento                    |
| FV1FH 011 | Circular, limitada, lobulada, plegada, surcos radiados, crecimiento limitado. | Verde pistachio                                    | Canela y estrías                                      | -                     | Pulverulenta  | Lento                    |
| FV1FH 012 | Circular, limitada, entera, surcos radiados, crecimiento limitado.            | Margen verde, surco crema, y centro verde oscuro   | Crema   | -                     | Aterciopelada | Moderado                 |
| FV1FH 013 | Circular, plana, rizoide, plegada, crecimiento limitado.                      | Marrón   | Negro   | -                     | Aterciopelada | Moderado                 |



Continuación ...





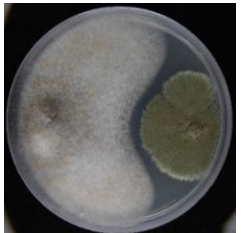
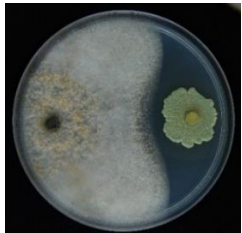
|              |   |  |  |   |               |          |
|--------------|---|--|--|---|---------------|----------|
| FV1FH<br>014 | Circular, entero, elevada, surcos radiados, crecimiento limitado.       | Blanco Rosado                                  | Centro canela y borde crema                    | - | Algodonosa    | Lento    |
| FV1FH<br>015 | Circular, plana, desflecada, surcos radiados, crecimiento limitado.     | Crema  | Crema  | - | Pulverulenta  | Moderada |
| FV1FH<br>016 | Circular, limitada, entera, lisa, crecimiento limitado.                 | Melón  | Melón  | - | Cremosa       | Lento    |
| FV1FH<br>017 | Circular, elevada, entero, plegada, crecimiento limitado.               | Blanco con puntos verdes en el centro          | Crema  | - | Aterciopelada | Moderada |
| FV1FH<br>018 | Circular, limitada, lobulada, -, crecimiento limitado.                  | Plomo  | Marrón dorado                                  | - | Aterciopelada | Lento    |
| FV1FH<br>019 | Circular, limitada, entero, surcos radiales, crecimiento limitado.      | Surco oliva y blanco                           | Oliva y crema                                  | - | Aterciopelada | Lento    |
| FV1FH<br>020 | Circular, limitada, lobulado, surco radiado, crecimiento limitado.      | Verde  | Verde limón                                    | - | Pulverulenta  | Lento    |
| FV1FH<br>021 | Circular, limitada, desflecada, -, crecimiento limitado.                | Verde oscuro y verde más claro al filo         | Crema  | - | Pulverulenta  | Moderada |
| FV1FH<br>022 | Circular, limitada, entera, surcos radiales, crecimiento limitado.      | Verde y al contorno azul bajo (turqueza)       | Naranja bajo y en el centro crema              | - | Pulverulenta  | Moderado |
| FV1FH<br>023 | Circular, limitada, rizoide, crecimiento limitado.                      | Verde  | Crema  | - | Pulverulenta  | Lento    |
| FV1FH<br>024 | Circular, plana, entera, plegada, surcos radiales crecimiento limitado. | Marrón dorado                                  | Oliva oscuro                                   | - | Aterciopelada | Moderado |
| FV1FH<br>025 | Circular, limitada, entera, lisa, opaca, crecimiento limitado.          | Crema  | Crema  | - | Cremosa       | Lento    |
| FV1FH<br>026 | Circular, limitada, entera, lisa, crecimiento limitado.                 | Coral brillante                                | Coral  | - | Cremosa       | Lento    |
| FV1FH<br>027 | Circular, plana, entera, -, crecimiento limitado.                       | Verde oliva                                    | Verde oliva oscuro y crema                     | - | Aterciopelada | Lento    |
| FV1FH<br>028 | Circular, plana, entera, surcos radiados, crecimiento limitado.         | Crema, surco final oliva y surco central negro | Crema, surco final oliva y surco central negro | - | Aterciopelada | Lento    |
| FV1FH<br>029 | Circular, plana convexa, entera, lisa, crecimiento limitado.            | Blanco   | Blanco   | - | Cremosa       | Lento    |

Continuación ...






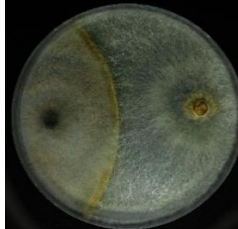

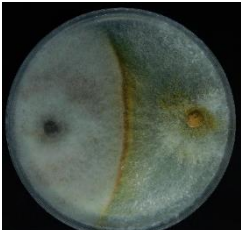

|              |  |                                      |                                      |         |               |          |
|--------------|--|--------------------------------------|--------------------------------------|---------|---------------|----------|
| FV1FH<br>030 | Circular, limitada, entera, surcos radiales, crecimiento limitado.                       | Verde y verde oliva en el centro     | Lacre                                | Naranja | Pulverulenta  | Lento    |
| FV1FH<br>031 | Circular, limitada, entera, plegada en el centro, surcos radiales, crecimiento limitado. | Crema en el centro y contorno marrón | Negro en el centro y contorno marrón | -       | Aterciopelada | Moderado |
| FV1FH<br>032 | Circular, limitada, entera, surcos radiados, crecimiento limitado.                       | Verde hasta verde menta              | Crema con estrías                    | -       | Pulverulenta  | Moderado |
| FV1FH<br>033 | Circular, plana, entera, plegada en el centro, crecimiento limitado.                     | Marrón oscuro                        | Marrón claro                         | -       | Aterciopelada | Moderado |
| FV1FH<br>034 | Irregular, plana, rizoide, surco radiado, crecimiento limitado.                          | Marrón oscuro                        | Negro                                | -       | Aterciopelada | Lento    |
| FV1FH<br>035 | Irregular, plana, rizoide, plegada, crecimiento limitado.                                | Marrón oscuro                        | Negro y estrías                      | -       | Aterciopelada | Lento    |
| FV1FH<br>036 | Circular, plana, rizoide, -, crecimiento invasivo.                                       | Crema                                | Crema                                | -       | Algodonosa    | Rápido   |

**Anexo 2:** Diversidad fúngica y cepas con capacidad antagonista distribuida en variedades resistentes y susceptibles a la roya amarilla del café



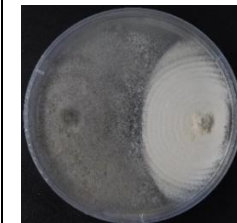






**Tabla 12:** Diversidad fúngica y cepas con capacidad antagonista distribuida en variedades susceptibles a la roya amarilla del café

|  | Variedad de Café | Diversidad Fúngica Aislada | Cepas secretoras de compuestos antifúngicos | Cepas que invaden el micelio del patógeno y generan inhibición por competencia de nutrientes | Porcentaje de cepas antagonistas | Cepas con capacidad antagonista contra <i>Colletotrichum sp.</i> (Izquierda)                       |  |  |
|--|------------------|----------------------------|---|--|----------------------------------|--|--|--|
| V<br>A<br>R<br>I<br>E<br>D<br>A<br>D<br>E<br>S | Var. Bourbon     | 10                         | 1   | 2  | 30%                              | FV1AH 004<br>   | FV1AH 005<br>   | FV1AH 010<br>   |
|  |                  |                            |   |  |                                  | FV1BH 001<br> | FV1BH 002<br> | FV1BH 011<br> |

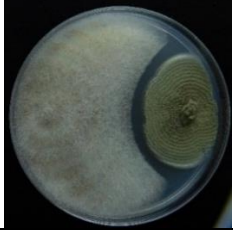









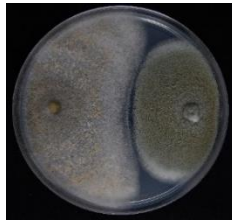

Continuación ...

|  |   |           |          |          |            |  |  |   |
|--|---|-----------|----------|----------|------------|--|--|---|
| S<br>U<br>S<br>C<br>E<br>P<br>T<br>I<br>B<br>L<br>E<br>S | Var.<br>Caturra<br>Roja   | 29        | 7        | 4        | 38%        | FV1BH 018  | FV1BH 021  | FV1BH 026   |
|  |   |           |          |          |            |   |   |  |
|  |   |           |          |          |            | FV1BH 027  | FV1BH 006  | FV1BH 009   |
|  |   |           |          |          |            |   |   |  |
|  |   |           |          |          |            | FV1BH 014  | FV1BH 028  |   |
|  |   |           |          |          |            |  |  |   |
|  | Var.<br>Typica  | 8         | 1        | 0        | 12.5%      | FV1CH 002  |  |   |
|  |  |           |          |          |            |  |  |   |
|  | <b>TOTAL</b>  | <b>47</b> | <b>9</b> | <b>6</b> | <b>32%</b> |  |  |   |

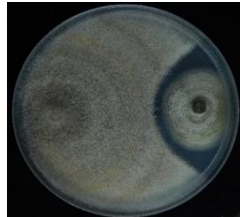
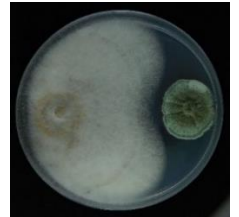

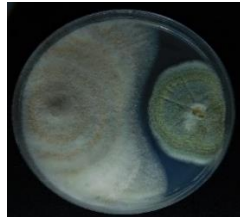
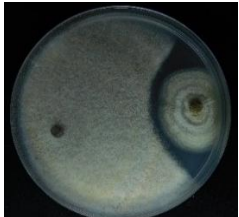
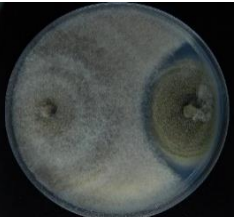
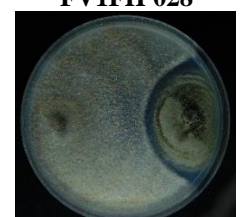
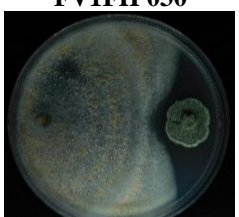



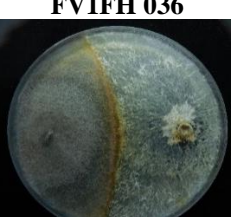
**Tabla 13:** Diversidad fúngica y cepas con capacidad antagonista distribuida en variedades resistentes a la roya amarilla del café

|  | Variedad de Café   | Diversidad Fúngica Aislada | Cepas secretoras de compuestos antifúngicos | Cepas que invaden el micelio del patógeno y generan inhibición por competencia de nutrientes | % de cepas antagonistas | Enfrentamiento contra <i>Colletotrichum sp.</i> (Izquierda)  |  |  |
|--|--------------------|----------------------------|---|--|-------------------------|--|--|--|
| V<br>A<br>R<br>I<br>E<br>D<br>A<br>D<br>E<br>S | Var. Catimor       | 9                          | 1   | 2  | 33.3%                   | FV1DH 002<br>   | FV1DH 006<br>   | FV1DH 007<br>   |
|  | Var. Costa Rica 95 | 26                         | 7   | 5  | 46%                     | FV1EH 003<br>  | FV1EH 004<br>  | FV1EH 010<br>  |
|  |                    |                            |   |  |                         | FV1EH 013<br> | FV1EH 014<br> | FV1EH 015<br> |

Continuación ...

|   |                |    |    |   |     |   |   |   |
|---|----------------|----|----|---|-----|---|---|---|
| R<br>E<br>S<br>I<br>S<br>T<br>E<br>N<br>T<br>E<br>S |                |    |    |   |     | <b>FV1EH 021</b><br>   | <b>FV1EH 005</b><br>   | <b>FV1EH 008</b><br>   |
|   |                |    |    |   |     | <b>FV1EH 009</b><br>   | <b>FV1EH 019</b><br>   | <b>FV1EH 022</b><br>   |
|   |                |    |    |   |     | <b>FV1EH 006</b><br>  | <b>FV1EH 008</b><br>  | <b>FV1EH 009</b><br>  |
|   | Var.<br>Limaní | 36 | 15 | 3 | 50% | <b>FV1EH 011</b><br> | <b>FV1EH 012</b><br> | <b>FV1EH 017</b><br> |

Continuación ...

|              |           |           |           |            |  |  |  |  |
|--------------|-----------|-----------|-----------|------------|--|--|--|--|
|              |           |           |           |            |  | <b>FV1FH 019</b><br>  | <b>FV1FH 020</b><br>  | <b>FV1FH 021</b><br>  |
|              |           |           |           |            |  | <b>FV1FH 022</b><br>  | <b>FV1FH 024</b><br>  | <b>FV1FH 027</b><br>  |
|              |           |           |           |            |  | <b>FV1FH 028</b><br>  | <b>FV1FH 030</b><br>  | <b>FV1FH 032</b><br>  |
|              |           |           |           |            |  | <b>FV1FH 002</b><br> | <b>FV1FH 015</b><br> | <b>FV1FH 036</b><br> |
| <b>TOTAL</b> | <b>71</b> | <b>23</b> | <b>10</b> | <b>46%</b> |  |  |  |  |



**Anexo 3:** Análisis estadístico

**1. Anova Simple – Radio del crecimiento miceliar de *Colletotrichum sp.* por tratamientos**

Tabla Anova para Radio del crecimiento miceliar de *Colletotrichum sp.*

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos  | 6074.84                  | 34        | 178.672               | 87.12          | 0.0000         |
| Intra grupos  | 143.559                  | 70        | 2.05084               |                |                |
| Total (Corr.) | 6218.4                   | 104       |                       |                |                |

Resumen Estadístico para Radio del crecimiento miceliar de *Colletotrichum sp.*

| <i>Tratamiento</i> | <i>Recuento</i> | <i>Promedio</i> | <i>Desviación Estándar</i> | <i>Coficiente de Variación</i> |
|--------------------|-----------------|-----------------|----------------------------|--------------------------------|
| Control            | 3               | 64.2298         | 1.55923                    | 2.42758%                       |
| FV1AH 004          | 3               | 45.8467         | 2.93446                    | 6.40059%                       |
| FV1BH 001          | 3               | 37.5667         | 1.27052                    | 3.38205%                       |
| FV1BH 002          | 3               | 36.51           | 2.17626                    | 5.96072%                       |
| FV1BH 011          | 3               | 33.32           | 2.08739                    | 6.26468%                       |
| FV1BH 018          | 3               | 30.4167         | 0.946802                   | 3.11277%                       |
| FV1BH 021          | 3               | 30.27           | 0.432782                   | 1.42974%                       |
| FV1BH 026          | 3               | 30.2067         | 0.83668                    | 2.76985%                       |
| FV1BH 027          | 3               | 27.5767         | 2.27201                    | 8.23889%                       |
| FV1CH 002          | 3               | 24.77           | 1.10761                    | 4.47158%                       |
| FV1DH 002          | 3               | 34.8133         | 0.255799                   | 0.734774%                      |
| FV1DH 006          | 3               | 45.7333         | 1.09697                    | 2.39861%                       |
| FV1EH 003          | 3               | 30.8167         | 1.06086                    | 3.4425%                        |
| FV1EH 004          | 3               | 30.9367         | 3.29219                    | 10.6417%                       |
| FV1EH 010          | 3               | 34.9467         | 1.155                      | 3.30505%                       |
| FV1EH 013          | 3               | 35.0667         | 0.142244                   | 0.405639%                      |
| FV1EH 014          | 3               | 31.7367         | 2.33415                    | 7.35473%                       |
| FV1EH 015          | 3               | 30.6233         | 1.26263                    | 4.1231%                        |
| FV1EH 021          | 3               | 28.2067         | 1.76755                    | 6.26643%                       |
| FV1FH 006          | 3               | 29.9            | 1.20553                    | 4.03187%                       |
| FV1FH 008          | 3               | 30.16           | 0.397366                   | 1.31753%                       |
| FV1FH 009          | 3               | 40.1133         | 0.455448                   | 1.1354%                        |
| FV1FH 011          | 3               | 43.2867         | 0.412351                   | 0.952605%                      |
| FV1FH 012          | 3               | 49.9667         | 1.10731                    | 2.2161%                        |
| FV1FH 017          | 3               | 35.1733         | 0.815925                   | 2.31973%                       |
| FV1FH 019          | 3               | 41.48           | 0.306105                   | 0.737957%                      |
| FV1FH 020          | 3               | 40.9            | 0.314325                   | 0.76852%                       |
| FV1FH 021          | 3               | 38.2867         | 0.187705                   | 0.490263%                      |
| FV1FH 022          | 3               | 36.71           | 1.18013                    | 3.21473%                       |
| FV1FH 023          | 3               | 34.1567         | 2.22767                    | 6.52193%                       |
| FV1FH 024          | 3               | 41.4067         | 0.537246                   | 1.29749%                       |
| FV1FH 027          | 3               | 38.8133         | 0.325781                   | 0.839354%                      |
| FV1FH 028          | 3               | 40.52           | 1.41552                    | 3.49339%                       |
| FV1FH 030          | 3               | 47.28           | 2.03005                    | 4.29367%                       |
| FV1FH 032          | 3               | 39.23           | 0.346987                   | 0.884494%                      |
| Total              | 105             | 36.885          | 7.73255                    | 20.9639%                       |



Pruebas de Múltiple Rangos para Radio del crecimiento miceliar de *Colletotrichum sp.* por tratamientos

Método: 95.0 porcentaje LSD

| Tratamiento | Casos | Media   | Grupos Homogéneos |
|-------------|-------|---------|-------------------|
| FV1CH 002   | 3     | 24.77   | X                 |
| FV1BH 027   | 3     | 27.5767 | X                 |
| FV1EH 021   | 3     | 28.2067 | XX                |
| FV1FH 006   | 3     | 29.9    | XXX               |
| FV1FH 008   | 3     | 30.16   | XX                |
| FV1BH 026   | 3     | 30.2067 | XX                |
| FV1BH 021   | 3     | 30.27   | XX                |
| FV1BH 018   | 3     | 30.4167 | XX                |
| FV1EH 015   | 3     | 30.6233 | X                 |
| FV1EH 003   | 3     | 30.8167 | X                 |
| FV1EH 004   | 3     | 30.9367 | X                 |
| FV1EH 014   | 3     | 31.7367 | XX                |
| FV1BH 011   | 3     | 33.32   | XX                |
| FV1FH 023   | 3     | 34.1567 | X                 |
| FV1DH 002   | 3     | 34.8133 | XX                |
| FV1EH 010   | 3     | 34.9467 | XX                |
| FV1EH 013   | 3     | 35.0667 | XX                |
| FV1FH 017   | 3     | 35.1733 | XX                |
| FV1BH 002   | 3     | 36.51   | XX                |
| FV1FH 022   | 3     | 36.71   | XX                |
| FV1BH 001   | 3     | 37.5667 | XX                |
| FV1FH 021   | 3     | 38.2867 | XXX               |
| FV1FH 027   | 3     | 38.8133 | XXXX              |
| FV1FH 032   | 3     | 39.23   | XXXX              |
| FV1FH 009   | 3     | 40.1133 | XXX               |
| FV1FH 028   | 3     | 40.52   | XXX               |
| FV1FH 020   | 3     | 40.9    | XX                |
| FV1FH 024   | 3     | 41.4067 | XX                |
| FV1FH 019   | 3     | 41.48   | XX                |
| FV1FH 011   | 3     | 43.2867 | X                 |
| FV1DH 006   | 3     | 45.7333 | X                 |
| FV1AH 004   | 3     | 45.8467 | X                 |
| FV1FH 030   | 3     | 47.28   | X                 |
| FV1FH 012   | 3     | 49.9667 | X                 |
| Control     | 3     | 64.2298 | X                 |

**2. Anova Simple – Radio del crecimiento miceliar de *Fusarium sp.* por tratamientos**

Tabla Anova para Radio del crecimiento miceliar de *Fusarium sp.*

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos  | 5166.98           | 17 | 303.94         | 269.67  | 0.0000  |
| Intra grupos  | 40.5745           | 36 | 1.12707        |         |         |
| Total (Corr.) | 5207.55           | 53 |                |         |         |

Resumen Estadístico para Radio del crecimiento miceliar de *Fusarium sp.*

| <i>Tratamiento</i> | <i>Recuento</i> | <i>Promedio</i> | <i>Desviación Estándar</i> | <i>Coficiente de Variación</i> |
|--------------------|-----------------|-----------------|----------------------------|--------------------------------|
| Control            | 3               | 66.6622         | 0.883656                   | 1.32557%                       |
| FV1BH 011          | 3               | 40.84           | 0.481352                   | 1.17863%                       |
| FV1BH 018          | 3               | 30.1467         | 1.78858                    | 5.93294%                       |
| FV1BH 021          | 3               | 28.4967         | 0.443772                   | 1.55728%                       |
| FV1BH 026          | 3               | 32.4667         | 0.988197                   | 3.04373%                       |
| FV1BH 027          | 3               | 28.9            | 0.41                       | 1.41869%                       |
| FV1CH 002          | 3               | 53.4833         | 0.621798                   | 1.1626%                        |
| FV1DH 002          | 3               | 35.8633         | 0.508462                   | 1.41778%                       |
| FV1EH 003          | 3               | 32.49           | 0.858079                   | 2.64106%                       |
| FV1EH 004          | 3               | 27.0133         | 0.416693                   | 1.54255%                       |
| FV1EH 010          | 3               | 39.85           | 1.92533                    | 4.83145%                       |
| FV1EH 013          | 3               | 36.4733         | 1.13161                    | 3.10256%                       |
| FV1EH 014          | 3               | 36.1967         | 1.17598                    | 3.24887%                       |
| FV1EH 015          | 3               | 33.0833         | 0.16773                    | 0.506992%                      |
| FV1EH 021          | 3               | 35.6967         | 1.85271                    | 5.19015%                       |
| FV1FH 006          | 3               | 25.9767         | 0.219393                   | 0.844578%                      |
| FV1FH 008          | 3               | 26.9967         | 0.541695                   | 2.00653%                       |
| FV1FH 017          | 3               | 34.7            | 1.7339                     | 4.99682%                       |
| FV1FH 023          | 3               | 36.37           | 0.905041                   | 2.56472%                       |
| Total              | 54              | 35.852          | 9.9124                     | 27.6481%                       |

Pruebas de Múltiple Rangos para Radio del crecimiento miceliar de *Fusarium sp*

Método: 95.0 porcentaje LSD

| <i>Tratamiento</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|--------------------|--------------|--------------|--------------------------|
| FV1FH 006          | 3            | 25.9767      | X                        |
| FV1FH 008          | 3            | 26.9967      | XX                       |
| FV1EH 004          | 3            | 27.0133      | XX                       |
| FV1BH 021          | 3            | 28.4967      | XX                       |
| FV1BH 027          | 3            | 28.9         | X                        |
| FV1BH 018          | 3            | 30.1467      | X                        |
| FV1BH 026          | 3            | 32.4667      | X                        |
| FV1EH 003          | 3            | 32.49        | X                        |
| FV1EH 015          | 3            | 33.0833      | XX                       |
| FV1FH 017          | 3            | 34.7         | XX                       |
| FV1EH 021          | 3            | 35.6967      | XX                       |
| FV1DH 002          | 3            | 35.8633      | XX                       |
| FV1EH 014          | 3            | 36.1967      | XX                       |
| FV1FH 023          | 3            | 36.37        | X                        |
| FV1EH 013          | 3            | 36.4733      | X                        |
| FV1EH 010          | 3            | 39.85        | X                        |
| FV1BH 011          | 3            | 40.84        | X                        |
| FV1CH 002          | 3            | 53.4833      | X                        |
| Control            | 3            | 66.6622      | X                        |

### 3. Anova Simple – Radio del crecimiento miceliar de *Phoma sp.* por tratamientos

Tabla Anova para Radio del crecimiento miceliar de *Phoma sp.*

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos  | 5722.84                  | 14        | 408.774               | 233.45         | 0.0000         |
| Intra grupos  | 52.5295                  | 30        | 1.75098               |                |                |
| Total (Corr.) | 5775.37                  | 44        |                       |                |                |

Resumen Estadístico para Radio del crecimiento miceliar de *Phoma sp.*

| <i>Tratamiento</i> | <i>Recuento</i> | <i>Promedio</i> | <i>Desviación Estándar</i> | <i>Coefficiente de Variación</i> |
|--------------------|-----------------|-----------------|----------------------------|----------------------------------|
| Control            | 3               | 68.4956         | 0.374468                   | 0.546703%                        |
| FV1BH 011          | 3               | 41.6767         | 0.566157                   | 1.35845%                         |
| FV1BH 018          | 3               | 28.7767         | 1.58317                    | 5.50158%                         |
| FV1BH 021          | 3               | 27.7033         | 0.957566                   | 3.4565%                          |
| FV1BH 026          | 3               | 26,1133         | 2,864328                   | 8.34143%                         |
| FV1BH 027          | 3               | 27.6333         | 0.594755                   | 2.15231%                         |
| FV1CH 002          | 3               | 39.6967         | 1.27473                    | 3.21117%                         |
| FV1DH 002          | 3               | 40.0467         | 0.555818                   | 1.38793%                         |
| FV1EH 003          | 3               | 25.6833         | 1.58105                    | 6.15596%                         |
| FV1EH 010          | 3               | 43.3467         | 0.638775                   | 1.47364%                         |
| FV1EH 013          | 3               | 41.7            | 0.581292                   | 1.39398%                         |
| FV1EH 014          | 3               | 43.3167         | 1.33927                    | 3.0918%                          |
| FV1EH 015          | 3               | 50.5267         | 0.502925                   | 0.995365%                        |
| FV1EH 021          | 3               | 38.6067         | 3.26247                    | 8.45054%                         |
| FV1FH 006          | 3               | 27.5633         | 1.16092                    | 4.21182%                         |
| FV1FH 008          | 3               | 24.96           | 1.6761                     | 6.71513%                         |
| FV1FH 023          | 3               | 29,656          | 3,07252                    | 11.2173%                         |
| Total              | 45              | 37.9821         | 11.4568                    | 30.1637%                         |

Pruebas de Múltiple Rangos para Radio del crecimiento miceliar de *Phoma sp.*

Método: 95.0 porcentaje LSD

| <i>Tratamiento</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|--------------------|--------------|--------------|--------------------------|
| FV1FH 008          | 3            | 24.96        | X                        |
| FV1EH 003          | 3            | 25.6833      | XX                       |
| FV1FH 006          | 3            | 27.5633      | XX                       |
| FV1BH 027          | 3            | 27.6333      | XX                       |
| FV1BH 021          | 3            | 27.7033      | XX                       |
| FV1BH 018          | 3            | 28.7767      | X                        |
| FV1FH 023          | 3            | 29.656       | X                        |
| FV1EH 021          | 3            | 38.6067      | X                        |
| FV1CH 002          | 3            | 39.6967      | XX                       |
| FV1DH 002          | 3            | 40.0467      | XX                       |
| FV1BH 011          | 3            | 41.6767      | XX                       |
| FV1EH 013          | 3            | 41.7         | XX                       |
| FV1EH 014          | 3            | 43.3167      | X                        |
| FV1EH 010          | 3            | 43.3467      | X                        |
| FV1EH 015          | 3            | 50.5267      | X                        |
| Control            | 3            | 68.4956      | X                        |

#### 4. Anova Simple – Porcentaje de Germinación de *Hemileia vastratix* por tratamientos en 8 horas

Tabla ANOVA para Porcentaje de Germinación de *Hemileia vastratix* por Tratamiento en 8 horas

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos  | 1347.77                  | 9         | 149.753               | 407.80         | 0.0000         |
| Intra grupos  | 7.34441                  | 20        | 0.367221              |                |                |
| Total (Corr.) | 1355.12                  | 29        |                       |                |                |

Resumen Estadístico para Porcentaje de Germinación de *Hemileia vastratix*

| <i>Tratamiento</i> | <i>Recuento</i> | <i>Promedio</i> | <i>Desviación Estándar</i> | <i>Coficiente de Variación</i> |
|--------------------|-----------------|-----------------|----------------------------|--------------------------------|
| CONTROL            | 3               | 22.5702         | 1.79821                    | 7.96722%                       |
| FV1BH 018          | 3               | 0.255191        | 0.237805                   | 93.1868%                       |
| FV1BH 021          | 3               | 0.0             | 0.0                        | %                              |
| FV1BH 026          | 3               | 0.0             | 0.0                        | %                              |
| FV1BH 027          | 3               | 0.237389        | 0.208467                   | 87.8163%                       |
| FV1EH 003          | 3               | 0.349749        | 0.398311                   | 113.885%                       |
| FV1EH 004          | 3               | 0.887056        | 0.381174                   | 42.9706%                       |
| FV1EH 015          | 3               | 0.389643        | 0.127712                   | 32.7768%                       |
| FV1FH 006          | 3               | 0.0             | 0.0                        | %                              |
| FV1FH 008          | 3               | 0.0782473       | 0.135528                   | 173.205%                       |
| FV1FH 023          | 3               | 0.0             | 0.0                        | %                              |
| Total              | 33              | 2.47674         | 6.83581                    | 276.0%                         |

Pruebas de Múltiple Rangos para Porcentaje de Germinación de *Hemileia vastratix* por Tratamiento en 8 horas

Método: 95.0 porcentaje LSD

| <i>Tratamiento</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|--------------------|--------------|--------------|--------------------------|
| FV1BH 026          | 3            | 0.0          | X                        |
| FV1BH 021          | 3            | 0.0          | X                        |
| FV1FH 006          | 3            | 0.0          | X                        |
| FV1FH 023          | 3            | 0.0          | X                        |
| FV1FH 008          | 3            | 0.0782473    | X                        |
| FV1BH 027          | 3            | 0.237389     | X                        |
| FV1BH 018          | 3            | 0.255191     | X                        |
| FV1EH 003          | 3            | 0.349749     | X                        |
| FV1EH 015          | 3            | 0.389643     | X                        |
| FV1EH 004          | 3            | 0.887056     | X                        |
| CONTROL            | 3            | 22.5702      | X                        |

**5. Anova Simple – Porcentaje de Germinación de *Hemileia vastratix* por tratamientos en 24 horas**

Tabla ANOVA para Porcentaje de Germinación de *Hemileia vastratix* por Tratamiento en 24 horas

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos  | 1083.9                   | 9         | 120.433               | 22.15          | 0.0000         |
| Intra grupos  | 108.755                  | 20        | 5.43775               |                |                |
| Total (Corr.) | 1192.65                  | 29        |                       |                |                |

Resumen Estadístico para Porcentaje de Germinación de *Hemileia vastratix*

| <i>Tratamiento</i> | <i>Recuento</i> | <i>Promedio</i> | <i>Desviación Estándar</i> | <i>Coficiente de Variación</i> |
|--------------------|-----------------|-----------------|----------------------------|--------------------------------|
| CONTROL            | 3               | 25.1872         | 2.79696                    | 11.10468%                      |
| FV1BH 018          | 3               | 7.32161         | 0.629694                   | 8.60048%                       |
| FV1BH 021          | 3               | 7.37715         | 2.25058                    | 30.5075%                       |
| FV1BH 026          | 3               | 2.74246         | 0.415106                   | 15.1363%                       |
| FV1BH 027          | 3               | 7.3148          | 2.22363                    | 30.399%                        |
| FV1EH 003          | 3               | 3.20189         | 1.28641                    | 40.1765%                       |
| FV1EH 004          | 3               | 9.79162         | 1.9264                     | 19.674%                        |
| FV1EH 015          | 3               | 8.91137         | 0.727068                   | 8.15888%                       |
| FV1FH 006          | 3               | 4.88427         | 0.782663                   | 16.0241%                       |
| FV1FH 008          | 3               | 6.80702         | 1.92021                    | 28.2092%                       |
| FV1FH 023          | 3               | 5.41463         | 0.62445                    | 14.024%                        |
| Total              | 33              | 8.35394         | 6.41296                    | 76.7657%                       |

Pruebas de Múltiple Rangos para Porcentaje de Germinación de *Hemileia vastratix* por Tratamiento en 24 horas

Método: 95.0 porcentaje LSD

| <i>Tratamiento</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|--------------------|--------------|--------------|--------------------------|
| FV1BH 026          | 3            | 2.74246      | X                        |
| FV1EH 003          | 3            | 3.20189      | XX                       |
| FV1FH 006          | 3            | 4.88427      | XXX                      |
| FV1FH 023          | 3            | 5.41463      | XXX                      |
| FV1FH 008          | 3            | 6.80702      | XXX                      |
| FV1BH 027          | 3            | 7.3148       | XX                       |
| FV1BH 018          | 3            | 7.32161      | XX                       |
| FV1BH 021          | 3            | 7.37715      | XX                       |
| FV1EH 015          | 3            | 8.91137      | X                        |
| FV1EH 004          | 3            | 9.79162      | X                        |
| CONTROL            | 3            | 25.1872      | X                        |