

Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca

División de Estudios de Posgrado e Investigación

**ANTAGONISMO DE *Trichoderma* spp. A *Colletotrichum* spp. EN CAFÉ ARÁBICO**

TESIS QUE PRESENTA:

Abimael Rubio Sosa

Como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS**

DIRECTOR:

Salvador Lozano Trejo

CODIRECTOR:

Misael Martínez Bolaños

---

Ex Hacienda de Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca.  
Agosto de 2023



Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca

División de Estudios de Posgrado e Investigación

**ANTAGONISMO DE *Trichoderma* spp. A *Colletotrichum* spp. EN CAFÉ  
ARÁBICO**

TESIS QUE PRESENTA:

Abimael Rubio Sosa

Como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCTIVIDAD EN  
AGROECOSISTEMAS**

DIRECTOR:

Salvador Lozano Trejo

CODIRECTOR:

Misael Martínez Bolaños

---

Ex Hacienda de Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca.  
Agosto de 2023

La presente tesis titulada: **ANTAGONISMO DE *Trichoderma* spp. A *Colletotrichum* spp. EN CAFÉ ARÁBICO**, fue realizada bajo la dirección del Consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el título de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS**

DIRECTOR:

DR. SALVADOR LOZANO TREJO

CO-DIRECTOR:

DR. MISAEL MARTINEZ BOLAÑOS

ASESOR:

DR. ERNESTO CASTAÑEDA HIDALGO

ASESOR:

M.C. GUSTAVO OMAR DIAZ ZORRILLA

Ex-Hacienda de Nazareno, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, agosto de 2023.

El presente trabajo se llevó a cabo con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), a través del número de becario 1154232, con el tema de investigación: **Antagonismo de *Trichoderma* spp. a *Colletotrichum* spp. en café arábico.**

## INDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	iv
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	v
<b>RESUMEN</b> .....	vi
<b>SUMMARY</b> .....	vii
<b>CAPITULO I. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>1.1 Objetivo general</b> .....	3
<b>1.2 Objetivos específicos</b> .....	3
<b>CAPITULO II. MARCO TEÓRICO</b> .....	4
2.1 Cultivo del café.....	4
2.1.1 Morfología de las plantas .....	5
2.1.2 Importancia del cultivo .....	6
2.1.3 Principales estados productores .....	6
2.1.4 Retos del cultivo de café .....	7
2.1.5 Enfermedades del café .....	9
2.2 <i>Colletotrichum</i> .....	10
2.2.1 Distribución .....	12
2.2.2 Morfología .....	12
2.2.3 Método de infección .....	13
2.2.4 Cultivos afectados.....	13
2.2.5 Control .....	14
2.3 Microorganismos antagonicos.....	15
2.3.1 Mecanismos de acción.....	17
2.3.2 Principales microorganismos utilizados .....	17
2.4 <i>Trichoderma</i> .....	18
2.4.1 Taxonomía .....	19

2.4.2 Morfología .....	20
2.4.3 Mecanismos de acción.....	20

**CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS NATIVOS DE *Trichoderma* Y SU POTENCIAL DE BIOCONTROL SOBRE *Colletotrichum* spp. EN CAFÉ**

<b>ARÁBICO</b> .....	23
Resumen .....	23
Abstract .....	23
3.1 Introducción.....	23
3.2 Materiales y métodos .....	24
3.2.1 Obtención de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> y <i>Trichoderma</i> .....	24
3.2.2 Caracterización macroscópica .....	25
3.2.3 Caracterización microscópica .....	26
3.2.4 Tasa de crecimiento.....	26
3.2.5 Identificación molecular.....	26
3.2.6 Análisis bioinformático .....	27
3.2.7 Pruebas de antagonismo .....	28
3.2.7 Análisis estadístico.....	28
3.3 Resultados y discusión.....	29
3.4 Conclusiones.....	36
3.5 Literatura citada.....	36

**CAPÍTULO IV. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y PATOGENICA DE *Colletotrichum* sp. COMO AGENTE CAUSAL DE ANTRACNOSIS EN CAFÉ**

Resumen .....	43
Summary .....	43
4.1 Introducción.....	44
4.2 Materiales y métodos .....	46
4.2.1 Muestreo .....	46
4.2.2 Aislamiento .....	46
4.2.3 Caracterización macroscópica .....	46
4.2.4 Caracterización microscópica .....	47
4.2.5 Identificación molecular.....	47
4.2.6 Análisis bioinformático .....	48
4.2.7 Pruebas de patogenicidad .....	49
4.3 Resultados y discusión.....	49
4.4 Conclusiones .....	55
4.5 Bibliografía .....	55

**CAPITULO V. CONCLUSIONES GENERALES**..... 59

**CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES..... 61**  
**CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA GENERAL..... 63**



## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
3.1	Caracterización y tasa de crecimiento de los diferentes aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.....	32
4.1	Conidios de 11 aislamientos de <i>Colletotrichum</i> .....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
3.1	Caracterización macroscópica de 12 aislamientos de <i>Trichoderma</i> en PDA.....	31
3.2	Productos de amplificación por PCR y relación filogenética.....	34
3.3	Confrontamiento dual entre cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	36
4.1	Características macroscópicas de 11 aislamientos de <i>Colletotrichum</i> en PDA.....	51
4.2	Tasa de crecimiento diametral de 11 aislamientos de <i>Colletotrichum</i> .....	52
4.3	Drendrograma.....	54
4.4	Pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i> .....	55

## RESUMEN

A nivel mundial, México es uno de los principales países productores de café incluyendo la producción de café orgánico, siendo el sureste mexicano el mayor proveedor de este producto, sin embargo, varios factores como el cambio climático, el poco o nulo manejo de los cultivos, entre otros, han dado paso la afectación por enfermedades, disminuyendo la producción en las últimas décadas. Dentro de las enfermedades que atacan al sector cafetalero se encuentra la antracnosis, la cual ha sido controlada mediante productos químicos, actualmente se buscan alternativas amigables con el ambiente, por lo que el implemento de microorganismos antagónicos, presenta una alternativa cada vez más aceptada entre los productores. Por lo que surge la necesidad de aislar microorganismos causando dicha enfermedad y en contraparte microorganismos que funcionen como controladores biológicos. Se llevo a cabo el aislamiento, caracterización morfológica, patogénica y molecular de aislamientos de *Colletotrichum* spp. pertenecientes a cultivos de café del estado de Oaxaca y Chiapas. Como control biológico se caracterizaron aislamientos de *Trichoderma* spp. nativas del estado de Oaxaca. Como resultado, se obtuvieron tres especies distintas del género *Colletotrichum* las cuales demostraron virulencia en las pruebas de patogenicidad, sin embargo, de las cinco especies obtenidas del género *Trichoderma*, las utilizadas en pruebas de confrontamientos duales, demostraron inhibir el crecimiento de los patógenos. Mediante la caracterización precisa de los patógenos se pueden desarrollar tratamientos adecuados para reducir el impacto de esta enfermedad en los cultivos de café. Por ende, el propósito de este estudio es aportar al conocimiento sobre estos microorganismos.

**Palabras clave:** *Coffea arábica*, *Colletotrichum*, control biológico.

## SUMMARY

Globally, Mexico is one of the main coffee-producing countries, including the production of organic coffee, with the Mexican southeast being the largest supplier of this product, however, various factors such as climate change, little or no crop management, among others, have been affected by diseases, decreasing production in recent decades. Among the diseases that attack the coffee sector is anthracnose, which has been controlled by chemical products, currently looking for environmentally friendly alternatives, so the implementation of antagonistic microorganisms presents an increasingly accepted alternative among coffee growers. producers. Therefore, the need arises to isolate microorganisms causing said disease and, in contrast, microorganisms that function as biological controllers. The isolation, morphological, pathogenic and molecular characterization of *Colletotrichum* spp. belonging to coffee crops in the state of Oaxaca and Chiapas. As biological control, isolates of *Trichoderma* spp. native to the state of Oaxaca. As a result, three different species of the genus *Colletotrichum* were obtained, which demonstrated virulence in the pathogenicity tests, however, of the five species obtained from the genus *Trichoderma*, those used in dual confrontation tests, demonstrated to inhibit the growth of pathogens. Through the precise characterization of the pathogens, suitable treatments can be developed to reduce the impact of this disease on coffee crops. Therefore, this study aims to contribute to the knowledge of these microorganisms.

**Keywords:** *Coffea arabica*, *Colletotrichum*, biological control

## CAPITULO I

### INTRODUCCIÓN

El cultivo de café (*Coffea arábica* L.) forma parte de los cultivos con mayor importancia económica, social y ambiental en el mundo. México se encuentra dentro de los 11 países con mayor producción mundial de café, Oaxaca, por su parte ocupa el cuarto lugar (35,846 ton) en producción a nivel nacional (SIAP, 2023) y se encuentra dentro de los principales estados productores de café orgánico, debido a su gran demanda en el mercado global y su potencial para impulsar el desarrollo comunitario (Canseco-Martínez *et al.*, 2020). La Organización Internacional del Café, por sus siglas en inglés OIC (2021), muestra que en el ciclo de 2019/20 la producción mundial de café fue de 165,053 mil sacos, generando una baja en comparación al ciclo 2018/19 que fue de 172,461 mil sacos. La disminución en la producción de café se ha atribuido a diversos factores, como la proliferación de plagas y enfermedades, el envejecimiento de los cultivos, la ausencia de programas y políticas públicas eficientes, así como los bajos precios internacionales del producto (Espinosa-García *et al.*, 2016).

La antracnosis es una enfermedad poco investigada que impacta negativamente las plantaciones de café. Esta enfermedad es ocasionada por el hongo *Colletotrichum* spp., que se beneficia de condiciones climáticas y fisiológicas específicas, como vientos fríos, precipitaciones abundantes y suelos con dificultades en la penetración de raíces. Además, los desequilibrios nutricionales también contribuyen a su propagación. (Canet-Brenes *et al.*, 2016) Para combatir esta enfermedad, se han empleado productos químicos; no obstante, su utilización conlleva importantes desafíos, como el elevado costo, la contaminación ambiental y los potenciales riesgos para la salud humana (Zapata-Narváez *et al.*, 2020), estas circunstancias han llevado a los productores a buscar alternativas respetuosas con el medio ambiente, como el control biológico, que se basa en la utilización de microorganismos para regular las poblaciones de plagas en las plantas (Vidal-Martínez *et al.*, 2021). Uno de los agentes de biocontrol más utilizados son los del género *Trichoderma* spp. debido a que posee amplio espectro de acción hacia fitopatógenos de cultivos agrícolas (García-Núñez, 2017), por su potencial parasítico, rápido crecimiento y producción de metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de otros hongos (Infante *et al.*, 2009).

Actualmente se hace necesario el aislamiento y caracterización de cepas nativas que funcionen como biocontroladoras de enfermedades hacia plantas de interés comercial, por lo que se espera que este estudio, sirva de base, para identificar las especies del género *Colletotrichum* causantes de la enfermedad de antracnosis, así como conocer el grado de antagonismo que presentan algunas especies del género *Trichoderma* spp. ante *Colletotrichum* spp.

### **1.1 Objetivo general**

Caracterizar cepas de *Trichoderma* spp. y *Colletotrichum* spp. del estado de Oaxaca y Chiapas.

### **1.2 Objetivos específicos**

1. Caracterizar aislamientos de *Trichoderma* spp., nativas del estado de Oaxaca y evaluar su potencial de biocontrol contra *Colletotrichum* spp.
2. Caracteriza patogénicamente cepas de *Colletotrichum* spp. aisladas de café arábico en Oaxaca y Chiapas.

## **CAPITULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 Cultivo del café**

A nivel global, el café es uno de los principales productos agrícolas que goza de un alto consumo (Medina-Meléndez *et al.*, 2016). El café tuvo su origen en los bosques mesófilos de África, en estos entornos, las prácticas tradicionales de cultivo incluían principalmente dos tipos de sistemas hasta mediados del siglo XX. Por un lado, se llevaba a cabo la sustitución simple de las plantas del suelo de selvas o bosques, con un mínimo impacto en el ecosistema forestal original (sistema rusticano). Por otro lado, se introducía el café como cultivo bajo la sombra de árboles, junto con especies nativas e introducidas, y se acompañaba de diversas especies de plantas útiles (plantación de policultivo tradicional) (Aguirre-Cadena *et al.*, 2012). Se cultiva principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, especialmente en África, Asia y América Latina (Machenahalli *et al.*, 2021), generando un comercio mundial del cultivo (Enríquez *et al.*, 2020), ocupando el segundo lugar después del petróleo en términos de comercio (Bosselmann *et al.*, 2009).



Espinosa-García (2016), menciona que el café arábico llegó al continente americano y a México a finales del siglo XVII. Actualmente, se encuentra en diferentes altitudes que van desde 300 hasta 2000 metros, y está presente en una gran variedad de climas, tipos de suelo y vegetación (Aguirre-Cadena *et al.*, 2012). En México, se cultivan mayormente los cultivares Typica, Bourbon, Caturra Rojo, Mundo Novo, Garnica y Caturra Amarillo (López-García *et al.*, 2016).

### 2.1.1 Morfología de las plantas

Existe una similitud genética compartida entre la mayoría de las variedades de *Coffea arabica* en todo el mundo., pero presentan notables diferencias morfológicas, y sus frutos muestran contrastes en cuanto a la calidad antes y después de la cosecha (Steiger *et al.*, 2002).

Desde un punto de vista económico, el género *Coffea* es el más relevante dentro de la familia de las Rubiáceas. Las características de las plantas de café incluyen una amplia variedad de tamaños, desde arbustos pequeños hasta árboles de gran envergadura. Estas plantas poseen una madera sólida y densa, inflorescencias que se presentan en pares y flores hermafroditas con corolas de tonalidad blanca o ligeramente rosada. El estilo puede ser largo y sobresalir de la corola. El fruto, clasificado como una drupa indehiscente, está compuesto por dos semillas. Cada semilla muestra una distintiva grieta conocida como "sutura coffeanum" (Davis *et al.*, 2006).

### 2.1.2 Importancia del cultivo

El café (*Coffea arabica*), es uno de los cultivos más destacados a nivel mundial y tiene un enorme impacto económico, principalmente en países en desarrollo (Villalta-Villalobos y Gatica-Arias, 2019). Su cultivo ha sido de vital importancia, no solo por su contribución a los indicadores económicos, sino también por su papel en la sociedad, la cultura, las instituciones y la política en numerosos países del Sur y Centroamérica (Bosselmann *et al.*, 2009).

El cultivo de café en México es una actividad de gran importancia, ya que impulsa la integración de cadenas productivas, la generación de divisas y empleo. Además, representa el medio de subsistencia para muchos pequeños productores. Recientemente, ha adquirido relevancia ecológica debido a la implementación de sistemas agroforestales. (Santiago-Santiago, 2020), considerados zonas prioritarias para la conservación de la biodiversidad del país (García-Alvarado *et al.*, 2017), debido a que actúan como santuarios para numerosas especies de plantas, creando áreas biológicamente ricas y diversas (Aguirre-Cadena *et al.*, 2012).

### 2.1.3 Principales estados productores

Gracias a la diversidad geográfica de México, se cuenta con la capacidad de cultivar y producir variedades de café que están clasificadas entre las mejores a nivel mundial (Medina-Meléndez *et al.*, 2016). La producción predominante de café tiene lugar en la región tropical de México, ya que esta área cuenta con las condiciones agroecológicas adecuadas para el crecimiento de cultivos perennes (Espinosa-García *et al.*, 2016). Los estados con mayor producción de este cultivo son Chiapas, Puebla, Veracruz y Oaxaca,

con producciones en toneladas de 111 528, 106 992, 106 846, 35 846 respectivamente (SIAP, 2023). Esta información concuerda con Espinosa-García (2016), quien menciona que las principales cuencas hidrológicas con un amplio potencial para la producción de café son el Río Grijalva y Lacantun, ubicados en el estado de Chiapas, y el Río Papaloapan, que abarca los estados de Puebla, Oaxaca y Veracruz.

En estos estados, el café orgánico se ha establecido como una opción destacada en el mercado global, siendo cultivado, gestionado y procesado siguiendo principios y normas de producción que promueven la sustentabilidad ambiental y la responsabilidad social (Enríquez *et al.*, 2020). A pesar de que esta área cuenta con las condiciones agroecológicas adecuadas para el crecimiento y desarrollo del café, en los años 80 la caficultura denominada “intensiva” y el uso excesivo de agroquímicos, condujo a una proliferación de plagas y enfermedades la cual obligo a la aplicación masiva de plaguicidas y fungicidas (Canet-Brenes *et al.*, 2016).

#### 2.1.4 Retos del cultivo de café

La actividad cafetalera es de gran importancia, pero en los últimos 10 años, ha experimentado una disminución en la producción de café en grano debido a la incertidumbre en los precios, con una tasa de decrecimiento promedio anual del 6% (Santiago-Santiago *et al.*, 2020), aunado a la falta de programas y de políticas públicas efectivas (Espinosa-García *et al.*, 2016), los altos costos de producción obligan al productor a buscar otra forma de generar ingresos (García-Alvarado *et al.*, 2017). Esto resulta en el descuido de las plantaciones, ya que tareas como la poda y la fertilización implican costos significativos (Hernández-Acosta *et al.*, 2020). Sin el adecuado manejo

de las plantas y el bajo aporte de nutrientes, se vuelven más vulnerables a plagas y enfermedades.

De acuerdo con Henderson (2019), existe una estrecha relación entre los precios inestables y bajos del café, la migración, la disminución en la intensidad del manejo de los cultivos y el aumento de la vulnerabilidad de las plantaciones a enfermedades. Por otro lado, los sistemas agrícolas altamente especializados y tecnificados, dependen en gran medida de insumos químicos sintéticos y la aplicación de grandes cantidades de agroquímicos. Aunque el uso de estos insumos puede generar beneficios inmediatos en el rendimiento de los cultivos, su elevado costo económico y los daños ecológicos que causan han planteado interrogantes sobre su uso indiscriminado (Aguirre-Cadena *et al.*, 2012).

La demanda de café está en constante crecimiento, y existen aspectos distintivos y especiales en todo el mundo. Esto significa, que los productores deben aumentar la vigilancia en los procesos de control de calidad para poder obtener un precio superior por su café en comparación con el café convencional (Enríquez *et al.*, 2020). Aunado a esto, la demanda de los consumidores de países industrializados o de alto poder adquisitivo, por métodos de producción de café no destructivos y respetuosos con el medio ambiente, han impulsado el interés en la creación de un mercado de café orgánico. Este tipo de café, se caracteriza por su producción sin el uso de agroquímicos y por evitar la generación de contaminación ambiental (Aguirre-Cadena *et al.*, 2012).

El entendimiento de las características agronómicas en las plantas de café, junto con la salud fitosanitaria y la fertilidad del suelo, resultan fundamentales para evaluar el potencial de producción (Milla-Pino *et al.*, 2019). Por otro lado, Suatunce-Cunuhay *et al.* (2020), sugiere la implementación de cultivos de café bajo sombra, ya que aumenta la diversidad de organismos de control biológico, lo que a su vez contribuye a reducir la incidencia de plagas y enfermedades, dado su impacto económico y sostenible, lo que se convierte en una prioridad para la producción de café (Enríquez *et al.*, 2020).

#### 2.1.5 Enfermedades del café

La implementación de la Revolución Verde resultó en la degradación química, física y biológica de los suelos, lo cual tuvo un impacto negativo en la producción de las fincas cafetaleras del sureste de México (Hernández-Acosta *et al.*, 2020). Por otra parte, a raíz de la migración de la mano de obra familiar y las condiciones del mercado, los cafetales han sido descuidados desde principios de los años noventa. En consecuencia, la productividad del sector cafetalero en México ha experimentado un declive constante a lo largo de las últimas tres décadas. (Henderson, 2019). Según el 41.2% de los caficultores, los cambios climáticos son identificados como el factor principal que está contribuyendo a la aparición de plagas y enfermedades graves, incluyendo la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*). Esta enfermedad ha causado pérdidas de cosecha significativas, especialmente entre los productores que se dedican principalmente a la producción orgánica (Medina-Meléndez *et al.*, 2016). No obstante, los caficultores también enfrentan una amenaza constante de problemas fitopatológicos, muchos de los cuales tienen el potencial de convertirse en desafíos clave en el futuro, tales como; el ojo

de gallo (*Mycena citricolor*), mal de hilachas (*Pellicularia koleroga*) y antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Huaman *et al.*, 2021).

La adición de nutrientes al cultivo de café desempeña un papel fundamental para mejorar la resistencia de las plantas a enfermedades. Ante este desafío de calidad, los líderes de las cooperativas orgánicas fomentan el uso de fungicidas orgánicos y la recuperación de variedades tradicionales que han demostrado cierto nivel de resistencia natural a los patógenos (Henderson, 2019), así como la inclusión de diversas especies vegetales en el sistema, como la palma camedor y cultivos frutales, por otro lado, la ampliación del enfoque orgánico, puede generar beneficios tanto en términos ecológicos como económicos. Esta práctica también ayuda a mantener la certificación de café orgánico y de comercio justo (Medina-Meléndez *et al.*, 2016).

## **2.2 *Colletotrichum***

Las especies de *Colletotrichum* son patógenos, saprobios y endófitos en una variedad de plantas hospedantes económicamente importantes. *C. gloeosporioides*, es un complejo que consta de 22 especies más una subespecie e incluye *C. asianum*, *C. cordylinicola*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides*, *C. horii*, *C. kahawae subsp. kahawae*, *C. musae*, *C. nupharicola*, *C. psidii*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. tropicale*, *C. xanthorrhoeae*, *C. aenigma*, *C. aeshynomenes*, *C. alatae*, *C. alienum*, *C. aotearoa*, *C. clidemiae*, *C. kahawae subsp. cigarro*, *C. salsolae*, y *C. queenslandicum* (Hassan *et al.*, 2018).

Los hongos del género *Colletotrichum* (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum boninense*) (Silva-Rojas y Ávila-Quezada, 2011), provocan una enfermedad denominada antracnosis, la cual afecta tanto a las plantas como a los frutos (Landro-Valenzuela, 2016). Puede afectar a la planta huésped en cualquier etapa del desarrollo de la planta, causando muerte regresiva y necrosis de hojas y frutos, dando como resultado pérdidas antes y después de la cosecha (Kejela *et al.*, 2017), afectando directamente el rendimiento (Cristóbal-Martínez *et al.*, 2017), según las condiciones climáticas predominantes de la región (Landro-Valenzuela, 2016), ya que es durante la temporada de invierno cuando la enfermedad se ve beneficiada por la presencia de fuertes y prolongadas precipitaciones, junto con altos niveles de humedad relativa. Esto conduce rápidamente a la aparición de brotes epidémicos severos que afectan prácticamente toda la planta en crecimiento (Pérez-Castro *et al.*, 2003). Por lo que resulta fundamental aplicar estrategias de manejo que involucren la utilización de variedades que presenten cierto nivel de tolerancia o resistencia.

La gravedad de la antracnosis, ha resultado en el uso excesivo de fungicidas, lo que ha generado problemas de contaminación ambiental y un incremento en los costos de producción. En ciertas situaciones, incluso se ha llevado al abandono completo del cultivo debido a los fracasos asociados con esta práctica (Pérez-Castro *et al.*, 2003), además, se suma la resistencia desarrollada por los microorganismos patógenos. Así mismo, la utilización de fungicidas se encuentra fuertemente restringida debido a la inquietud por los residuos tóxicos y los riesgos asociados para la salud humana (Landro-Valenzuela, 2016).

En México, existe falta de evidencia científica sustancial en la identificación y caracterización de enfermedades fitopatógenas relacionadas con el cultivo de café. Esta información es fundamental para implementar estrategias de manejo integrado de plagas y enfermedades en este cultivo (Huaman *et al.*, 2021). Por lo que la toma de muestras en las principales zonas productoras de café, es una necesidad existente. De esta manera, será posible manejar las enfermedades del café utilizando opciones respetuosas con el medio ambiente, como los extractos de plantas y los microorganismos como agentes de control biológico (ACB), entre otras alternativas (Landerro-Valenzuela, 2016).

### 2.2.1 Distribución

Debido a que este hongo es cosmopolita, llega a ser un factor limitante importante para la producción de café en algunas áreas (Cao *et al.*, 2019). Se ha investigado la diversidad genética de este hongo en diferentes regiones del mundo, pero en México se desconoce cómo está estructurada su población y los componentes de su diversidad (Montero-Tavera *et al.*, 2010). Sin embargo, *C. gloeosporioides* se ha registrado afectando a una amplia gama de hospederos en todo el mundo, incluyendo al menos 470 géneros de plantas (Domínguez-Guerrero *et al.*, 2012).

### 2.2.2 Morfología

La antracnosis, se distingue por la presencia de lesiones circulares o elipsoidales, hundidas y de tonalidad oscura, con la formación de abundantes esporas que se agrupan en masas compactas de tonalidades salmón, naranja o rosadas (Montero-Tavera *et al.*, 2010). Por otro lado, Tapia-Rodríguez *et al.* (2020), observaron que este organismo fitopatógeno muestra un micelio que puede presentar una gama de colores desde blanco



hasta gris oscuro, y se generan conglomerados de conidios de color salmón con forma cilíndrica o elíptica, con una terminación redondeada en el extremo. Especies como *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* comparten similitudes morfológicas y pueden causar síntomas similares en el mismo huésped, por lo que Barquero-Quirós *et al.* (2013), recomienda que no se debe atribuir ninguna característica morfológica en términos generales, o al menos no se debe identificar aislamientos de *Colletotrichum* sin contar con un aislamiento de referencia que provenga del mismo huésped para realizar comparaciones.

### 2.2.3 Método de infección

La infección del hospedero por *C. gloeosporioides*, se distingue por una rápida división celular seguida por el desarrollo de un solo tubo germinativo, lo que resulta en la formación de apresorios capaces de penetrar la cutícula del hospedero. A continuación, se forman vesículas de infección e hifas primarias que conducen al crecimiento y propagación de hifas secundarias, las cuales provocan la muerte de la célula hospedera (Kejela *et al.*, 2017).

### 2.2.4 Cultivos afectados

La antracnosis es una enfermedad que resulta de la acción de diversas especies pertenecientes al género *Colletotrichum* en diferentes plantas huésped (Barquero-Quirós *et al.*, 2013). Se han realizado varios estudios de cultivos infectados por este patógeno; palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) (Domínguez-Guerrero *et al.*, 2012), pomelo (*Citrus paradisi*) (Cruz-Lagunas *et al.*, 2020), mango (*Mangifera indica* L.) (Carrillo-Fasio *et al.*, 2005), tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) (Delgado-Fernández y Santiago-

Vásquez, 2010), aguacate (*Persea americana*) (Tapia-Rodríguez *et al.*, 2020), maracuyá amarillo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg) (Duearte-Anaruma *et al.*, 2010) papaya (*Carica papaya*) (Barquero-Quirós *et al.*, 2013), entre otros.

### 2.2.5 Control

El uso generalizado de agroquímicos, sin duda ha disminuido el brote de enfermedades fúngicas (Beever *et al.*, 1989). Sin embargo, las regulaciones en materia de higiene y salud, cada vez imponen mayores restricciones en el uso de compuestos químicos, debido a sus efectos tóxicos, la presencia de residuos que pueden afectar al ser humano, aunado a contribuir a la contaminación ambiental y el riesgo de desarrollar patógenos resistentes. Ante este escenario, es necesario buscar alternativas biológicas para combatir los problemas fitopatológicos en los cultivos (Carrillo-Fasio *et al.*, 2005). La utilización de microorganismos como agentes que impiden el desarrollo de microorganismos fitopatógenos, se plantea como una opción para su control (Delgado Fernández y Santiago Vásquez, 2010), por lo tanto, se ha estimulado el uso de métodos naturales y biológicos, en el que destacan aceites esenciales de plantas medicinales (Duearte-Anaruma *et al.*, 2010), y distintas cepas de hongos y bacterias (Delgado Fernández y Santiago Vásquez, 2010; Pyoung *et al.*, 2010).

Huerta-Palacios *et al.* (2009), propone el uso de fungicidas de contacto alternados con sistémicos, por otro lado, Carrillo-Fasio *et al.* (2005) sugiere realizar pruebas utilizando inóculos combinados de hongos antagonistas, evaluar su capacidad de antagonismo en condiciones de campo y en diferentes ambientes, y también investigar el uso de macro y

micronutrientes para mejorar la efectividad del biocontrol (Delgado Fernández y Santiago Vásquez, 2010).

### 2.3 Microorganismos antagónicos

Para el control de antracnosis, usualmente se utilizan productos químicos como el Benlate, Dithane y Daconil. (Canet-Brenes *et al.*, 2016). Sin embargo, el uso continuo puede generar problemas de resistencia y reducción de la microbiota del suelo. Por lo tanto, es necesario explorar opciones amigables con el medio ambiente para combatir esta enfermedad. Entre estas alternativas se encuentran el uso de extractos de plantas, microorganismos como ACB, tratamientos hidrotérmicos, manipulación genética y la estimulación de la resistencia en las plantas (Landeró-Valenzuela, 2016). El control biológico como alternativa para la agricultura moderna, es cada vez más aceptada por los líderes de las cooperativas orgánicas, promoviendo el uso de fungicidas orgánicos (Henderson, 2019). Pues aprovechan la capacidad de algunos microorganismos para controlar poblaciones de vectores en plantas (Vidal-Martínez, 2021). Las comunidades de microorganismos presentes en el suelo son responsables de aproximadamente el 80 al 90% de los procesos biológicos que ocurren en él. Un grupo específico de microorganismos conocidos como microorganismos promotores del crecimiento vegetal (MPCV) desempeñan un papel fundamental al favorecer el crecimiento de las plantas, brindar tolerancia frente al estrés abiótico y biótico, mejorar la nutrición de las plantas y antagonizar a los fitopatógenos en las plantas huésped. Entre los géneros más estudiados de este grupo destaca *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Variovorax*,

*Klebsiella*, *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Serratia*, *Azotobacter* y *Trichoderma* (Cruz-Cárdenas *et al.*, 2021).

Hoy en día, la aplicación de control biológico mediante fertilizantes orgánicos o probióticos que contengan microorganismos antagónicos, es una de las máximas prioridades en la producción orgánica y sostenible (Vu y Tran, 2020). Las propiedades antifúngicas de las especies de *Trichoderma* spp. brindan una alternativa para el manejo biológico de enfermedades causadas por microorganismos fitopatógenos (Savín-Molina *et al.*, 2021).

Actualmente, se ha logrado la implementación de biofertilizantes que contienen microorganismos vivos o inactivos que promueven el crecimiento y aumentan los rendimientos, lo que a su vez resulta en una mayor producción de los cultivos de café (Canseco-Martínez *et al.*, 2020). Sin embargo, el éxito en la adopción de prácticas de agricultura sostenible depende en gran medida de que los productores cuenten con los recursos necesarios para implementarlas de manera adecuada (Cruz-Cárdenas *et al.*, 2021). La evaluación del potencial antagónico en condiciones de laboratorio y en el campo, junto con la caracterización taxonómica de los aislados, es de vital importancia. Esto nos proporciona información sobre los requisitos de crecimiento de cada especie y nos ayuda a establecer criterios de selección para su uso como agentes de biocontrol. Es importante tener en cuenta que no todas las especies tienen la misma capacidad, por lo que es necesario realizar estas evaluaciones para tomar decisiones adecuadas (García-Núñez *et al.*, 2017)

### 2.3.1 Mecanismos de acción

Los ACB no solo brindan beneficios al combatir los patógenos, sino que también tienen un impacto positivo en la germinación, desarrollo y rendimiento de los cultivos. Esto se debe a su capacidad para producir sustancias que estimulan el crecimiento y mejorar la nutrición de las plantas. Las bacterias se destacan por su capacidad de producir metabolitos bioactivos con propiedades antibióticas, lo cual constituye su principal mecanismo de acción. Por otro lado, el micoparasitismo, de algunos hongos como los pertenecientes al género *Trichoderma*, involucra el reconocimiento del huésped, el ataque, la penetración y la muerte, también desempeña un papel importante (Fernández-Larrea, 2001; Vidal-Martínez *et al.*, 2021). Aunado a esto, Bautista-Baños (2006), señala la competencia por espacio, producción de enzimas líticas e inducción de resistencia.

### 2.3.2 Principales microorganismos utilizados

En los últimos 15 años, se ha comprobado que el control biológico mediante el empleo de bacterias, levaduras y hongos como microorganismos es una estrategia altamente efectiva en el manejo de enfermedades (Janisiewicz y Korsten, 2002). Las levaduras son empleadas con mayor frecuencia para controlar las enfermedades, seguido de las bacterias y los hongos (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007). Según Fernández-Larrea (2001), las bacterias pertenecientes al grupo de *Pseudomonas fluorescens* y al género *Bacillus* son reconocidas como altamente eficaces en el control de enfermedades que afectan las hojas y las raíces.

De acuerdo con Stefanova *et al.* (1999), *Trichoderma* ha recibido una mayor atención en el ámbito del control biológico debido a su capacidad para combinar el micoparasitismo

con la producción de metabolitos, lo que le permite controlar una amplia gama de patógenos, además, su capacidad de adaptación, versatilidad y facilidad de manipulación (Fernández-Larrea, 2001), ha permitido la creación de productos biológicos que son respetuosos con el medio ambiente, gracias a su desarrollo y características. (Martínez *et al.*, 2015).

Es crucial adquirir un conocimiento profundo de los mecanismos de acción relacionados con la actividad de biocontrol para garantizar un uso adecuado de este tipo de microorganismos. Esto permitirá desarrollar procesos de aplicación más seguros y proporcionará una base sólida para la selección de cepas nuevas y eficientes (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007).

## **2.4 *Trichoderma***

El género *Trichoderma* incluye a más de 100 especies de hongos (Savín-Molina *et al.*, 2021), al ser cosmopolitas se pueden encontrar en diferentes zonas climáticas de todo el mundo (Herrera-Parra *et al.*, 2017). Las especies de *Trichoderma* son hongos naturales del suelo que colonizan las raíces de las plantas (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009), con diversas aplicaciones biotecnológicas agrícolas, una de las más significativas es la capacidad de detener la formación, desarrollo y germinación de esporas de hongos patógenos (Andrade-Hoyos *et al.*, 2019), a través de varios mecanismos, incluyendo antibiosis, mico parasitismo (Yassin *et al.*, 2022), competencia por espacio y nutrientes (Savín-Molina *et al.*, 2021).

*Trichoderma* spp. es ampliamente reconocido como el ACB más estudiado (Landeró-Valenzuela, 2016). Aunque se ha investigado durante más de 70 años su potencial como agentes antagonistas de hongos fitopatógenos, no fue sino hasta principios del siglo XXI cuando se comenzaron a comercializar como biocontroladores en la agricultura; puesto que el mercado de alimentos exige menor trazas de fungicidas en ellos (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017). En consecuencia, resulta crucial elegir microorganismos nativos que estén adecuadamente adaptados a las características edafoclimáticas específicas de la región en la que se busca llevar a cabo el control biológico de enfermedades en las plantas (Savín-Molina *et al.*, 2021). Al aislar e identificar estos microorganismos en medios de cultivo sintéticos, se tienen en cuenta características macroscópicas como el rápido crecimiento del micelio, la presencia de anillos concéntricos de diferentes tonalidades, así como una alta producción de esporas y, ocasionalmente, la emisión de aromas dulces similares al coco. (López-Calva *et al.*, 2018).

#### 2.4.1 Taxonomía

El género *Trichoderma* fue inicialmente descrito por Persoon (1749). Desde entonces, el número de especies en este género ha experimentado un notable incremento, pasando de nueve a más de 100 especies en los últimos años (Druzhinina *et al.*, 2006).

*Trichoderma* se ubica taxonómicamente según Villegas (2005) en:

Reino: Fungi

División: Mycota

Subdivisión: Eumycota

Clase: Hyphomycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género: *Trichoderma*

Inicialmente, el género *Trichoderma* fue descrito por Persoon y Rifai, basándose en características morfo-fisiológicas, aunque su diferenciación no era completamente satisfactoria. Sin embargo, gracias al avance de las técnicas moleculares, se pudo confirmar la existencia de nuevas especies y realizar su identificación de manera más precisa. En la actualidad, se han notificado un total de 453 especies de *Trichoderma* (Ynfante-Martínez *et al.*, 2023).

#### 2.4.2 Morfología

Los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* producen tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios; estas, son efectivas contra los fitopatógenos en diversas etapas de su ciclo de vida, abarcando desde la germinación hasta la formación de nuevas esporas (Fernández-Larrea, 2001). Todas las especies se caracterizan por tener un rápido crecimiento, circular, uniforme, colonias inicialmente blanquecinas, que se tornan de color verde o azulado; presentando hifas hialinas septadas, conidióforos hialinos en penachos compactados en forma piramidal, fiálides alargadas y ensanchadas en el centro, y conidios ovalados de paredes ligeramente rugosas (Ynfante-Martínez *et al.*, 2023).

#### 2.4.3 Mecanismos de acción

Varias especies pertenecientes a este género se encuentran en asociación con la rizosfera de las plantas o pueden establecer una relación endofítica con ellas, lo que les



permite promover el crecimiento y desarrollo de las plantas (Torres-de la Cruz *et al.*, 2015). Sus mecanismos de acción, incluyen la antibiosis, el micoparasitismo, la competencia por recursos y la producción de metabolitos secundarios (Hernández-Melchor *et al.*, 2019).

Durante el micoparasitismo, las especies de *Trichoderma* muestran un crecimiento quimiotrópico hacia el hospedante, se adhieren y a menudo se enrollan alrededor de las hifas del mismo, y en algunos casos logran penetrarlas. La degradación de las paredes celulares del fitopatógeno se evidencia en fases más avanzadas del proceso parasitario, lo que conlleva a una notable debilidad del organismo afectado (Carsolio *et al.*, 1999). La competencia por espacio y nutrientes es particularmente beneficiosa para los hongos que crecen en la superficie de las hojas antes de penetrar, mientras que no tiene un efecto significativo en aquellos que penetran rápidamente (Fernández-Larrea, 2001).

La comprensión de los mecanismos de acción exhibidos por distintos aislamientos de *Trichoderma*, facilita una selección más precisa de aquellos con mayor potencial para el control de diversos fitopatógenos. Cuanto mayor sea el número de modos de acción presentes en un aislamiento, más efectivo será en el control del fitopatógeno, lo que resultará en un menor daño al cultivo (Infante *et al.*, 2009).

## CAPÍTULO III

### CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS NATIVOS DE *Trichoderma* Y SU POTENCIAL DE BIOCONTROL SOBRE *Colletotrichum* spp. EN CAFÉ ARÁBICO

#### [CHARACTERIZATION OF NATIVE *Trichoderma* ISOLATES AND THEIR BIOCONTROL POTENTIAL AGAINST *Colletotrichum* spp. IN ARABICA COFFEE]

**Abimael Rubio Sosa**<sup>1</sup> TecNM-Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. ITVO. Ex Hacienda de Nazareno Santa Cruz Xoxocotlán, CP 71230, Oaxaca, México; **Misael Martínez Bolaños**, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Km. 18 carretera Tapachula-Cachoatán, Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Tapachula, C.P. 30870, Chiapas, México; **Juan Florencio Gómez-Leyva**, TecNM-Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Km 10 carretera a San Miguel Cuyutlán, CP 45640, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México; **<sup>1</sup>Salvador Lozano Trejo\***, **<sup>1</sup>Ernesto Castañeda Hidalgo**, **<sup>1</sup>Gustavo Omar Díaz Zorrilla**. \*Autor para correspondencia: salvador.lt@voaxaca.tecnm.mx

## Resumen

Se aislaron y caracterizar cepas de *Trichoderma* spp. nativas en cultivos orgánicos de café arábica del estado de Oaxaca y evaluó su potencial de biocontrol contra *Colletotrichum* spp., agente causal de la antracnosis en el cultivo de café. Las características morfológicas de los 12 aislados corresponden al género *Trichoderma* sp lo cual fue corroborado molecularmente mediante secuenciación de la región ITS de RNAr, se identificaron siete especies diferentes: *T. harzianum*, *T. pleuroticola*, *T. sulphureum*, *T. tomentosum*, y *T. koningii* resaltando por su abundancia *T. spirale* y *T. lentiforme*. Se evaluó *T. lentiforme* en su capacidad de inhibición *in vitro* contra cuatro cepas de *Colletotrichum*; dos del estado de Oaxaca y dos del estado de Chiapas de las cuales, *T. lentiforme* fue capaz de inhibir entre un 20 a 80% el crecimiento de *Colletotrichum* sp. Se demostró que los asilamientos nativos de *Trchoderma* sp representan una alternativa en el mantenimiento oportuno para problemas fúngico como la antracnosis en cultivos orgánicos de café.

**Palabras clave:** Antagonista, antracnosis, control biológico, DNAr.

## Abstract

Native strains of *Trichoderma* spp. were isolated and characterized in organic arabica coffee cultivations in the state of Oaxaca and their biocontrol potential against *Colletotrichum* spp. was evaluated against the causal agent of anthracnose in the coffee crop. The morphological characteristics of the 12 isolates correspond to the genus *Trichoderma* sp which was molecularly corroborated by sequencing of the ITS region of rRNA, seven different species were identified: *T. harzianum*, *T. pleuroticola*, *T. sulphureum*, *T. tomentosum*, and *T. koningii* standing out for their abundance *T. spirale* and *T. lentiforme*. *T. lentiforme* was evaluated for its *in vitro* inhibition capacity against four strains of *Colletotrichum*; two from the state of Oaxaca and two from the state of Chiapas, of which *T. lentiforme* was able to inhibit between 20 and 80% of the growth of *Colletotrichum* sp. It was demonstrated that the native *Trichoderma* sp. represent an alternative in the opportune maintenance of fungal problems such as anthracnose in organic coffee crops.

**Keywords:** Antagonist, anthracnose, biological control, phytopathogen.

## 3.1 INTRODUCCIÓN

El café (*Coffea arabica* L.) se cultiva en más de 80 países de América Latina, África y Asia (Coutiño *et al.*, 2017). Se introdujo a México alrededor de 1790 (Medina-Meléndez *et al.*, 2016),

convirtiéndose en una actividad de gran relevancia en términos de producción, valor comercial, económico y social (Santiago-Santiago, 2020). Oaxaca es uno de los principales estados productores de café, y pionero en la producción de café orgánico (Valkila, 2009); por lo que la aplicación de control biológico mediante fertilizantes orgánicos o probióticos que contengan microorganismos antagonistas es una de las máximas prioridades en la producción agrícola limpia y sostenible (Vu y Tran, 2020).

*Trichoderma* es un hongo cosmopolita (Herrera-Parra *et al.*, 2017); el género *Trichoderma* incluye a más de 100 especies (Savín-Molina *et al.*, 2021); algunas de ellas se han estudiado para su uso como agentes de control biológico (BCA) contra patógenos de plantas (Kannangara y Dharmarathna, 2017). La importancia de este género radica en que algunas especies colonizan las raíces (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009), donde compiten por espacio y nutrientes (Savín-Molina *et al.*, 2021), promueven el crecimiento de las plantas e inducen resistencia sistémica (Andrade-Hoyos *et al.*, 2019); además, producen metabolitos secundarios que protegen a las plantas contra hongos fitopatógenos a través de mecanismos que incluyen antibiosis y micoparasitismo (Yassin *et al.*, 2022). Por otro lado, *Colletotrichum*, causante de la antracnosis en café, es considerado un hongo fitopatógeno que produce necrosis foliar y lesiones en los frutos que al desarrollarse causan necrosis del tejido, para finalizar con una momificación general del órgano (Agrios, 1996).

A pesar de que *Trichoderma* se ha evaluado durante más de 70 años como antagonista, su comercialización como biocontrolador agrícola se inició a principios del siglo XXI (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017). Existen estudios donde se ha utilizado como antagonista ante *Colletotrichum* en diferentes cultivos de interés económico; maracuyá (Niño y Mogollón, 2018), mango (Díaz-Medina *et al.*, 2019), fresa (Morales-Mora *et al.*, 2020), entre otros. Sin embargo, no existen estudios en plantaciones de café. Por otro lado, Arias y Heredia (2022), menciona que *Trichoderma* es una opción de control biológico amigable con el ambiente, además de contribuir al mantenimiento de cultivos orgánicos. Por lo que el objetivo del estudio fue caracterizar cepas de *Trichoderma* spp. nativas del estado de Oaxaca y evaluar su potencial de biocontrol contra *Colletotrichum* spp., agente causal de la antracnosis en plantas de café.

## **3.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1 Obtención de aislamientos de *Colletotrichum* y *Trichoderma***

Los aislamientos de *Trichoderma* se obtuvieron de suelos de parcelas de café arábico con manejo orgánico en los municipios San Bartolomé Loxicha, San Agustín Loxicha y el Aguacate Loxicha

del estado de Oaxaca. Los muestreos se realizaron mediante la metodología de cinco de oros para completar una muestra compuesta de 100 g de suelo por sitio de estudio. Las muestras de suelo se procesaron en el laboratorio de fitopatología del Campo Experimental Rosario Izapa (CERI), Chiapas; perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Las cepas aisladas se obtuvieron por el método de dilución de suelo en cajas Petri siguiendo la metodología de Waksman (1927). A partir de una solución madre (10 mL agua destilada estéril: 1 g suelo) se obtuvo la dilución de  $10^{-2}$ , de la cual se tomó una alícuota de 0.1 ml y se depositó uniformemente sobre cajas Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA). Las placas se incubaron a temperatura ambiente (25 °C) por 72 h y posteriormente, se cuantificó el número de colonias formadas. La purificación de cada aislado se realizó por punta de hifa en PDA. Finalmente, se conservaron hasta su proceso de reactivación.

Los aislamientos de *Colletotrichum* se obtuvieron de frutos y hojas de café arábico con síntomas de antracnosis, los cuales mostraban necrosis en sus tejidos. Los muestreos se realizaron en plantaciones comerciales de café arábico orgánico en los estados de Oaxaca (municipio de San Agustín Loxicha) y Chiapas (Municipio de Unión Juárez); las muestras se procesaron en el laboratorio de fitopatología del CERI-INIFAP de la siguiente manera; se cortaron dos piezas del tejido enfermo de cada muestra de aproximadamente 1cm de cada lado. Estas se esterilizaron en NaOCl al 1.5% durante 1 min, luego se enjuagó tres veces en agua destilada estéril para eliminar el agente esterilizante y se secaron en papel previamente esterilizado. Posteriormente se cortó el borde de cada pieza obtenida con un bisturí estéril, para ser colocadas en cajas Petri con PDA. Los aislamientos obtenidos se rotularon para posteriormente ser incubados. Se observaron diariamente hasta emerger hifas fúngicas del tejido necrótico, los bordes en crecimiento de cualquier colonia fúngica se transfirieron luego asépticamente a nuevas placas de PDA, hasta obtener cultivos puros (Cristóbal-Martínez *et al.*, 2017; Hassan *et al.*, 2018; Cao *et al.*, 2019).

Del total de aislamientos obtenidos, para fines del presente estudio se seleccionaron aquellos aislamientos que mostraron mayor grado de severidad en pruebas de patogenicidad, tasa de crecimiento y esporulación.

### **3.2.2 Caracterización macroscópica**

Los aislamientos de *Trichoderma* reactivadas y purificadas, luego del periodo de incubación, se utilizaron para describir las características macroscópicas. Se consideraron características morfológicas macroscópicas como: textura (algodonoso, plano) y color del micelio (blanco, verde),

formación de anillos concéntricos (sin presencia, uno en adelante) (García-Núñez *et al.*, 2016) y el color al reverso de las colonias (hialino, amarillo, café) (López-Calva *et al.*, 2018).

### 3.2.3 Caracterización microscópica

A partir de los aislamientos de *Trichoderma*, una vez que iniciaron su fase esporulativa, con ayuda de un asa bacteriológica, se tomó una pequeña porción de crecimiento miceliar con masa de esporas, se depositó en un portaobjetos con una gota de glicerol y se cubrió con un cubreobjetos. La preparación temporal se observó en un microscopio compuesto (Velab Ve-b2) a 40x; se tomaron fotografías con una cámara digital acoplada al microscopio (QUASAR).

Para la observación de las fiálides, se realizaron microcultivos de acuerdo con el método de Vu y Tran (2020); para ello, en condiciones asépticas, sobre un portaobjetos estéril se colocó un disco (5 mm de diámetro) de medio cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) y con ayuda de una aguja entomológica se tomaron pequeñas masas o conjunto de esporas de las colonias purificadas y se depositaron sobre el portaobjetos; posteriormente se colocó un cubreobjetos estéril y la preparación se colocó dentro de una placa Petri que contenía papel estéril húmedo. Las muestras se incubaron durante 4-5 días. Posteriormente se observaron al microscopio y se tomaron fotografías, con el fin de observar la forma de las estructuras. Para determinar el tamaño de las esporas con el programa AmScope se tomaron fotografías de grupos de esporas por cada aislamiento y de ellos se midió el largo y ancho de 100 esporas; finalmente se obtuvo el promedio de la población evaluada.

### 3.2.4 Tasa de crecimiento

Para la determinación de la tasa de crecimiento (TC), discos de PDA de 5 mm de diámetro conteniendo micelio de cada aislamiento de *Trichoderma* se inocularon en el centro de cajas Petri de 90 mm de diámetro con medio PDA. Se incubaron a 25 °C y se tomaron medidas diametrales cada 24 h hasta que el micelio cubriera por completo la superficie de la caja. Al finalizar el experimento se calculó la TC utilizando la fórmula de Zadoks y Schein (1979).

$$TC = \frac{Cf - Ci}{Tf - Ti}$$

Dónde: Cf= Crecimiento diametral final (mm); Ci= Crecimiento diametral inicial (mm); Tf= Tiempo final (días); Ti= Tiempo inicial (día uno).

### 3.2.5 Identificación molecular

Para la obtención del micelio, los aislamientos se subcultivaron a medio líquido durante siete días (200 g de papa, 20 g de sacarosa, 1000 mL de agua destilada), a temperatura ambiente. El micelio

obtenido de cada aislamiento se lavó con agua destilada estéril y se secó con toallas de papel. La extracción de ADN de los aislamientos de *Trichoderma* spp. se llevaron a cabo en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Jalisco. El micelio recuperado se molió con ayuda de un mortero y nitrógeno líquido, Posteriormente se transfirió a un tubo de centrifuga desechable de 1.5 mL. Se añadió 700  $\mu$ L del Buffer de extracción CTAB (Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 1.4 M, PVP 1%, EDTA 20 mM p<sup>H</sup> 8, LiCl 0.2 %, CTAB 2 %), se mezcló suavemente y se colocó a baño María a 65 °C durante 30 min (agitando por inversión cada 10 min). Posteriormente se enfrió y se le agrego un volumen igual (700  $\mu$ L) de cloroformo. Se mezcló y centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante acuoso a un tubo nuevo (400-600  $\mu$ L) y se agregó la misma cantidad de isopropanol para ser incubado a 20 °C por 30 min. Se centrifugó a 14000 rpm por 5 min y se retiró el sobrenadante cuidadosamente. El pellet de ADN se enjuago con etanol al 70 % y se centrifugo 14000 rpm por 5 min (dos veces). Posteriormente se dejaron los tubos en posición vertical durante el tiempo suficiente para remover cualquier traza de etanol. Finalmente, el ADN se disolvió en 50  $\mu$ L de agua inyectable. La integridad del ADN extraído se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25  $\mu$ L. Se utilizó 50 pM del DNA genómico, Buffer 10X, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTPs, 50 pM de cada uno de los iniciadores (ITS1, ITS4), 1 U de la enzima Taq DNA polimerasa. El programa de amplificación que se utilizó, consistió en 1 ciclo de 6 min a 94 °C y 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72 °C. Por último, se realizó una extensión final de 7 min a 72 °C y se procedió a visualizarla en un gel de agarosa al 1.2 % en una cámara de electroforesis (Bio- Rad®) a 100 volts por 30 min. La purificación de DNA amplificado se llevó a cabo con un kit de purificación de DNA (Zymoclean™), y la secuenciación se llevó a cabo siguiendo la metodología Sanger con la aplicación del BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, en un secuenciador ABI 3130.

### **3.2.6 Análisis bioinformático**

El análisis bioinformático de las secuencias se realizó con el software MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021), las secuencias consenso se alinearon mediante el algoritmo clustal W. Las secuencias consenso obtenidas se analizaron con la herramienta de búsqueda básica de alineamiento local BLASTN, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), y las secuencias con mayor similitud se utilizaron para asignar la identificación de especie a cada cepa aislada. El árbol filogenético se

ensambló empleando el método Bootstrap (1000 repeticiones), con secuencias obtenidas del GenBank y secuencias de identificación molecular referenciadas en el GeneBank de la base de datos del National Center Biotechnology Information (NCBI).

### 3.2.7 Pruebas de antagonismo

Para determinar la capacidad antagónica de los aislamientos, se realizaron pruebas de confrontamientos duales; para ello, se empleó un diseño completamente aleatorizado, se utilizaron tres aislamientos de *Trichoderma*; aislamiento número 13 (T13), aislamiento número 14 (T14) y el aislamiento número 15 (T15), dos aislamientos de *Colletotrichum* provenientes de dos parcelas de Oaxaca, Ana 1 (A1), Zenaida 1 (Z1) y dos cepas de Chiapas (108, 112), cada confrontamiento se repitió tres veces. Estos aislamientos se seleccionaron por presentar mayor TC y mayor esporulación, en el caso de las cepas de *Colletotrichum* también se tomó en cuenta los aislamientos que provocaron mayor severidad en pruebas de patogenicidad. En placas Petri de 90 mm de diámetro con PDA, se colocó un discos de 5 mm de diámetro de *Trichoderma* (previamente crecido en PDA por cinco días) en un extremo de la caja y en el extremo equidistante un disco de micelio (previamente crecido en PDA por cinco días) de 5 mm de diámetro con *Colletotrichum*, para ello se depositaron primero los discos correspondientes a *Colletotrichum* y cuatro días después se depositaron los correspondientes a *Trichoderma*, debido principalmente a la mayor velocidad de crecimiento de *Trichoderma*, las cajas se incubaron a temperatura ambiente (25°C) y se tomaron medidas (crecimiento radial) cada 24 h para posteriormente evaluar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial mediante la fórmula propuesta por Ezziyyani *et al.* (2007), calculado de la

siguiente manera:

$$PICR\% = \left( \frac{R1 - R2}{R1} \right) 100$$

Donde: PICR= porcentaje de inhibición de crecimiento radial; R1= crecimiento radial (mm) del patógeno sin *Trichoderma* spp. R2= crecimiento radial (mm) del patógeno con *Trichoderma* spp.

### 3.2.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos para cada uno de los ensayos se sometieron a un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Dichos datos se analizaron con el paquete estadístico SAS versión 9.0 para Windows. En el caso de la TC los datos obtenidos se transformaron a raíz cuadrada +1.



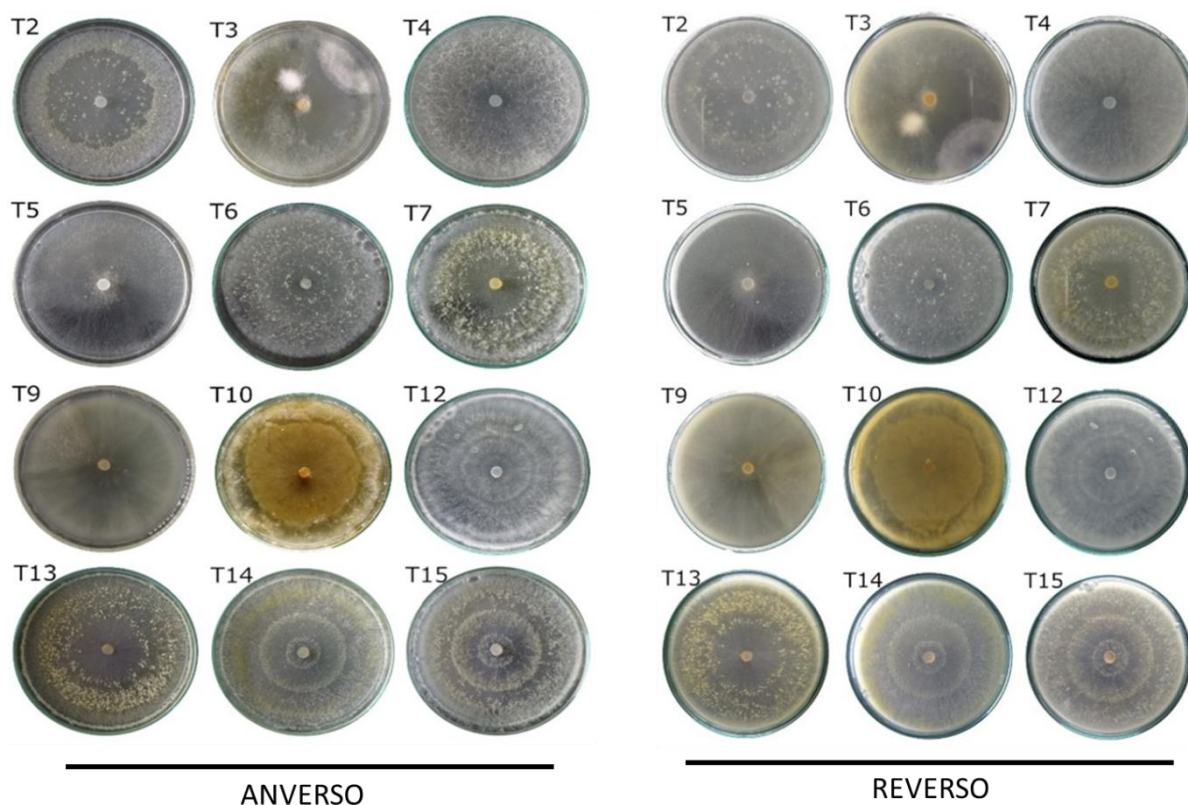
### 3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Caracterización macroscópica.** Se caracterizaron 12 aislamientos de las cuales el 41.6% (T2, T6, T13, T14, T15) presentó una colonia color verde y el 58.4% restante (T3, T4, T5, T7, T9, T10, T12) mostró tonalidad blanca; el 50% (T2, T5, T6, T13, T14, T15) desarrollo micelio plano y 50% (T3, T4, T7, T9, T10, T12) micelio algodonoso; el 50% de los aislamientos (T2, T3, T4, T5, T9, T10) no presentaron anillos concéntricos; 8.4% un anillo concéntrico (T7); 25% dos anillos concéntricos (T6, T12, T13) y el 16.6% restante (T14, T15) presentaron tres anillos. Estas características concuerdan con las presentadas por Granda-Mora *et al.* (2020) en un estudio de aislamientos de microorganismos nativos de *Trichoderma* de cultivos de café.

Por otro lado, Arias y Heredia (2022) menciona que de 438 especies de *Trichoderma* descritas a nivel mundial, 30 han sido registradas asociadas a plantas de café, debido a la heterogeneidad de las características morfológicas, es probable contar con un porcentaje significativo de las especies reportadas. Sin embargo, por la flexibilidad en las características de *Trichoderma*; Hermosa *et al.* (2000) resalta la importancia de realizar estudios moleculares para tener un análisis con mayor certeza taxonómica. Con respecto al color al reverso de las placas, 41.6% de las cepas (T2, T4, T5, T6, T12) presentaron micelio hialino; 33.4% presentaron tonos de color amarillo (T3, T7, T9, T10) y el 25% (T13, T14, T15) tonalidades de color café (Figura 3.1).

La coloración de los aislamientos puede estar influenciada por antraquinonas, los cuales son pigmentos considerados los productos fúngicos naturales más abundantes que dan color a las estructuras de desarrollo (Yu y Keller 2005). Solo el 8.4% de las cepas (T6) presentó aroma intenso a coco, asociada a la presencia de 6-penta-alfa-pirona, la cual ha sido reportada para *T. harzianum* (Rocha-Valdez *et al.*, 2005).

Con respecto a los patógenos los aislamientos Z1 y 112 presentaron colonia color blanco; el aislamiento 108 presento color gris y A1 tuvo color blanco con gris; todos los aislamientos presentaron forma circular; con respecto al micelio se presentó algodonoso en Z1, A1 y 112; y plano en 108; la coloración del micelio fue blanco en Z1 y 112, blanco con gris en A1 y gris en 108.



**Figura 3.1. Caracterización macroscópica de 12 aislamientos de Trichoderma en PDA. T2 (T.pleurotica), T3, T9, T10 (T. spirale), T4, T5 (T. sulphureum), T6 (T. koningii), T7 (T. harzianum), T12 (T. tomentosum), T13, T14, T15 (T. lentiforme).**

**Figure 3.1. Macroscopic characterization of 12 Trichoderma isolates on PDA. T2 (T.pleurotica), T3, T9, T10 (T. spirale), T4, T5 (T. sulphureum), T6 (T. koningii), T7 (T. harzianum), T12 (T. tomentosum), T13, T14, T15 (T. lentiforme).**

**Caracterización microscópica.** De los 12 aislamientos estudiadas, 33.4% (T2, T4, T7, T12) presentaron conidios de forma subglobosa; 25% mostraron forma elipsoidal (T5, T6, T9) y 25% mostraron conidios de forma globosa (T13, T14, T15); solo el 16.6% de las cepas (T3, T10) no presentaron conidios. El tamaño de los conidios oscila entre 7.91-10.21  $\mu\text{m}$  de largo y de 6.65-7.83  $\mu\text{m}$  de ancho (Cuadro 3.1). El color de los conidios observados fueron tonalidades de verde coincidiendo con resultados de García-Núñez *et al.* (2017). Debido a que las cepas se desarrollaron en el mismo ambiente, la cantidad de conidios observada fue homogénea, tal como menciona Osorio-Concepción *et al.* (2013), la forma y cantidad de conidios es estimulada por factores que propician un ambiente de estrés tales como la luz, el pH y la falta de nutrientes; sin embargo, el factor genético es un factor importante a considerar, siendo evidente en las cepas que no

presentaron conidios, tal como menciona Martínez *et al.* (2013) el cual consideró que la relación entre la temperatura y el desarrollo de *Trichoderma* depende de la especie y del propio aislamiento. Por otro lado, Harman (1990), menciona que aislados pertenecientes a la misma especie difieren en la producción de estructuras fúngicas durante la multiplicación, incluso en el mismo medio de cultivo, lo que denotaría la presencia de diferentes subespecies o ecotipos.

Los aislamientos de los patógenos presentaron conidios de forma ovoide con un largo entre 10.3 y 13.3  $\mu\text{m}$  y ancho entre 3.3 y 4.5  $\mu\text{m}$ .

### Cuadro 3.1. Caracterización y tasa de crecimiento de los diferentes aislamientos de *Trichoderma* spp.

**Table 1. Characterization and growth rates of the different isolates of *Trichoderma* spp.**

Cepa de acuerdo a NCBI por RNAr	Conidios			Tasa de crecimiento		
	Forma	Largo ( $\mu\text{m}$ )	Ancho ( $\mu\text{m}$ )			
T4 <i>T. sulphureum</i>	Subglobosa	9.89	7.14	2.95	$\pm$ 0.09	a
T15 <i>T. lentiforme</i>	Globosa	8.64	7.07	2.66	$\pm$ 0.38	a
T5 <i>T. sulphureum</i>	Elipsoidal	9.93	7.51	2.60	$\pm$ 0.30	a
T3 <i>T. spirale</i>	ND	ND	ND	2.51	$\pm$ 0.06	ab
T7 <i>T. harzianum</i>	Subglobosa	8.05	6.69	2.45	$\pm$ 0.06	abc
T13 <i>T. lentiforme</i>	Globosa	7.91	6.71	2.31	$\pm$ 0.01	abcd
T14 <i>T. lentiforme</i>	Globosa	8.22	6.92	2.30	$\pm$ 0.01	abcd
T6 <i>T. koningii</i>	Elipsoidal	9.53	7.83	2.28	$\pm$ 0.06	abcd
T9 <i>T. spirale</i>	Elipsoidal	10.22	6.66	2.23	$\pm$ 0.04	abcd
T2 <i>T. pleuroticola</i>	Subglobosa	9.06	7.72	1.78	$\pm$ 0.01	bcd
T12 <i>T. tomentosum</i>	Subglobosa	9.84	7.5	1.74	$\pm$ 0.01	dc
T10 <i>T. spirale</i>	ND	ND	ND	1.69	$\pm$ 0.02	dc

ND. No determinada

<sup>2</sup>Letras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey  $p \leq 0.05$ . / <sup>2</sup>Different letters represent significant differences between treatments according to Tukey's test  $p \leq 0.05$ .

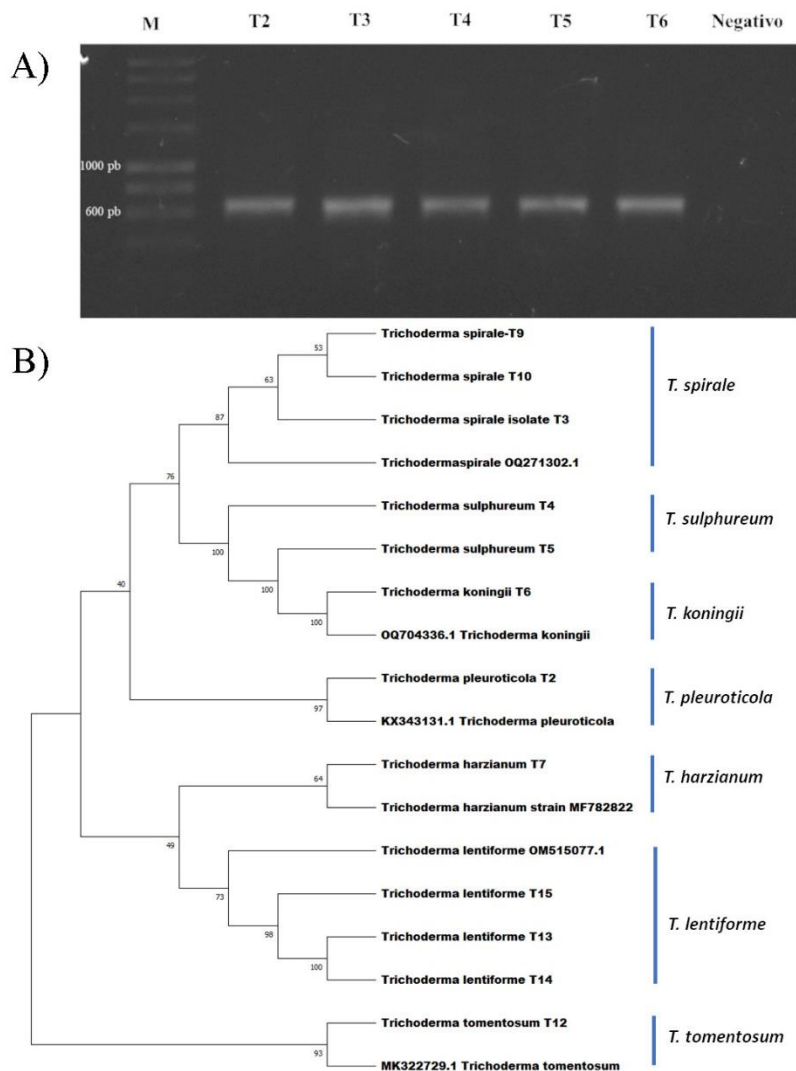
**Tasa de crecimiento.** Los aislamientos T4, T5 y T15 mostraron mayor velocidad de crecimiento significativamente diferentes (Tukey, 0.05) con respecto a los aislamientos T2, T12 y T10. El

aislamiento T4 tuvo un mayor crecimiento diametral con  $1.3 \text{ mm día}^{-1}$  de diferencia con respecto al aislamiento T10 que mostro menor crecimiento diametral del total de los aislamientos (Cuadro 3.1). La mayoría de los aislamientos alcanzo el nivel máximo de la placa Petri de 9 cm de diámetro al cuarto día, excepto T2, T10 y T12 que lo hicieron al quinto día después de la siembra. El crecimiento acelerado es característico de *Trichoderma* spp. lo que le permite competir por espacio y nutrientes (Sánchez *et al.*, 2015). Por lo tanto, la TC es una herramienta fisiológica útil para predecir la habilidad de biocontrol de nuevos aislamientos de *Trichoderma* spp. (Uzunovic y Webber, 1998).

**Identificación molecular.** Para la identificación molecular de *Trichoderma* spp. se realizó el análisis de las secuencias de las regiones ITS1 e ITS2. La Subcomisión Internacional para la Taxonomía de *Trichoderma* e *Hypocrea*, ha estudiado más de 1000 secuencias de ITS1 e ITS2, que representan todas las especies genéticamente conocidas de *Hypocrea/Trichoderma*, demostrando que estas regiones tienen alto valor diagnóstico (Kopchinskiy *et al.*, 2005).

Los productos obtenidos de la amplificación con los iniciadores ITS1 e ITS4 fue de un tamaño de 620 pb (Figura 3.2A), estos productos fueron purificados, secuenciado y mediante el uso de la base de datos GenBank del NCBI demostró que, a través de la región del rDNA en la región ITS amplificada de ADN de las cepas estudiadas, fue factible determinar la identidad que oscilaron entre 99.99 y 98.62 % con las especies identificadas como *Trichoderma harzianum*, *T. spirale*, *T. lentiforme*, *T. pleuroticola*, *T. sulphureum*, *T. tomentosum*, y *T. koningii* en la base de datos. El árbol filogenético (Figura 3.2B) generado por la secuenciación de las especies forma siete grupos donde *T. spirale* y *T. lentiforme* se presentan como especies dominantes. Además del conocimiento de la diversidad de *Trichoderma*, este estudio es de interés por las aplicaciones biotecnológicas que puedan tener las cepas colectadas para el biocontrol de *Colletotrichum* sp.

Los aislamientos caracterizados morfológicamente dentro del género *Colletotrichum* fueron caracterizados molecularmente como *C. gloeosporioides* (Z1), *C. siamense* (108) y *C. aenigma* (112), por otro lado, el aislamiento A1 fue identificada como *Fomitopsis meliae*. A pesar de que existen muy pocos estudios sobre la riqueza de las especies de *Trichoderma* en agroecosistemas cafetaleros, Belayneh-Mulaw *et al* (2010) menciona que las especies de *Trichoderma* mayormente aisladas de plantaciones de café son *T. hamatum*, *T. longibrochiatum* y *T. viride*, *T. koningii*, *T. harzianum*, coincidiendo en este estudio con las últimas dos especies.



**Figura 3.2. A) Productos de amplificación por PCR de la región ITS del rDNA con los oligonucleotidos universales ITS1 e ITS4 de aproximadamente 620 pb. B) Relación filogenética de 15 aislamientos de Trichoderma inferido por análisis de secuencias de ADNr (ITS1, 58S y ITS2).** La filogenia fue inferida por el método Neighbor-Joining, y la distancia evolutiva fue estimada por el método P. distance. Los números en los nodos representan el porcentaje del bootstrapping con 1,000 repeticiones.

**Figure 2. A) PCR amplification products of the ITS region of the rDNA with the universal oligonucleotides ITS1 and ITS4 of approximately 620 bp. B) Phylogenetic relationship of 15 Trichoderma isolates inferred by rDNA sequence analysis (ITS1, 58S and ITS2).** Phylogeny was inferred by the Neighbor-Joining method, and evolutionary distance was estimated by the P. distance method. Numbers at nodes represent the percentage of bootstrapping with 1,000 repeats.

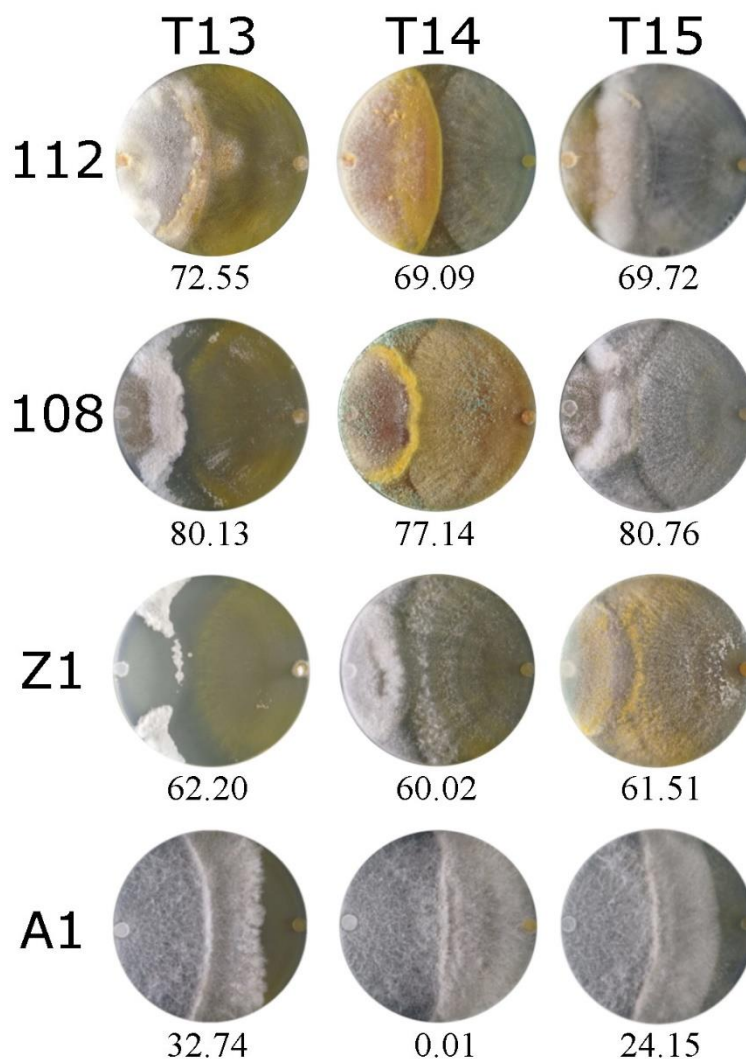
Revilla-Medina *et al* (2020) menciona los diferentes mecanismos de acción de las especies de *Trichoderma*, tales como competencia por el sustrato, micoparasitismo y la antibiosis, evidenciando estas cualidades en *T. harzianum* frente a *Fusarium oxysporum* aislado de café, por otro lado, Rolz Asturias *et al.* (2013), utilizo esta misma especie como inhibidor de crecimiento de *Hemileia vastratix* en condiciones de laboratorio.

Con respecto a *T. spirale*, Baiyee *et al.* (2019), demostraron que el control biológico de esta especie se debe a su competencia por espacio, los antifúngicos volátiles y las actividades enzimáticas. En un estudio reciente, Ye *et al.* (2023) demostraron que un compuesto extraído de *T. spirale*, tiene un fuerte efecto inhibidor sobre *Candida albicans*. Por lo que la función de estos microorganismos no se limita al efecto en la salud y desarrollo de las plantas. *Trichoderma koningii* es una especie que gracias a su versatilidad funciona como biocontrol de fitopatógenos de suelos y foliares, obtenido entre un 70-100% de control bajo condiciones de invernadero Nina *et al.* (2011).

**Pruebas de antagonismo.** La inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum* sp., se observó en su mayoría al cuarto día de incubación; sólo un aislamiento (A1) mostró inhibición al tercer día; estos resultados son similares a los reportados por Fernández y Suárez (2009) para seis aislamientos de *Trichoderma*, que mostraron inhibición del crecimiento micelial del hongo *Fusarium oxysporum* en el día cuatro. La interacción del aislamiento 108 de *Colletotrichum* con los aislamientos T13 y T15 mostraron porcentajes de inhibición significativamente diferentes (Tukey, 0.05) con respecto a los demás confrontamientos. El confrontamiento entre las cepas 108-T15 tuvo un mayor porcentaje de inhibición, con 80.75% de diferencia con respecto al de A1-T14. El micelio de los aislamientos 112, 108 y Z1, se tornó color amarillo al entrar en contacto con los aislamientos de *Trichoderma*, lo cual indica la incompatibilidad que existe entre ellos, igualmente, los aislamientos del antagonista, siguieron creciendo sobre las colonias de los patógenos, mostrando hiperparasitismo, lo cual es un parámetro relevante a considerar al momento de evaluar su potencial en agricultura (Hernández-Mendoza *et al.*, 2011).

Por otro lado, el aislamiento del patógeno A1 no fue inhibida, el crecimiento siguió en aumento hasta cubrir por completo los aislamientos de *Trichoderma* spp. El aislamiento T14 fue el único que esporuló sobre el patógeno de la cepa 108 (Figura 3). Morales-Mora *et al.* (2020) menciona que *Trichoderma* spp. muestra capacidad antagónica *in vitro* ante *Colletotrichum* spp. Tal porcentaje de inhibición, se debe a la producción de metabolitos como quitinasas, glucanasas

(Sánchez-García *et al.*, 2017), y a la secreción de antibióticos u otras sustancias inhibidoras que producen las cepas antagonistas (Al-Mekhlafi *et al.*, 2019).



**Figura 3.3. Confrontamiento dual entre cepas de *Trichoderma* spp. (T13, T14, T15) y cepas de *Colletotrichum* spp. (A1, Z1, 108, 112). Números debajo de los aislamientos representa el PICR.**

**Figure 3.3. Dual confrontation between strains of *Trichoderma* spp. (T13, T14, T15) and strains of *Colletotrichum* spp. (A1, Z1, 108, 112). Numbers below the isolates represent the PICR.**

### 3.4 CONCLUSIONES

Se identificaron siete especies de *Trichoderma*: *T. harzianum*, *T. spirale*, *T. lentiforme*, *T. pleuroticola*, *T. sulphureum*, *T. tomentosum*, y *T. koningii*. Lo cual, aporta al conocimiento sobre la diversidad de microorganismos nativos de la región cafetalera del estado de Oaxaca. Además, esta comprensión más profunda, contribuirá a enriquecer el conocimiento y a elegir dichas especies para futuros estudios en el biocontrol de fitopatógenos con el fin de promover prácticas agrícolas sostenibles.

### 3.5 LITERATURA CITADA

- Agrios G. 1996. Fitopatología. Segunda Edición. Academic Press. México. C.A. 838 p
- Al-Mekhlafi NA, Y-Abdullah Q, Al-Helali MF and Alghalibi SM. 2019. Antagonistic Potential of Native *Trichoderma* species against Tomato Fungal Pathogens in Yemen. International Journal of Molecular Microbiology 2(1): 1-10. <https://psmjournals.org/index.php/ijmm/article/view/296/232>
- Andrade-Hoyos P, Luna-Cruz A, Osorio-Hernández E., Molina-Gayosso E, Landero-Valenzuela N y Barrales-Cureño HJ. 2019. Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de chile. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 10(6): 1259-1272. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>
- Arias R y Heredia. 2022. El género *Trichoderma* en fincas de café con diferente tipo de manejo y estructura vegetal en el centro del estado de Veracruz, México. Revista Alianzas y Tendencias BUAP 7(25):1-20. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/15597>
- Baiyee B, Pornsuriya C, Ito SI and Sunpapao A. 2019. *Trichoderma spirale* T76-1 displays biocontrol activity against leaf spot on lettuce (*Lactuca sativa* L.) caused by *Corynespora cassiicola* or *Curvularia aerea*. Biological control. 129:195-200. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.10.018>
- Belayneh-Mulaw T, Kubicek CP and Druzhinina IS. 2010. The Rhizosphere of *Coffea arabica* in its native highland forests of Ethiopia provides a niche for a distinguished diversity of *Trichoderma*. Diver. 2: 527–549. <https://doi.org/10.3390/d2040527>
- Cao XR, Xu XM, Che HY, West JS and Luo DQ. 2019. Characteristics and distribution of *Colletotrichum* species in coffee plantations in Hainan, China. Plant Pathology 68 1146–1156. <https://doi.org/10.1111/ppa.13028>
- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Cortés-Penagos C. and López-Bucio J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes



- lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 149(3): 1579-1592. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130369>
- Coutiño PV, Santoyo CVH, Flores VJJ y Muñoz RM. 2017. Análisis comparativo de dos organizaciones de pequeños productores de café de Oaxaca, México. *Turismo, Economía y Negocios*. 3(2):41-57. <http://transitare.anahuacoaxaca.edu.mx/index.php/Transitare/article/view/55>
- Cristóbal-Martínez AL, Yáñez-Morales M de J, Solano-Vidal R, Segura-León O and Hernández-Anguiano AM. 2017. Diversity of *Colletotrichum* species in coffee (*Coffea arabica*) plantations in Mexico. *European Journal of Plant Pathology* 147(3): 605-614. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1029-0>
- Díaz-Medina AR, Arboleda-Zapata T y Ríos-Osorio LA. 2019. Estrategias de control biológico utilizadas para el manejo de la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de mango: una revisión sistemática. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 22: 595-611. [https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/29529/1/DiazAna\\_2019\\_ControlBiologico.pdf](https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/29529/1/DiazAna_2019_ControlBiologico.pdf)
- Ezziyyani M, Requena ME, Egea-Gilabert C and Candela ME. 2007. Biological Control of *Phytophthora* Root Rot of Pepper Using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in Combination. *Journal of Phytopathology* 155(6): 342-349. Doi:10.1111/j.1439-0434.2007.01237.x
- Fernández R y Suárez. 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. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v62n1/a01v62n1.pdf>
- García-Núñez HG, Martínez-Campos AR, Hermosa-Prieto MR, Monte-Vázquez E, Aguilar-Ortigoza CJ y González-Esquivel CE. 2017. Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma* y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora infestans*. *Revista mexicana de fitopatología* 35(1): 58-79. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1605-4>
- Granda-Mora KI, Araujo-Abad S, Collahuazo-Reinoso Y, López-Salas Y, Jaen-Rigaud X, Robles-Carrión A y Urgiles-Gómez N. 2020. Caracterización morfológica y fisiológica de

- microorganismos rizosféricos nativos de sistemas agroforestales de café. *Bosques Latitud Cero* 10(2):124-136. <https://orcid.org/0000-0001-5220-373X>
- Harman GE. 1990. *Developments Tactics for Biological Agent in Plant Pathology. New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pest and Diseases*. 779-792.
- Hassan O, Jeon JY, Chang T, Shin JS, Oh NK and Lee YS. 2018. Molecular and morphological characterization of *Colletotrichum* species in the *Colletotrichum gloeosporioides* complex associated with persimmon anthracnose in South Korea. *Plant disease* 102(5): 1015-1024. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1564-RE>
- Hermosa MR, Grondona I, Iturriaga EA, Diaz-Minguez JM, Castro C, Monte E and Garcia-Acha I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 66(5): 1890-1898. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.1890-1898.2000>
- Hernández-Mendoza JL, Sánchez-Pérez MI, García-Olivares JG, Mayek-Pérez N and González-Prieto JM. 2011. Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma* spp. nativos del noreste de México. *Revista colombiana de Biotecnología* 13(2): 176-185. <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v13n2/v13n2a17.pdf>
- Herrera-Parra EJ, Cristóbal-Alejo J and Ramos-Zapata JA. 2017. *Trichoderma* strains as growth promoters in *Capsicum annuum* and as biocontrol agents in *Meloidogyne incognita*. *Chilean journal of agricultural research* 77(4): 318-324. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392017000400318>
- Kannangara S and Dharmarathna RMGCS. 2017. Isolation, identification and characterization of *Trichoderma* species as a potential biocontrol agent against *Ceratocystis paradoxa*. *The Journal of Agricultural Sciences* 12 (1): 51-62. <http://repo.lib.sab.ac.lk:8080/xmlui/handle/123456789/987>
- Kopchinskiy A, Komon M, Kubicek C, Druzhinina I (2005) TrichoBLAST: A multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. *Mycological Research*. 109: 657-660. <https://doi.org/10.1017/S0953756205233397>
- López-Calva, V.L., M. Villa-García, A. Quezada-Salinas, A. Mendoza-Mendoza, M. A. Anducho-Reyes. 2018. El género *Trichoderma* una herramienta agrobiotecnológica. *Ciencias Biológicas y de la Salud* 2(1): 1-11.

[https://www.ecorfan.org/proceedings/PCBS\\_TII/Ciencias\\_Biologicas\\_y\\_de\\_la\\_Salud\\_TII\\_1.pdf](https://www.ecorfan.org/proceedings/PCBS_TII/Ciencias_Biologicas_y_de_la_Salud_TII_1.pdf)

- Martínez B, Infante D y Reyes Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Revista de Protección Vegetal 28(1): 1-11. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n1/rpv01113.pdf>
- Medina-Meléndez JA, Ruiz-Nájera RE, Gómez-Castañeda JC, Sánchez-Yáñez JM, Gómez-Alfaro G y Pinto-Molina O. 2016. Estudio del sistema de producción de café (*Coffea arabica* L.) en la región Frailesca, Chiapas. Ciencia UAT 10(2): 33-43. <https://www.scielo.org.mx/pdf/cuat/v10n2/2007-7858-cuat-10-02-00033.pdf>
- Morales-Mora LA, Andrade-Hoyos P, Valencia-de Ita MA, Romero-Arenas O, Silva-Rojas HV and Contreras-Paredes CA. 2020. Caracterización de hongos asociados al cultivo de fresa y efecto antagonista *in vitro* de *Trichoderma harzianum*. Revista mexicana de fitopatología 38(3): 434-449. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2005-7>
- Nina R, Smeltekop H, Almanza JC and Loza-Murguía 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. <http://www.scielo.org.bo/pdf/jsars/v2n1/a06.pdf>
- Niño F y Mogollón Á. 2018. Alternativas para el control de antracnosis (*Colletotrichum* spp.) en maracuyá (*Passiflora edulis*). Revista Sistemas de Producción Agroecológicos 9(2): 2-17. <https://doi.org/10.22579/22484817.714>
- Osorio-Concepción M, Casas-Flores S y Cortés-Penagos C. 2013. Efecto de la limitación de fosfato sobre la conidiación de *Trichoderma atroviride* y mutantes ciegas a la luz. Revista Mexicana de Micología 37:41-50. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v37/v37a6.pdf>
- Pineda-Insuasti JA, Benavides-Sotelo EN, Duarte-Trujillo AS, Burgos-Rada CA, Soto-Arroyave CP, Burgos-Rada CA, Pineda-Soto CA, Fierro-Ramos FJ, Mora-Muñoz ES y Álvarez-Ramos SE. 2017. Producción de biopreparados de *Trichoderma* spp: una revisión. ICIDCA Sobre los derivados de la caña de azúcar 51(1): 47-52. <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223153894008.pdf>
- Revilla-Medina R, Vuelta-Lorenzo DR y Guerrero-Barriel D. 2020. Efecto *in vitro* de extractos vegetales y *Trichoderma harzianum* en el control de *Fusarium oxysporum* aislado de vivero

- de café (*Coffea arabica*). Ciencia en su PC. 1(2):48-65.  
<https://www.redalyc.org/journal/1813/181363909004/181363909004.pdf>
- Rocha-Valdez J, Hassan M, Corkidi G, Flores C, Galindo E and Serrano-Carreón L. 2005. 6 pentyl  $\alpha$  pyrone production by *Trichoderma harzianum*: The influence of energy dissipation rate and its implications on fungal physiology. Biotechnology and Bioengineering 91(1):54–61.  
<https://doi.org/10.1002/bit.20489>
- Sánchez A, Barrera V, Reybet G y Sosa MC. 2015. Biocontrol con *Trichoderma* spp. de *Fusarium oxysporum* causal del “mal de almácigos” en pre y post emergencia en cebolla. Revista de la Facultad de Agronomía. 114 (1): 61-70.  
<http://revista.agro.unlp.edu.ar/index.php/revagro/article/view/396>
- Rolz Asturias CE, De León Fajardo LR and Paniagua O. 2013. Evidencia de un antagonismo in vitro de especies de *Trichoderma* contra *Hemileia vastatrix* (roya del café).
- Sánchez-García BM, Espinosa-Huerta E, Villordo-Pineda E, Rodríguez-Guerra R, Mora-Avilés MA. 2017. Identificación molecular y evaluación antagónica in vitro de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. montcalm. Agrociencia 51: 63-79. <https://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v51n1/1405-3195-agro-51-01-00063.pdf>
- Santiago-Santiago AK, Arana-Coronado OA, Brambila-Paz, JJ, Matus-Gardea JA y Sosa-Montes M. 2020. Evaluación financiera con metodología de opciones reales de inversión para producción y venta de café orgánico. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 11(3): 493-505. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i3.1877>
- Savín-Molina, J., L. G. Hernández-Montiel, W. Ceiro-Catasú, G. D. Ávila-Quezada, A. Palacios-Espinosa, F. H. Ruiz-Espinoza and M. Romero-Bastidas. 2021. Caracterización morfológica y potencial de biocontrol de especies de *Trichoderma* aisladas de suelos del semiárido. Revista Mexicana de Fitopatología 39(3): 435-451.  
<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2106-7>
- Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S., 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Molecular biology and evolution, 38(7), pp.3022–3027.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

- Uzunovic A and Webber JF. 1998. Comparison of bluestain fungi grown in vitro and in freshly cut pine billets. *European Journal of Forest Pathology* 28: 323–334. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1998.tb01187.x>
- Valkila J. 2009. Fair Trade organic coffee production in Nicaragua-Sustainable development or a poverty trap? *Ecological Economics* 68(12): 3018-3025. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2009.07.002>
- Vu XT and Tran VT. 2020. Isolation and Characterization of *Trichoderma* Strains Antagonistic Against Pathogenic Fungi on Orange Crops. *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology* 36(3): <https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5086>
- Waksman SA. 1927. Principles of soil microbiology. Baltimore MD, USA: The Williams and Wilkins Company. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19321101008>
- Yassin MT, Mostafa AA and Al-Askar AA. 2022. *In vitro* antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against fungal pathogens causing black point disease of wheat. *Journal of Taibah University for Science* 16(1):57-65. <https://doi.org/10.1080/16583655.2022.2029327>
- Ye W, Chen Y, Zhang W, Liu T, Liu Y, Li M, Li S, Xu L and Liu H. 2023. Potential Anti-*Candida albicans* Mechanism of *Trichoderma* Acid from *Trichoderma spirale*. *International Journal of Molecular Sciences*. 24(6):5445. <https://doi.org/10.3390/ijms24065445>
- Yu JH. and Keller N. 2005. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology* 43: 437–458. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140214>
- Zadoks JC and Schein RD. 1979. *Epidemiology and Plant Disease Management*. New York, United States. Oxford University Press. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19801361394>.

## **CAPÍTULO IV**

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y PATOGENICA DE *Colletotrichum* sp.**

**COMO AGENTE CAUSAL DE ANTRACNOSIS EN CAFÉ**

**[MORPHOLOGICAL AND PATHOGENIC CHARACTERIZATION OF *Colletotrichum***

**sp. AS A CAUSAL AGENT OF ANTHRACNOSE IN COFFEE]**

Abimael Rubio Sosa<sup>1\*</sup>, Salvador Lozano Trejo<sup>2</sup>, Misael Martínez Bolaños<sup>3</sup>, Ernesto Castañeda Hidalgo<sup>2</sup>, Juan Florencio Gómez Leyva<sup>4</sup>, Gustavo Omar Diaz Zorrilla<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudiante del Programa de Maestría en Ciencias en Productividad en Agroecosistemas. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Tecnológico Nacional de México. <sup>2</sup>Profesores investigadores del Programa de Maestría en Ciencias en Productividad en Agroecosistemas. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Tecnológico Nacional de México. Ex Hacienda de Nazareno, Santa Cruz Xoxocotlán, CP 71230 Oaxaca, México. <sup>3</sup>Investigador en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Km. 18 carretera Tapachula-Cachoatán, Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Tapachula, CP 30870, Chiapas, México. Profesor. <sup>4</sup>Profesor investigador en el Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Km 10 carr Tlajomulco, Cto. Metropolitano Sur, 45640 Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco.

\*Autor por correspondencia: [abruso48@gmail.com](mailto:abruso48@gmail.com)

## RESUMEN

El género *Colletotrichum* incluye algunas especies patógenas de amplio espectro que causan la enfermedad conocida como antracnosis. Esta enfermedad afecta a diversos cultivos, provocando pérdidas significativas tanto en la calidad como en la cantidad de la producción, ya que afecta hojas, ramas y frutos. Para controlar esta enfermedad, es necesario comprender la sintomatología y las características del agente causante. Por lo tanto, este estudio se centró en caracterizar morfológica, patogénica y molecularmente aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de cultivos orgánicos de café en los estados de Oaxaca y Chiapas. Se analizaron un total de cinco aislamientos de Oaxaca y seis de Chiapas, utilizando métodos que incluyeron la observación de la morfología de las colonias, pruebas de patogenicidad y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los resultados revelaron variabilidad morfológica y diferencias significativas en el crecimiento de los aislamientos según su origen geográfico. Además, todos los aislamientos mostraron virulencia en las pruebas de patogenicidad, y el análisis molecular permitió identificar la presencia de tres especies distintas, *C. siamense*, *C. aenigma*, destacando *C. gloeosporioides*.

**Palabras clave:** *Colletotrichum*, Fitopatógeno, Necrosis, Virulencia.

## SUMMARY

The genus *Colletotrichum* includes some broad-spectrum pathogenic species that cause the disease known as anthracnose. This disease affects various crops, causing significant losses in both the quality and quantity of production, since it affects leaves, branches and fruits. To control this disease, it is necessary to understand the symptoms and the characteristics of the causative agent. Therefore, this study focused on characterizing morphologically, pathogenically, and molecularly isolates of *Colletotrichum* spp. obtained from organic coffee crops in the states of Oaxaca and Chiapas. A total of five isolates from

Oaxaca and six from Chiapas were analyzed using methods that included observation of colony morphology, pathogenicity tests, and polymerase chain reaction (PCR). The results revealed morphological variability and significant differences in the growth of the isolates according to their geographical origin. In addition, all the isolates showed virulence in the pathogenicity tests, and the molecular analysis allowed to identify the presence of three different species, *C. siamense*, *C. aenigma*, highlighting *C. gloeosporioides*.

**Keywords:** *Colletotrichum*, Phytopathogen, Necrosis, Virulence.

#### 4.1 INTRODUCCIÓN

El café es una de las bebidas más consumidas en todo el mundo. Se cultiva principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, especialmente en África, Asia y América Latina (Machenahalli et al., 2021). No obstante, los cafetales enfrentan una amenaza constante de problemas fitopatológicos, muchos de los cuales tienen el potencial de convertirse en desafíos fundamentales en el futuro, tales como; el ojo de gallo *Mycena citricolor*, mal de hilachas *Pellicularia koleroga*, antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides* (Huaman et al., 2021). Las enfermedades causadas por especies de *Colletotrichum* spp. son especialmente importantes ya que afectan directamente el rendimiento (Cristóbal-Martínez et al., 2017). Las especies de *Colletotrichum* son patógenos, saprobios y endófitos en una variedad de plantas hospedantes económicamente importantes.

Debido a que este hongo es cosmopolita, llega a ser un factor limitante importante para la producción de café en algunas áreas (Cao et al., 2019). *C. gloeosporioides* es un complejo que consta de 22 especies más una subespecie e incluye *C. asianum*, *C. cordylinicola*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides*, *C. horii*, *C. kahawae* subsp. *kahawae*, *C. musae*, *C. nupharicola*, *C. psidii*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. tropicale*, *C. xanthorrhoeae*, *C. aenigma*, *C. aeshynomenes*, *C. alatae*, *C. alienum*, *C. aotearoa*, *C.*



*clidemiae*, *C. kahawae* subsp. *cigarro*, *C. salsolae*, y *C. queenslandicum* (Hassan *et al.*, 2018). *C. gloeosporioides* puede afectar a la planta huésped en cualquier etapa del desarrollo de la planta, causando muerte regresiva y necrosis de hojas y frutos, dando como resultado pérdidas antes y después de la cosecha.

La infección del huésped por *C. gloeosporioides* se caracteriza por una rápida división celular seguida del crecimiento de un único tubo germinativo, lo que resulta en la formación de apresorios capaces de penetrar la cutícula del huésped. Una vez dentro, se forman vesículas de infección e hifas primarias que dan lugar al desarrollo y la propagación de hifas secundarias, las cuales causan la muerte de la célula huésped (Kejela *et al.*, 2017). La enfermedad se ve favorecida durante los periodos de invierno por lluvias intensas y fuertes con alta humedad relativa, ocasionando en muy poco tiempo brotes epidémicos severos que comprometen casi toda la planta en desarrollo (Pérez-Castro *et al.*, 2003).

La gravedad de la antracnosis ha llevado a un uso excesivo de fungicidas, lo que ha resultado en contaminación ambiental, un aumento en los costos de producción y, en algunos casos, el abandono completo del cultivo debido al fracaso de esta estrategia (Pérez-Castro *et al.*, 2003). A pesar del crecimiento de la producción de café en México, existe una falta de evidencia científica suficiente en la identificación y caracterización de enfermedades fitopatógenas relacionadas con el cultivo del café. Esta información es fundamental para implementar estrategias de manejo integrado de plagas y enfermedades en este cultivo (Huaman *et al.*, 2021), que podría contribuir al desarrollo de cafetales más sanos, productivos y de mejor calidad en taza.

## **4.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1 Muestreo**

Se realizaron muestreos dirigidos recolectando hojas, frutos y tallos con síntomas típicos de antracnosis en dos fincas de café en San Agustín Loxicha a 1600-1800 m.s.n.m. Las plantaciones se cultivan orgánicamente con plantas de café arábico. Las muestras se guardaron en bolsas de papel debidamente etiquetadas, para posteriormente ser transportadas al laboratorio de Fitopatología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Rosario Izapa, Chiapas, donde fueron procesada.

### **4.2.2 Aislamiento**

Se cortaron dos piezas cuadrangulares del tejido enfermo de cada muestra (1cm de cada lado). Estas se esterilizaron en NaOCl al 1.5% durante 1 minuto, luego se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril para eliminar el agente esterilizante y se secaron en papel previamente esterilizado. Posteriormente se cortó el borde de cada pieza obtenida con un bisturí estéril, para ser colocadas en cajas Petri con medio de cultivo agar dextrosa papa (PDA). Los aislamientos obtenidos se rotularon para posteriormente ser incubados. Se observaron diariamente hasta emerger hifas fúngicas del tejido necrótico, los bordes en crecimiento de cualquier colonia fúngica se transfirieron luego asépticamente a nuevas placas de PDA, hasta obtener cultivos puros y se agruparán según las observaciones morfológicas (Cao *et al.*, 2019; Cristóbal-Martínez *et al.*, 2017; Hassan *et al.*, 2018).

### **4.2.3 Caracterización macroscópica**

Para observar la morfología de la colonia y determinar la tasa de crecimiento del micelio, se extrajeron discos de micelio (5 mm de diámetro) del borde en crecimiento de los cultivos purificados y se colocaron en una placa de PDA. Las placas se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad. Las características de la colonia (color, tamaño y textura) se observaron después de colonizadas las placas Petri, el diámetro

de la colonia se registró diariamente, con tres cultivos replicados de cada aislado y dos mediciones por réplica. El crecimiento micelial se registró diariamente, midiendo el diámetro de la colonia en dos ejes perpendiculares hasta que el micelio de al menos uno de los tratamientos alcanzo el borde de la placa (Hassan *et al.*, 2018; Huaman *et al.*, 2021; Oliveira-Coqueiro *et al.*, 2018).

Fidelis-Pereira *et al.* (2019) recomienda la siguiente fórmula para estimar la tasa de crecimiento micelial.

$$IMGR = \frac{\sum ((D_c - D_p))}{N}$$

En donde  $D_c$  es la medida del diámetro de la colonia actual en mm,  $D_p$  es la medida del diámetro de la colonia anterior en mm, y  $N$  es el número de días después de la inoculación.

#### 4.2.4 Caracterización microscópica

Se realizaron micro cultivos para obtener estructuras microscópicas de cada aislamiento. Todos los cultivos fueron incubados a 25°C en una cámara húmeda durante 3 días. Después de este período, se examinaron las características microscópicas, como conidióforos, conidios, apresorios y clamidosporas, utilizando un microscopio. Estas características también se documentaron mediante la digitalización de imágenes (Huaman *et al.*, 2021).

#### 4.2.5 Identificación molecular

Para la obtención del micelio, los aislamientos se subcultivaron a medio líquido durante siete días (200 g de papa, 20 g de sacarosa, 1000 mL de agua destilada), a temperatura ambiente. El micelio obtenido de cada aislamiento se lavó con agua destilada estéril y se secó con toallas de papel. La extracción de ADN de los aislamientos de *Colletotrichum* spp. se llevaron a cabo en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Jalisco. El micelio recuperado se molió con ayuda de un mortero y nitrógeno líquido, posteriormente se transfirió a un tubo de centrifuga desechable de 1.5 mL. Se añadió 700 µL del Buffer de extracción CTAB (Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 1.4 M, PVP 1%, EDTA 20 mM p<sup>H</sup> 8, LiCl 0.2 %, CTAB 2 %), se mezcló suavemente y se colocó a baño María a 65 °C durante 30 min (agitando por inversión cada 10 min). Posteriormente se enfrió y se le agrego un volumen

igual (700  $\mu\text{L}$ ) de cloroformo. Se mezcló y centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante acuoso a un tubo nuevo (400-600  $\mu\text{L}$ ) y se agregó la misma cantidad de isopropanol para ser incubado a 20 °C por 30 min. Se centrifugó a 14000 rpm por 5 min y se retiró el sobrenadante cuidadosamente. El pellet de ADN se enjuagó con etanol al 70 % y se centrifugó a 14000 rpm por 5 min (dos veces). Posteriormente se dejaron los tubos en posición vertical durante el tiempo suficiente para remover cualquier traza de etanol. Finalmente, el ADN se disolvió en 50  $\mu\text{L}$  de agua inyectable. La integridad del ADN extraído se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . Se utilizó 50 pM del DNA genómico, Buffer 10X, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2mM dNTPs, 50 pM de cada uno de los iniciadores (ITS1, ITS4), 1 U de la enzima Taq DNA polimerasa. El programa de amplificación que se utilizó, consistió en 1 ciclo de 6 min a 94 °C y 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72 °C. Por último, se realizó una extensión final de 7 min a 72 °C y se procedió a visualizarla en un gel de agarosa al 1.2 % en una cámara de electroforesis (Bio- Rad®) a 100 volts por 30 min. La purificación de DNA amplificado se llevó a cabo con un kit de purificación de DNA (Zymoclean™), y la secuenciación se llevó a cabo siguiendo la metodología Sanger con la aplicación del BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, en un secuenciador ABI 3130.

#### **4.2.6 Análisis bioinformático**

El análisis bioinformático de las secuencias se realizó con el software MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021), las secuencias consenso se alinearon mediante el algoritmo clustal W. Las secuencias consenso obtenidas se analizaron con la herramienta de búsqueda básica de alineamiento local BLASTN, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), y las secuencias con mayor similitud se utilizaron para asignar la identificación de especie a cada cepa aislada. El árbol filogenético se ensambló empleando el método

Bootstrap (1000 repeticiones), con secuencias obtenidas del GenBank y secuencias de identificación molecular referenciadas en el GeneBank de la base de datos del National Center Biotechnology Information (NCBI).

#### **4.2.7 Pruebas de patogenicidad**

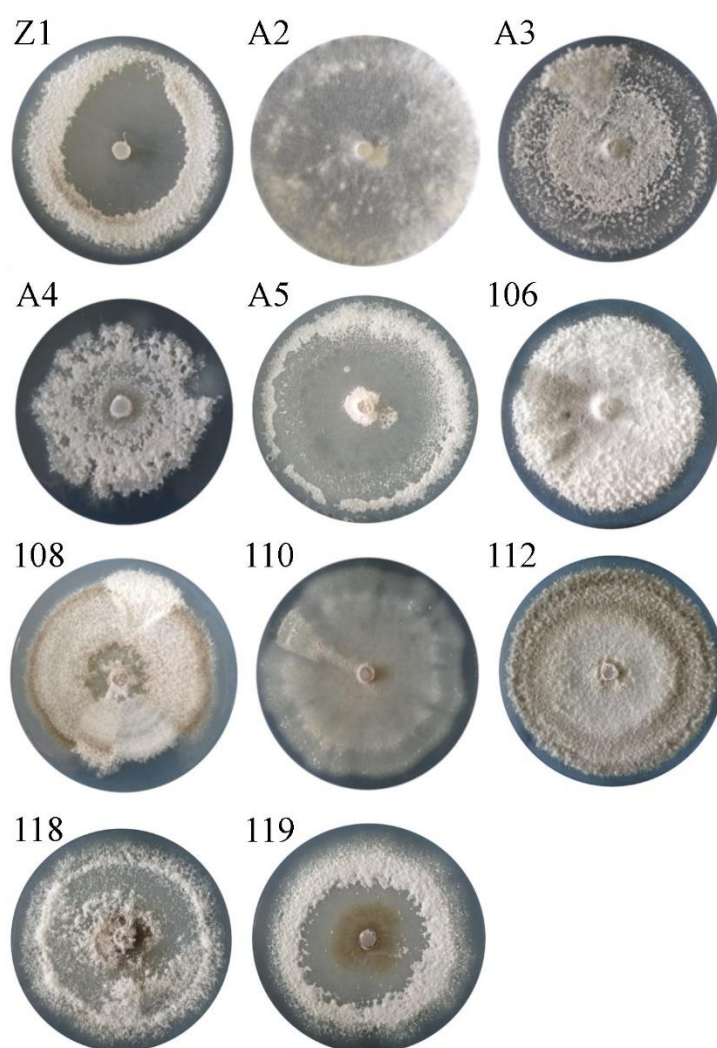
Se utilizaron 5 cepas de *Colletotrichum* aisladas del estado de Oaxaca y 6 cepas obtenidas del cepario del laboratorio de fitopatología del INIFAP, Campo Experimental Rosario Izapa, Chiapas, y frutos de café arábico. Para esto se lavaron los frutos con hipoclorito al 0.5% por un minuto y enjuagado tres veces con agua destilada estéril, se dejaron secar sobre toallas de papel estériles; posteriormente los frutos se hirieron con una aguja estéril, y se inocularon discos de medio PDA colonizado con el patógeno aleatoriamente con tres frutos para cada aislamiento y cuatro repeticiones, para el control positivo se utilizó una cepa de *Colletotrichum* (6504) tomada de dicho cepario y para el control negativo solo se utilizaron discos de agua agar. Los frutos se colocaron en cámaras húmedas, a las 48 horas se retiraron los discos de PDA y se tomaron datos del crecimiento de las lesiones, esto se hizo durante 11 días cada 24 horas. Finalmente se hicieron aislamientos de cada lesión como se describió anteriormente para cumplir con el postulado de Koch (Cao *et al.*, 2019; Cristóbal-Martínez *et al.*, 2017; Pérez-Castro *et al.*, 2003).

### **4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **Caracterización macroscópica**

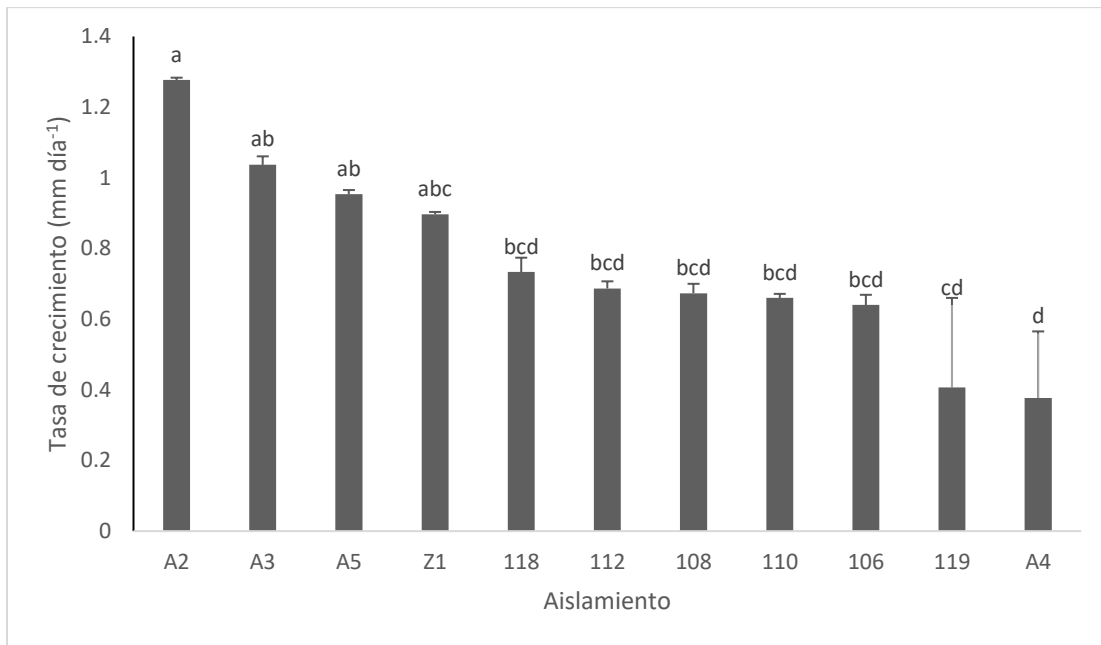
Se caracterizaron 11 aislamientos de las cuales el 63.6 % (Z1, A2, A3, 106, 110, 112, 118) presento colonia color blanca, las siguientes tonalidades observadas fueron representadas por un solo aislamiento, representando 9.1 %; color gris (108); gris verdoso (119), centro blanco con contorno gris (A5) y blanco con centro gris (A4). La colonia tuvo dos formas; circular, representando el 63.6 % (Z1, A5, 108, 110, 112, 118, 119), y forma irregular el 36.4 % (A2, A3, A4, 106). El micelio presento aspecto algodonoso

en 45.4 % (Z1, A2, 106, 112, 118) de los aislamientos; algodonoso disperso en 36.4 % (A3, A4, A5, 119) y micelio plano representando el 18.2 % (108, 110), resultados similares a los obtenidos por Valdés *et al.* (2017), donde se observaron diferencias de textura del centro al margen de la colonia. El color del micelio se tornó color blanco en el 63.6 % (Z1, A2, A3, 106, 110, 112, 118) de los aislamientos; el 18.2 % (A5, 108) presento color gris; fondo verde y superficie blanca el 9.1 % (119) y gris con blanco el 9.1 % (A4), (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Caracterización macroscópica de 11 aislamientos de *Colletotrichum* en PDA. Z1, A3, A5, 106, 110, 118, 119 (*Colletotrichum gloeosporioides*), A2 (*Colletotrichum* sp.), A4, 108 (*Colletotrichum siamense*), 112 (*Colletotrichum aenigma*).

Estas características concuerdan con las presentadas por Domínguez-Guerrero *et al.* (2012) en sus aislamientos obtenidos de plantaciones de palmera aceitera. Por otro lado, Pérez *et al.* (2003), señalan que *Colletotrichum* spp., exhibe una notable diversidad morfológica tanto entre distintas especies como entre diferentes cepas de la misma especie, sin importar que las condiciones de incubación sean similares. Con respecto a la tasa de crecimiento, el aislamiento A2 (*Colletotrichum* sp.) presentó valores significativamente diferentes (Tukey, 0.05) con respecto a los demás aislamientos (Figura 4.2). Los aislamientos del estado de Oaxaca lograron cubrir la placa Petri de 9 cm de diámetro en siete días, en comparación de las cepas provenientes de Chiapas, que alcanzaron su máximo crecimiento hasta los 11 días después de la inoculación.



**Figura 4.2.** Tasa de crecimiento diametral de 11 aislamientos de *Colletotrichum* spp. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, 0.05). Líneas verticales sobre las barras indican el error estándar (n=3). A3, A4, 110, 118, 119 (*Colletotrichum gloeosporioides*), A2 (*Colletotrichum* sp.), A5, 106, 108 (*Colletotrichum siamense*), 112 (*Colletotrichum aenigma*).

### Caracterización microscópica

En cuanto al tamaño de la espora, se observó poca variabilidad tanto en la longitud como en la anchura de la misma, con un largo entre 10.3 y 14.1  $\mu\text{m}$  y ancho entre 3.2 y 4.6  $\mu\text{m}$ , difiriendo con Trinidad-Ángel *et al.* (2017), el cual obtuvo rangos más amplios. La forma que presentaron los conidios fue ovoide, con tamaños similares a los reportados por Rojo-Báez *et al.* (2017) para *C. gloeosporioides* (13.56 - 14.24 x 4 - 4.02  $\mu\text{m}$ ) (Cuadro 4.1). El aislamiento A2 no presentó conidios, sin embargo, Villanueva-Arce *et al.* (2005), menciona que la presencia de estas estructuras puede estar influenciada por factores genéticos, ya que no todas las especies de *Colletotrichum* tienen la capacidad de producirlas.

**Cuadro 4.1. Conidios de 11 aislamientos de *Colletotrichum*.**

Aislamiento	Conidios		
	Forma	Largo ( $\mu\text{m}$ )	Ancho ( $\mu\text{m}$ )
Z1 <i>C. gloeosporioides</i>	Ovoide	13.3	4.5
A2 <i>Colletotrichum sp.</i>	ND	ND	ND
A3 <i>C. gloeosporioides</i>	Ovoide	13.9	4.3
A4 <i>C. gloeosporioides</i>	Ovoide	14.1	3.5
A5 <i>C. siamense</i>	Ovoide	12.4	4.6
106 <i>C. siamense</i>	Ovoide	12	4.1
108 <i>C. siamense</i>	Ovoide	11.9	3.8
110 <i>C. gloeosporioides</i>	Ovoide	11	4.2
112 <i>C. aenigma</i>	Ovoide	10.3	3.3
118 <i>C. gloeosporioides</i>	Ovoide	11.1	3.2
119 <i>C. gloeosporioides</i>	Ovoide	12.4	4.1

ND. No determinada



### Caracterización molecular

Las especies de *Colletotrichum* son patógenos importantes debido a su amplio rango de hospedantes, en México, se han reportado 46 especies de las cuales 28 se identificaron a nivel morfológico y 18 a nivel molecular (Rojo-Báez *et al.*, 2017). Beltrán y García, (2006), menciona que *C. Gloeosporioides* ha sido reportada en diferentes especies como papaya, cítricos, aguacate, café, mango, uva, guanábana, tomate y fresa. Por otro lado, James *et al.* (2014), menciona que *C. siamense* provoca daños en diversos cultivos como árbol de jaca, árbol de pan, café, higuera, cacao, yerba buena, pimienta negra, romero (Figura 4.3).

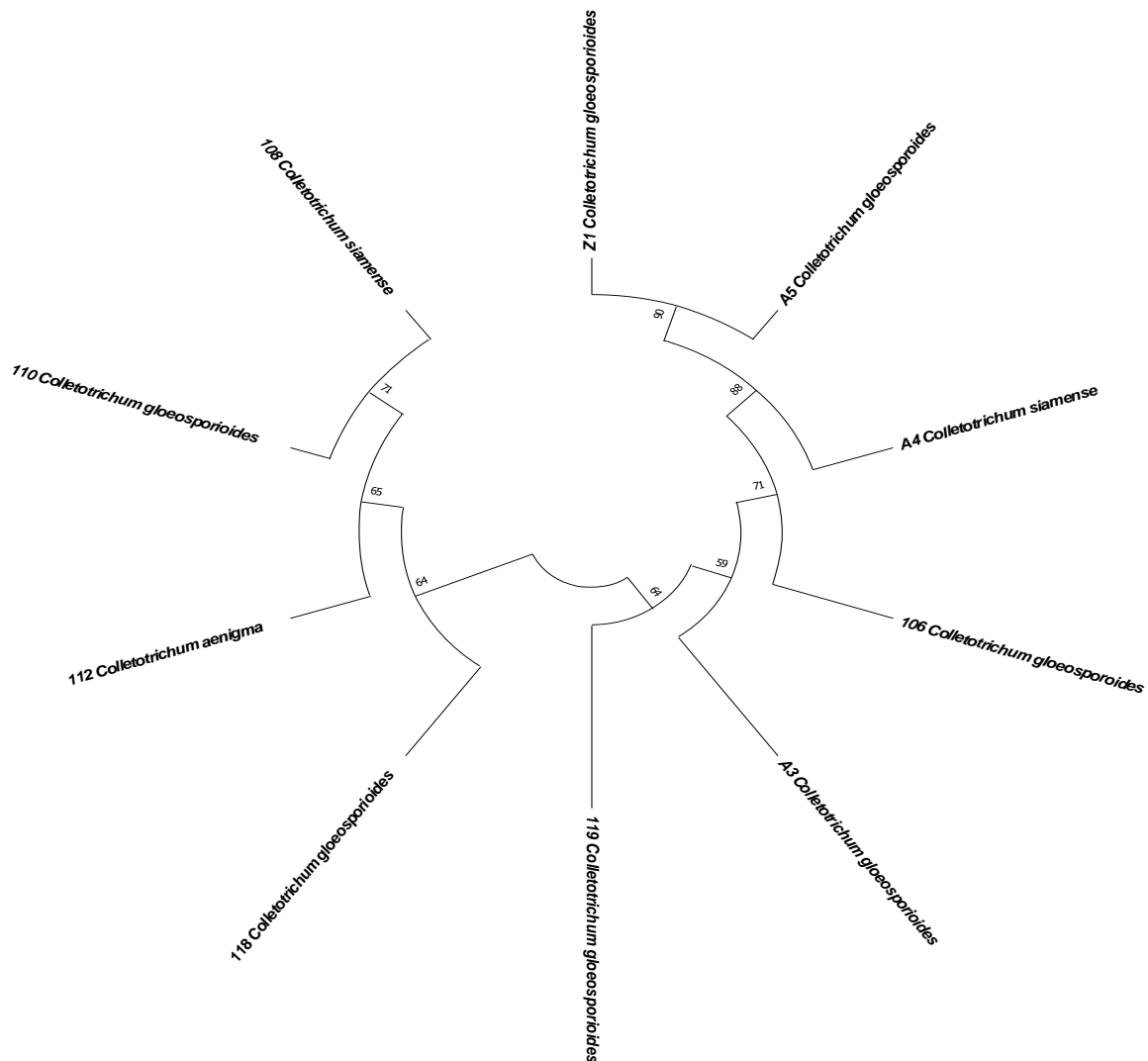
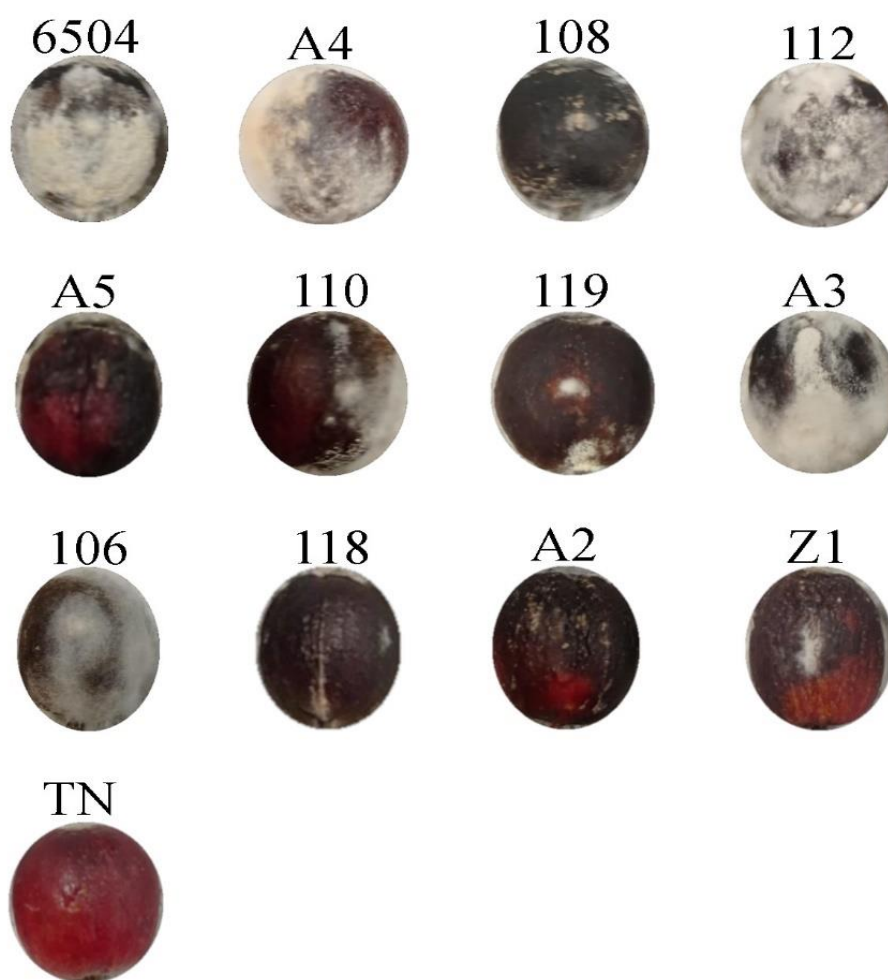


Figura 4.3. Dendrograma

### Pruebas de patogenicidad

En el estudio *in vitro* de la virulencia sobre frutos de café, todos los aislamientos de *Colletotrichum* spp. mostraron infección. Dos días después del establecimiento del experimento, los frutos presentaron pequeños hundimientos, con manchas irregulares de color marrón, posteriormente se observaron lesiones necróticas circulares e irregulares que cubrieron, en la mayoría de los casos, la totalidad de los frutos (Figura 4.4).



**Figura 4.4** Pruebas de patogenicidad *in vitro* de 11 aislamientos de *Colletotrichum* spp. en frutos de café, (Día 12). 6504 (testigo positivo), TN (testigo negativo).

Al cabo de 12 días, se observó crecimiento micelial de la mayoría de los aislamientos tal como lo menciona Velázquez-Silva *et al.* (2018). El desarrollo de las lesiones concuerda con los síntomas mencionados por Villanueva-Arce *et al.* (2005), sin embargo, ningún ensayo presentó masas de conidio color salmón, difiriendo con estudios previos (Correa-Londoño *et al.*, 2007). Por otro lado, Rojo-Báez *et al.* (2017), mencionan que, a pesar de contar con especies con características morfológicas similares, estas pueden tener una considerable variación a nivel fisiológico y patogénico debido a las condiciones ambientales o de incubación. Los frutos utilizados como control, se mantuvieron sanos hasta el final del experimento.

#### 4.4 CONCLUSIONES

Las especies causantes de antracnosis en café fueron identificadas molecularmente como *C. gloeosporioides* y *C. siamense* para el estado de Oaxaca, los aislamientos del estado de Chiapas fueron identificados como *C. gloeosporioides*, *C. siamense* y *C. aenigma*, Las pruebas de patogenicidad mostraron que todos los aislamientos son patógenos en frutos de café, por lo que es necesario ampliar los estudios al resto de *Colletotrichum* spp. para establecer futuras estrategias de control.

#### 4.5 BIBLIOGRAFÍA

- Beltrán M. C. y D. J. García (2006)** *Colletotrichum gloeosporioides* fitopatógeno asociado a la nutrición humana. *Investigaciones Andinas* 8:73-80.
- Cao X. R., X. M. Xu, H. Y. Che, J. S. West and D.Q. Luo (2019)** Characteristics and distribution of *Colletotrichum* species in coffee plantations in Hainan, China. *Plant Pathology* 68:1146–1156.
- Correa-Londoño G., L. L. Lavalett-Oñate, M. P. Galindo-Villardón y L. A. Kafuri (2007)** Uso de métodos multivariantes para la agrupación de aislamientos de *Colletotrichum* spp. con base en características morfológicas y culturales. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 60:

3671-3690,

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0304-](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0304-28472007000100004&script=sci_arttext)[28472007000100004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0304-28472007000100004&script=sci_arttext)

- Cristóbal-Martínez A. L., M de J. Yáñez-Morales, R. Solano-Vidal, O. Segura-León, and A. M. Hernández-Anguiano (2017)** Diversity of *Colletotrichum* species in coffee (*Coffea arabica*) plantations in Mexico. *European Journal of Plant Pathology* 147:605-614
- Domínguez-Guerrero I. P., S. R. Mohali-Castillo, M. A. Marín-Montoya y H. B. Pino-Menesini (2012)** Caracterización y variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato en plantaciones de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Venezuela. *Tropical Plant Pathology* 37:108-122, <https://doi.org/10.1590/S1982-56762012000200003>
- Fidelis-Pereira L., E. A. de Souza, F. A. Castro-Pereira and F. M. Avelar-Gonçalves (2019)** Investigating variability and behaviour of *Colletotrichum gloeosporioides* strains from lesions of coffee blister spot. *Journal of Phytopathology* 167:645-654, <https://doi.org/10.1111/jph.12857>
- Hassan O., J. Y. Jeon, T. Chang, J. S. Shin, N. K. Oh and Y. S. Lee (2018)** Molecular and morphological characterization of *Colletotrichum* species in the *Colletotrichum gloeosporioides* complex associated with persimmon anthracnose in South Korea. *Plant disease* 102:1015-1024, <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1564-RE>
- Huaman A., M. Torres, G. Ramirez, S. Leiva, T. Sanchez and S. Oliva (2021)** Caracterización morfológica de hongos asociados al agroecosistema café (*Coffea arabica* L.), en el estado de Tabasco, México. *Revista Pakamuros* 9:44-58, <https://doi.org/10.37787/pakamuros-unj.v9i3.217>
- James R. S., J. Ray, Y. P. Tan and R. G. Shivas (2014)** *Colletotrichum siamense*, *C. theobromicola* and *C. queenslandicum* from several plant species and the identification of *C. asianum* in the Northern Territory, Australia. *Australasian Plant Disease* 9:1-6, <https://link.springer.com/article/10.1007/s13314-014-0138-x>

- Kejela T., V. R. Thakkar and R. R. Patel (2017)** A novel strain of *Pseudomonas* inhibits *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* infections and promotes germination of Coffee. *Rhizosphere* 4:9-15, <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.05.002>
- Machenahalli S., P. Jingade, M. S. Giri, A. K. C. Huded, M. Sudha, S. Daivasikamani and M. K. Mishra (2021)** Cross infection and molecular characterization of *Colletotrichum* spp. infecting coffee and black pepper. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 113:101600, <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101600>
- Oliveira-Coqueiro D. S., D. Porto-Pedreira, R. Pereira-da Silva, A. V. Laranjeira-de Souza and A. Santos (2018)** *In vitro* development of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. isolated from coffee in the presence of chitosan and salicylic acid. *Magistra* 29:335-345, <https://www3.ufrb.edu.br/magistra/index.php/magistra/article/view/392>
- Pérez-Castro L. M., M. J. Saquero and J. D. Beltrán-Herrera (2003)** Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* sp. como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología* 5:24-35, <https://www.redalyc.org/pdf/776/77650104.pdf>
- Rojo-Báez I., B. Álvarez-Rodríguez, R. S. García-Estrada, J. León-Félix, A. Sañudo-Barajas, R. Allende-Molar (2017)** Situación actual de *Colletotrichum* spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35:549-570, DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1703-9
- Tamura K., G. Stecher and S. Kumar (2021)** MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular biology and evolution* 38:3022–3027, <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Trinidad-Ángel E., F. de J. Ascencio-Valle, J. A. Ulloa, J. C. Ramírez-Ramírez, J. A. Ragazzo-Sánchez, M. Calderón-Santoyo y P. U. Bautista-Rosales (2017)** Identificación y

caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 19:3953-3964, <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i19.664>

- Valdés, L.A., D. Calero-Consuegra, A. Gómez, M. E. Carballo, M. Capote, I. González, J. M. Alvarez y R. W. (2017)** Caracterización morfológica, cultural y patogénica de aislados de *Colletotrichum* sp. produciendo antracnosis en mango (*Mangifera indica* L.). *La granja: Revista de Ciencias de la Vida* 26:38-51, <http://doi.org/10.17163/lgr.n26.2017.04>
- Velázquez-Silva A., S. E. García-Díaz, L. Robles-Yerena, C. Nava-Díaz and D. Nieto-Ángel (2018)** First Report of *Colletotrichum* spp. in fruits of allspice (*Pimenta dioica*) in Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36:342-355, DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1711-1
- Villanueva-Arce R., A.M. Hernández-Anguiano, M. de J. Yáñez-Morales, D. Téliz-Ortíz, A. Mora-Aguilera, E. Cárdenas-Soriano y A. Castañeda-Vildózola (2005)** Caracterización e identificación de *Colletotrichum fragariae* en frutos de chirimoya. *Agrociencia* 39: 93-106, <https://www.redalyc.org/pdf/302/30239109.pdf>

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES GENERALES

Se ha observado una notable diversidad de microorganismos, específicamente *Trichoderma* y *Colletotrichum*, obtenidas a partir del aislamiento de muestras de plantas de café. En cuanto a *Trichoderma*, se han identificado siete especies distintas. De particular interés es una especie de *Trichoderma* que ha demostrado capacidad de inhibir el crecimiento de *Colletotrichum* en pruebas de antagonismo. Este hallazgo contribuye al conocimiento sobre microorganismos que pueden utilizarse en estrategias de control biológico.

En cuanto a *Colletotrichum*, todas las especies evaluadas han mostrado virulencia en las pruebas de patogenicidad, lo cual indica su capacidad de causar enfermedades en las plantas de café. Esto resalta la importancia de realizar investigaciones adicionales para comprender mejor estas especies, sus características, mecanismos de patogenicidad y su impacto en los cultivos de café. Estos descubrimientos sobre la diversidad y

comportamiento de *Trichoderma* y *Colletotrichum* en plantas de café proporcionan una base sólida para futuros estudios enfocados al control biológico de patógenos y al desarrollo de estrategias de manejo integrado de enfermedades en cultivos de café.



## CAPÍTULO VI

### RECOMENDACIONES

Se requieren investigaciones adicionales con respecto a las especies identificadas del género *Trichoderma*. Estas especies nativas tienen el potencial de adaptarse de manera más efectiva a su entorno específico, lo que puede resultar en mayores beneficios para los cultivos. Por lo tanto, es fundamental llevar a cabo estudios exhaustivos para comprender mejor su comportamiento, características y su capacidad para promover la salud de los cultivos.

En cuanto a las especies importantes de *Colletotrichum*, aún se necesita una mayor consideración en términos de su identificación precisa. Aunque las técnicas moleculares y filogenéticas han mejorado la precisión de los métodos morfológicos y bioquímicos tradicionales, se requiere un enfoque de diagnóstico integral que proporcione resultados más robustos. En México, las especies principales reportadas tanto a nivel morfológico como molecular son *C. gloeosporioides* y *C. truncatum*, sin embargo, es necesario

ampliar los estudios para abarcar el resto de las especies de *Colletotrichum*, a fin de establecer estrategias futuras más efectivas para el control de enfermedades en los cultivos de café y mejorar la salud general de las plantas.

## CAPÍTULO VI

### BIBLIOGRAFÍA GENERAL

Agrios, G. (1996). Fitopatología (2a ed.). Academic Press México.

Aguirre-Cadena, J. F., Ramírez-Valverde, B., Trejo-Téllez, B., Morales-Flores, F. J. and Juárez-Sánchez, J. P. (2012). Producción de café en comunidades indígenas de México: beneficios sociales y ambientales. *Agro Productividad*, 5(2), 34-41.  
<https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/402>

Al-Mekhlafi, N. A., Y-Abdullah, Q., Al-Helali, M. F., and Alghalibi, S. M. (2019). Antagonistic Potential of Native *Trichoderma* species against Tomato Fungal Pathogens in Yemen. *International Journal of Molecular Microbiology*, 2(1), 1-10.  
<https://psmjournals.org/index.php/ijmm/article/view/296/232>

Andrade-Hoyos, P., Luna-Cruz, A., Osorio-Hernández, E., Molina-Gayosso, E., Landero-Valenzuela, N., and Barrales-Cureño, H. J. (2019). Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de chile. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(6), 1259-1272 <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>.

- Arias, R. M. and Heredia A. G. (2022). El género *Trichoderma* en fincas de café con diferente tipo de manejo y estructura vegetal en el centro del estado de Veracruz, México. *Revista Alianzas y Tendencias BUAP*, 7(25), 1-20. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/15597>
- Barquero-Quirós, M., Peres, N. A. and Arauz, L. F. (2013). Presencia de *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides* en helecho hoja de cuero, limón criollo, papaya, carambola y mango en Costa Rica y Florida (Estados Unidos). *Agronomía Costarricense*, 37(1), 23-38. [www.mag.go.cr/revagr/index.html](http://www.mag.go.cr/revagr/index.html).
- Bautista-Baños, S. (2006). El control biológico en la reducción de enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas: uso de microorganismos antagónicos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 8(1), 1-6. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81380101>
- Beever, R. E., Larcy, E. P. and Pak, H. A. (1989). Strains of *Botrytis cinerea* resistant to dicarboxymide and benzimidazole fungicides in New Zealand vineyards. *Plant Pathology*, 38(3), 427-437. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1989.tb02163.x>
- Beltrán, M. C. y García, D. J. (2006). *Colletotrichum gloeosporioides* fitopatógeno asociado a la nutrición humana. *Investigaciones Andinas* 8(13), 73-80. <https://www.redalyc.org/pdf/2390/239017515006.pdf>
- Bosselmann, A. A., Dons, K., Oberthur, T., Olsen, C. S., Ræbild, A. and Usma, H. (2009). The influence of shade trees on coffee quality in small holder coffee agroforestry systems in Southern Colombia. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 129(1-3), 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2008.09.004>
- Canet-Brenes, G., Soto-Viquez, C., Ocampo-Thomason, P., Rivera-Ramírez, J., Navarro-Hurtado, A., Guatemala-Morales, G. M. y Villanueva-Rodríguez, S. (2016). La

situación y tendencias de la producción de café en América Latina y el Caribe. *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ)*. <http://repositorio.iica.int/handle/11324/2792>

Canseco-Martínez, D. A., Villegas-Aparicio, Y., Castañeda-Hidalgo, E., Carrillo-Rodríguez, J. C., Robles, C., y Santiago-Martínez, G. M. (2020). Respuesta de *Coffea arabica* L. a la aplicación de abonos orgánicos y biofertilizantes. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas*, 11(6), 1285-1298. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i6.2612>

Cao, X. R., Xu, X. M., Che, H. Y., West, J. S., & Luo, D. Q. (2019). Characteristics and distribution of *Colletotrichum* species in coffee plantations in Hainan, China. *Plant Pathology*, 68(6), 1146-1156. <https://doi.org/10.1111/ppa.13028>

Carrillo-Fasio, J. A., García-Estrada, R. S., Muy Rangel, M. D., Sañudo-Barajas, A., Márquez-Zequera, I., Allende-Molar, R. y Galindo-Fentanes, E. (2005). Control biológico de antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] y su efecto en la calidad poscosecha del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(1), 24-32. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61223104>

Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortés, C., Gutierrez, A., Chet, I. and Herrera-Estrella, A. (1999). Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 929-935. [10.1128/AEM.65.3.929-935.1999](https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.929-935.1999)

Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., & López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass

production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149(3), 1579-1592. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130369>

Correa-Londoño, G., Lavalett-Oñate, L. L., Galindo-Villardón, M. P. y Kafuri, L. A. (2007). Uso de métodos multivariantes para la agrupación de aislamientos de *Colletotrichum* spp. con base en características morfológicas y culturales. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 60(1), 3671-3690, [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0304-28472007000100004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0304-28472007000100004&script=sci_arttext)

Coutiño, P. V., Santoyo, C. V. H., Flores, V. J. J., & Muñoz, R. M. (2017). Análisis comparativo de dos organizaciones de pequeños productores de café de Oaxaca, México. *Turismo, Economía y Negocios*, 3(2), 41-57. <http://transitare.anahuacoaxaca.edu.mx/index.php/Transitare/article/view/55>

Cristóbal-Martínez, A. L., Yáñez-Morales, M. de J., Solano-Vidal, R., Segura-León, O., & Hernández-Anguiano, A. M. (2017). Diversity of *Colletotrichum* species in coffee (*Coffea arabica*) plantations in Mexico. *European Journal of Plant Pathology*, 147(3), 605-614. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1029-0>

Cruz-Cárdenas, C. I., Zelaya-Molina, L. X., Sandoval-Cansino, G., de los Santos-Villalobos, S., Rojas-Anaya, E., Chavez Diaz, I. F. y Ruiz-Ramirez, S. (2021). Utilización de microorganismos para una agricultura sostenible en México: consideraciones y retos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(5), 899-913. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i5.2905>

Cruz-Lagunas, B., Ortega-Acosta, S. A., Reyes-García, G., Toribio-Jiménez, J., Juárez-López, P., Guillén-Sánchez, D. and Palemón-Alberto, F. (2020). *Colletotrichum*

*gloeosporioides* causes anthracnose on grapefruit (*Citrus paradisi*) in Mexico. *Australasian Plant Disease Notes*, 15, 31-34. <https://doi.org/10.1007/s13314-020-00401-z>

Davis, A. P., Govaerts, R., Bridson, D. M. and Stoffelen, P. (2006). An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152(4), 465-512. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x>

Delgado-Fernández, E. y Santiago-Vásquez, M. (2010). Control biológico de la Antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz. y Sacc.) en Tomate de Árbol (*Solanum betaceum* Cav.) mediante hongos endófitos antagonistas. *La Granja*, 11(1), 36-43. <https://revistas.ups.edu.ec/index.php/granja/article/view/11.2010.05>

Díaz-Medina, A. R., Arboleda-Zapata, T., & Ríos-Osorio, L. A. (2019). Estrategias de control biológico utilizadas para el manejo de la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de mango: una revisión sistemática. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 22, 595-611. [https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/29529/1/DiazAna\\_2019\\_ControlBiologico.pdf](https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/29529/1/DiazAna_2019_ControlBiologico.pdf)

Domínguez-Guerrero, I. P., Mohali-Castillo, S. R., Marín-Montoya, M. A. y Pino-Menesini, H. B. (2012). Caracterización y variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato en plantaciones de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Venezuela. *Tropical Plant Pathology*, 37(2), 108-122. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762012000200003>

- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G. and Kubicek, C. P. (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47(2), 55-64. <https://doi.org/10.1007/s10267-006-0279-7>
- Duearte-Anaruma, N., Schmidt, F. L., Teixeira-Duarte, M. C., Figueira, G. M., Delarmelina, C., Benato, E. A. and Sartoratto, A. (2010). Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Sacc. in yellow passion fruit using *Cymbopogon citratus* essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(1), 66-73. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000100012>
- Enríquez, J. P., Retes-Cálix, R. F. y Vásquez-Reyes, E. F. (2020). Importancia, genética y evolución del café en Honduras y el mundo. *INNOVARE Revista de Ciencia y Tecnología*, 9(3), 149-155. <https://doi.org/10.5377/innovare.v9i3.10649>
- Espinosa-García, J. A., Uresti-Gil, J., Vélez-Izquierdo, A., Moctezuma-López, G., Uresti-Durán, D., Góngora-González, S. F. y Inurreta-Aguirre, H. D. (2016). Productividad y rentabilidad potencial del café (*Coffea arabica* L.) en el trópico mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(8), 2011-2024. <https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v7n8/2007-0934-remexca-7-08-2011.pdf>
- Ezziyyani, M., Requena, M. E., Egea-Gilabert, C. and Candela, M. E. (2007). Biological Control of *Phytophthora* Root Rot of Pepper Using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in Combination. *Journal of Phytopathology*, 155(6), 342-349. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01237.x>
- Fernández, R. y Suárez. (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.

<http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v62n1/a01v62n1.pdf>

Fernández-Larrea, O. V. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas*, 62, 96-100. <https://repositorio.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/6578/A2120e.pdf?sequence=1>

Fidelis-Pereira, L., de Souza, E. A., Castro-Pereira, F. A., & Avelar-Gonçalves, F. M. (2019). Investigating variability and behaviour of *Colletotrichum gloeosporioides* strains from lesions of coffee blister spot. *Journal of Phytopathology*, 167(11-12), 645-654. <https://doi.org/10.1111/jph.12857>

Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero (FND). (2020). México y el café orgánico. Recuperado el 9 de mayo de 2022, de <https://www.gob.mx/fnd/articulos/mexico-y-el-cafe-organico?idiom=es>

García-Alvarado, M. E., Díaz-Zorrilla, G. O., Castañeda-Hidalgo, E., Lozano-Trejo, S. y Pérez-León, M. I. (2017). Caracterización del agroecosistema de café bajo sombra en la cuenca del Río Copalita. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 4(1345-2017-1414), 634-648. 10.22004/ag.econ.262052

García-Núñez, H. G., Martínez-Campos, A. R., Hermosa-Prieto, M. R., Monte-Vázquez, E., Aguilar-Ortigoza, C. J. y González-Esquivel, C. E. (2017). Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma* y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora infestans*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(1), 58-79. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1605-4

Granda-Mora, K. I., Araujo-Abad, S., Collahuazo-Reinoso, Y., López-Salas, Y., Jaen-Rigaud, X., Robles-Carrión, A. y Urgiles-Gómez, N. (2020). Caracterización

morfológica y fisiológica de microorganismos rizosféricos nativos de sistemas agroforestales de café. *Bosques Latitud Cero*, 10(2), 124-136. <https://orcid.org/0000-0001-5220-373X>

Harman, G. E. (1990). Developments Tactis for Biological Agent in Plant Pathology. En *New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pest and Diseases* (pp. 779-792).

Hassan, O., Jeon, J. Y., Chang, T., Shin, J. S., Oh, N. K., & Lee, Y. S. (2018). Molecular and morphological characterization of *Colletotrichum* species in the *Colletotrichum gloeosporioides* complex associated with persimmon anthracnose in South Korea. *Plant disease*, 102(5), 1015-1024. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1564-RE>

Henderson, T. P. (2019). La roya y el futuro del café en Chiapas. *Revista Mexicana de Sociología*, 81(2), 389-416. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rms/v81n2/2594-0651-rms-81-02-389.pdf>

Hermosa, M. R., Grondona, I., Iturriaga, E. A., Diaz-Minguez, J. M., Castro, C., Monte, E. and Garcia-Acha, I. (2000). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1890-1898. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.1890-1898.2000>

Hernández-Acosta, E., Trejo-Aguilar, D., Rivera-Fernández, A. y Ferrera-Cerrato, R. (2020). La micorriza arbuscular como biofertilizante en cultivo de café. *Terra Latinoamericana*, 38(3), 613-628. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i3.659>

Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G. y Hernández-Rodríguez, A. (2007). Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(1), 66-74. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v25n1/v25n1a9.pdf>

- Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R. y Alarcón, A. (2019). *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 35(1), 98-112. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Hernández-Mendoza, J. L., Sánchez-Pérez, M. I., García-Olivares, J. G., Mayek-Pérez, N. y González-Prieto, J. M. (2011). Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma* spp. nativos del noreste de México. *Revista colombiana de Biotecnología*, 13(2), 176-185. <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v13n2/v13n2a17.pdf>
- Herrera-Parra, E. J., Cristóbal-Alejo, J., & Ramos-Zapata, J. A. (2017). *Trichoderma* strains as growth promoters in *Capsicum annuum* and as biocontrol agents in *Meloidogyne incognita*. *Chilean journal of agricultural research*, 77(4), 318-324. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392017000400318>
- Huaman, A., Torres, M., Ramirez, G., Leiva, S., Sanchez, T. y Oliva, S. (2021). Caracterización morfológica de hongos asociados al agroecosistema café (*Coffea arabica* L.), en el estado de Tabasco, México. *Revista Pakamuros*, 9(3), 44-58. <https://doi.org/10.37787/pakamuros-unj.v9i3.217>
- Huerta-Palacios, G., Holguín-Meléndez, F., Benítez-Camilo, F. A. y Toledo-Arreola, J. (2009). Epidemiología de la Antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc.] en Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(2), 93-105. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v27n2/v27n2a2.pdf>

- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14-21. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v24n1/rpv02109.pdf>
- James, R. S., Ray, J., Tan, Y. P and Shivas, R. G. (2014). *Colletotrichum siamense*, *C. theobromicola* and *C. queenslandicum* from several plant species and the identification of *C. asianum* in the Northern Territory, Australia. *Australasian Plant Disease*, 9,1-6. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13314-014-0138-x>
- Janisiewicz, W. J. and Korsten, L. (2002). Microbial control of postharvest disease and spoilage. Food Science and Technology New York Marcel Dekker, 543-562.
- Kannangara, S. and Dharmarathna, R. M. G. C. S. (2017). Isolation, identification and characterization of *Trichoderma* species as a potential biocontrol agent against *Ceratocystis paradoxa*. *The Journal of Agricultural Sciences*, 12(1), 51-62. <http://repo.lib.sab.ac.lk:8080/xmlui/handle/123456789/987>
- Kejela, T., Thakkar, V. R. and Patel, R. R. (2017). A novel strain of *Pseudomonas* inhibits *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* infections and promotes germination of Coffee. *Rhizosphere*, 4, 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.05.002>
- Landero-Valenzuela, N., Lara-Viveros, F. M., Andrade-Hoyos, P., Aguilar-Pérez, L. A. y Aguado Rodríguez, G. J. (2016). Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(5), 1189-1198. <https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v7n5/2007-0934-remexca-7-05-1189.pdf>
- López-Calva, V. L., Villa-García, M., Quezada-Salinas, A., Mendoza-Mendoza, A. y Anducho-Reyes, M. A. (2018). El género *Trichoderma* una herramienta agrobiotecnológica. *Ciencias Biológicas y de la Salud*, 2(1), 1-11.

[https://www.ecorfan.org/proceedings/PCBS\\_TII/Ciencias\\_Biologicas\\_y\\_de\\_la\\_Salud\\_TII\\_1.pdf](https://www.ecorfan.org/proceedings/PCBS_TII/Ciencias_Biologicas_y_de_la_Salud_TII_1.pdf).

López-García, F. J., Escamilla-Prado, E., Zamarripa-Colmenero, A. y Cruz-Castillo, J. G. (2016). Producción y calidad en variedades de café (*Coffea arabica* L.) En Veracruz, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39(3), 297-304. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v39n3/0187-7380-rfm-39-03-00297.pdf>

Machenahalli, S., Jingade, P., Giri, M. S., Huded, A. K. C., Sudha, M., Daivasikamani, S. and Mishra, M. K. (2021). Cross infection and molecular characterization of *Colletotrichum* spp. infecting coffee and black pepper. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 113, 101600. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101600>

Martínez, B., Infante, D. y Peteira, B. (2015). Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Revista de Protección Vegetal*, 30, 11-22. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v30s1/rpv004s15.pdf>

Martínez, B., Infante, D. y Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 1-11. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n1/rpv01113.pdf>

Medina-Meléndez, J. A., Ruiz-Nájera, R. E., Gómez-Castañeda, J. C., Sánchez-Yáñez, J. M., Gómez-Alfaro, G. y Pinto-Molina, O. (2016). Estudio del sistema de producción de café (*Coffea arabica* L.) en la región Frailesca, Chiapas. *Ciencia UAT*, 10(2), 33-43. <https://www.scielo.org.mx/pdf/cuat/v10n2/2007-7858-cuat-10-02-00033.pdf>

Milla-Pino, M. E., Oliva-Cruz, S. M., Leiva-Espinoza, S. T., Collazos-Silva, R., Gamarratorres, O. A., Barrera-Gurbillón, M. Á. y Maicelo-Quintana, J. L. (2019). Características morfológicas de variedades de café cultivadas en condiciones de

sombra. *Acta Agronómica*, 68(4), 271-277.

<https://doi.org/10.15446/acag.v68n4.70496>

Montero-Tavera, V., Morales García, J. L., González Chavira, M. M., Anaya López, J. L., Corona Torres, T. y Gálvez Mariscal, A. (2010). Diversidad genética, patogénica y morfológica del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(2), 157-172.  
<https://www.redalyc.org/pdf/2631/263120587004.pdf>

Morales-Mora, L. A., Andrade-Hoyos, P., Valencia-de Ita, M. A., Romero-Arenas, O., Silva-Rojas, H. V. y Contreras-Paredes, C. A. (2020). Caracterización de hongos asociados al cultivo de fresa y efecto antagonista *in vitro* de *Trichoderma harzianum*. *Revista mexicana de fitopatología*, 38(3), 434-449.  
<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2005-7>

Niño, F. y Mogollón, Á. (2018). Alternativas para el control de antracnosis (*Colletotrichum* spp.) en maracuyá (*Passiflora edulis*). *Revista Sistemas de Producción Agroecológicos*, 9(2), 2-17. <https://doi.org/10.22579/22484817.714>

Oliveira-Coqueiro, D. S., Porto-Pedreira, D., Pereira-da Silva, R., Laranjeira-de Souza, A. V., & Santos, A. (2018). *In vitro* development of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. isolated from coffee in the presence of chitosan and salicylic acid. *Magistra*, 29(3/4), 335-345.  
<https://www3.ufrb.edu.br/magistra/index.php/magistra/article/view/392>

Organización Internacional del Café (OIC). (2021). Total production by all exporting countries. Recuperado el 11 de mayo de 2022, de <https://www.ico.org/historical/1990%20onwards/PDF/1a-total-production.pdf>

- Osorio-Concepción, M., Casas-Flores, S. y Cortés-Penagos, C. (2013). Efecto de la limitación de fosfato sobre la conidiación de *Trichoderma atroviride* y mutantes ciegas a la luz. *Revista Mexicana de Micología*, 37, 41-50. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v37/v37a6.pdf>
- Pérez-Castro, L. M., Saquero, M. J., & Beltrán-Herrera, J. D. (2003). Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* sp. como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(1), 24-35. <https://www.redalyc.org/pdf/776/77650104.pdf>
- Persoon, C. H. (1749). *Disposita methodical fungorum*. *Romers Neues Mag Bot*, 1, 81-128.
- Pineda-Insuasti, J. A., Benavides-Sotelo, E. N., Duarte-Trujillo, A. S., Burgos-Rada, C. A., Soto-Arroyave, C. P., Burgos-Rada, C. A., Pineda-Soto, C. A., Fierro-Ramos, F. J., Mora-Muñoz, E. S. y Álvarez-Ramos, S. E. (2017). Producción de biopreparados de *Trichoderma* spp: una revisión. *ICIDCA Sobre los derivados de la caña de azúcar*, 51(1), 47-52. <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223153894008.pdf>
- Pyoung, K., Ryu, J., Kim, Y. H. and Chl, Y. T. (2010). Production of Biosurfactant Lipopeptides Iturin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for Control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 138-145. 10.4014/jmb.0905.05007
- Rocha-Valdez, J., Hassan, M., Corkidi, G., Flores, C., Galindo, E. and Serrano-Carreón, L. (2005). 6 pentyl  $\alpha$  pyrone production by *Trichoderma harzianum*: The influence of energy dissipation rate and its implications on fungal physiology. *Biotechnology and Bioengineering*, 91(1), 54–61. <https://doi.org/10.1002/bit.20489>

- Rajo-Báez, I., Álvarez-Rodríguez, B., García-Estrada, R. S., León-Félix, J. Sañudo-Barajas, A. and Allende-Molar R. (2017). Situación actual de *Colletotrichum* spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3), 549-570. 10.18781/R.MEX.FIT.1703-9
- Sánchez, A., Barrera, V., Reybet, G. y Sosa, M. C. (2015). Biocontrol con *Trichoderma* spp. de *Fusarium oxysporum* causal del "mal de almácigos" en pre y post emergencia en cebolla. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 114(1), 61-70. <http://revista.agro.unlp.edu.ar/index.php/revagro/article/view/396>
- Sánchez-García, B. M., Espinosa-Huerta, E., Villordo-Pineda, E., Rodríguez-Guerra, R. y Mora-Avilés, M. A. (2017). Identificación molecular y evaluación antagónica in vitro de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. montcalm. *Agrociencia*, 51(1), 63-79. <https://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v51n1/1405-3195-agro-51-01-00063.pdf>
- Santiago-Santiago, A. K., Arana-Coronado, O. A., Brambila-Paz, J. J., Matus-Gardea, J. A. y Sosa-Montes, M. (2020). Evaluación financiera con metodología de opciones reales de inversión para producción y venta de café orgánico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(3), 493-505. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i3.1877>
- Savín-Molina, J., Hernández-Montiel, L. G., Ceiro-Catasú, W., Ávila-Quezada, G. D., Palacios-Espinosa, A., Ruiz-Espinoza, F. H. and Romero-Bastidas, M. (2021). Morphological characterization and biocontrol potential of *Trichoderma* species isolated from semi-arid soils. *Mexican Journal of Phytopathology*, 39(3), 435-451. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2106-7>



- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2023). Avance de siembras y cosechas resumen nacional por estado perennes 2020. Recuperado el 9 de mayo de 2023, de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/807476/Cafe\\_Enero.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/807476/Cafe_Enero.pdf)
- Silva-Rojas, H. V. and Ávila-Quezada, G. D. (2011). Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathology*, 60(5), 899-908. 10.1111/j.1365-3059.2011.02452.x
- Stefanova, M., Lleiva, A., Larrinaga, L. y Coronado, M. F. (1999). Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 16, 509-516.
- Steiger, D., Nagai, C., Moore, P., Morden, C., Osgood, R. and Ming, R. (2002). AFLP analysis of genetic diversity within and among *Coffea arabica* cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 105, 209-215. 10.1007/s00122-002-0939-8
- Suatunce-Cunuhay, P., Díaz-Coronel, T. G. y García-Cruzatty, L. (2009). Evaluación de cuatro especies forestales asociadas con café (*Coffea arabica* L.) y en monocultivo en el litoral ecuatoriano. *Ciencia y Tecnología*, 2(2), 29-34. 10.18779/cyt.v2i2.81
- Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular biology and evolution* 38:3022–3027, <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tapia-Rodríguez, A., Ramírez-Dávila, J. F., Salgado-Siclán, M. L., Castañeda-Vildózola, A., Maldonado-Zamora, F. I. and Lara-Díaz, A. V. (2020). Distribución espacial de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) en aguacate en el Estado de México, México. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(1), 72-81.10.1016/j.ram.2019.07.004

- Torres-De la Cruz, M., Ortiz-García, C. F., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J. A., Ávalos-Contreras, N., Cappello-García, S. y De la Cruz-Pérez, A. (2015). Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86, 947-961. [10.1016/j.rmb.2015.07.012](https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.07.012)
- Trinidad-Ángel, E., Ascencio-Valle, F. de J., Ulloa, J. A., Ramírez-Ramírez, J. C., Ragazzo-Sánchez, J. A., Calderón-Santoyo, M. y Bautista-Rosales, P. U. (2017). Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 19(SPE19):3953-3964. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i19.664>
- Uzunovic, A., & Webber, J. F. (1998). Comparison of bluestain fungi grown in vitro and in freshly cut pine billets. *European Journal of Forest Pathology*, 28, 323–334. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1998.tb01187.x>
- Valdés, L.A., Calero-Consuegra, D., Gómez, A., Carballo, M. E., Capote, M., González, I., Alvarez J. M. y R. W. (2017). Caracterización morfológica, cultural y patogénica de aislados de *Colletotrichum* sp. produciendo antracnosis en mango (*Mangifera indica* L.). *La granja: Revista de Ciencias de la Vida*, 26(2):38-51, <http://doi.org/10.17163/lgr.n26.2017.04>
- Valkila, J. (2009). Fair Trade organic coffee production in Nicaragua-Sustainable development or a poverty trap? *Ecological Economics*, 68(12), 3018-3025. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2009.07.002>
- Velázquez-Silva, A., García-Díaz, S. E., Robles-Yerena, L., Nava-Díaz, C. and Nieto-Ángel, D. (2018). First Report of *Colletotrichum* spp. in fruits of allspice (*Pimenta*

- dioica*) in Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2), 342-355.  
10.18781/R.MEX.FIT.1711-1
- Vidal-Martínez, N. A., Argumedo-Delira, R., Sánchez-Pale, J. R., Chiquito-Contreras, R. G., González-Mendoza, D., y Sánchez-Viveros, G. (2021). Microorganismos antagonistas: una alternativa para el control biológico de enfermedades fúngicas presentes en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.). *ITEA-Información Técnica Económica Agraria*, 117(3), 214-226. 10.12706/itea.2020.042
- Villalta-Villalobos, J. y Gatica-Arias, A. (2019). Una mirada en el tiempo: mejoramiento genético de café mediante la aplicación de la biotecnología. *Agronomía Mesoamericana*, 30(2), 577-599. 10.15517/am.v30i2.34173
- Villanueva-Arce, R., Hernández-Anguiano, A.M., Yáñez-Morales, M. de J., Téliz-Ortíz, D., Mora-Aguilera, A., Cárdenas-Soriano, E., y Castañeda-Vildózola, A. (2005). Caracterización e identificación de *Colletotrichum fragariae* en frutos de chirimoya. *Agrociencia*, 39(1) 93-106. <https://www.redalyc.org/pdf/302/30239109.pdf>
- Villegas, M. (2005). *Trichoderma Pers.* Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. *Orius Biotecnología*.
- Vu, X. T. and Tran, V. T. (2020). Isolation and characterization of *Trichoderma* strains antagonistic against pathogenic fungi on orange crops. *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, 36(3). <https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5086>
- Waksman, S. A. (1927). Principles of soil microbiology. Baltimore, MD, USA: The Williams and Wilkins Company.
- Yassin, M. T., Mostafa, A. A. F., & Al-Askar, A. A. (2022). *In vitro* antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against fungal pathogens causing black point disease of wheat.

*Journal of Taibah University for Science*, 16(1), 57-65.

10.1080/16583655.2022.2029327

Ynfante-Martínez, D., Martínez-Coca, B., Peteira-Delgado, B., Reyes-Duque, Y., Gil, K., Simpson, J., y Herrera-Estrella, A. (2023). Caracterización morfo-cultural y variabilidad genética y molecular de aislamientos de *Trichoderma*. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 25(2), 194-203. 10.18633/biotecnia.v25i2.1890

Yu, J. H. and Keller, N. (2005). Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 437–458. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140214>

Zadoks, J. C. and Schein, R. D. (1979). *Epidemiology and Plant Disease Management*. New York, United States: Oxford University Press.

Zapata-Narváez, Y. M., Gómez-Marroquín, M. R. and Botina-Azain, B. L. (2020). Evaluation of microbial antagonists and essential oils in the control of *Sclerotium cepivorum* in garlic under controlled conditions. *Mexican Journal of Phytopathology*, 38(2), 182-197. 10.18781/r.mex.fit.2002-2