

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Hongos Asociados al Cultivo de Café (*Coffea arabica*) en el Municipio de Villa Talea de Castro, Oaxaca y Actividad Antifúngica de Productos Biológicos y Naturales
Contra *Colletotrichum* sp.

Por:

AMEYALLI LABASTIDA CRUZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México

Septiembre 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Hongos Asociados al Cultivo de Café (*Coffea arabica*) en el Municipio de Villa Talea de Castro, Oaxaca y Actividad Antifúngica de Productos Biológicos y Naturales Contra *Colletotrichum* sp.

Por:

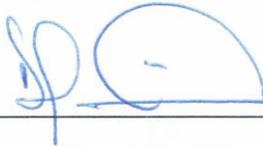
AMEYALLI LABASTIDA CRUZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo

Asesor Principal



Dr. Gabriel Gallegos Morales
Coasesor



M.C. Marco Antonio Tucuch Pérez
Coasesor



Dr. José Antonio González Fuentes
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Septiembre 2020



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a **Dios** por permitirme llegar a esta etapa de mi vida y por iluminarme en todos los caminos andados y los que quedan por andar.

La culminación de este proyecto no habría sido posible sin la asistencia del **Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo**, gracias por todo su apoyo, por compartir conmigo gran parte de sus conocimientos, y, sobre todo gracias por creer en mí.

Al **Dr. Gabriel Gallegos Morales** por aceptar formar parte de mi comité de asesoría y por tomarse el tiempo para la revisión de este proyecto.

De igual manera agradezco al **M.C. Marco Antonio Tucuch Pérez** por su paciencia para guiarme a través de cada una de las etapas de este proyecto. Gracias Marquinho por ayudarme cuando llegaba al laboratorio sin una idea de lo que tenía que hacer.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por permitirme formar parte de su matrícula y por todo el apoyo brindado durante mi estancia en ella, mi profundo agradecimiento también a cada uno de los docentes que instituyeron parte de mi formación académica.

A cada una de las personas que formaron parte del éxito de este proyecto les estaré eternamente agradecida.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres **Amando Labastida Andrés** y **Lilia Cruz Andrés**, sin su apoyo nada de esto habría sido posible; muchas gracias por impulsarme a seguir mis sueños, por su confianza y motivación, hoy tantos años lejos de casa han valido la pena, todos mis éxitos son por y para ustedes.

A mis hermanos (as), **Eleazar**, **Ángel**, **Idalia** y **Nelly** por su apoyo moral, por sus consejos y por sacarme una sonrisa cuando más la necesito.

A mis amigas **Cari**, **Yolis** y **Guiyel**, gracias primas por siempre estar ahí para mí a pesar de la distancia y de los años, por festejar cada uno de mis logros como si fueran suyos.

A **Maddy**, **Mayris** y **La China**, si algo agradezco a la Narro es darme la oportunidad de conocer a personas tan increíbles como ustedes, gracias por permitirme formar parte de su vida, por estar ahí en las buenas y en las malas, las llevaré siempre conmigo.

A **Vita**, **Jovany**, **Char** y **Mauricio**, por su amistad y por tantos momentos compartidos, muchas gracias por hacer mi estancia en la Narro un poco más amena.

A **mi familia**, tíos (as) y primos (as), que de alguna u otra manera me apoyaron y motivaron a seguir adelante, muchas gracias por las palabras de aliento en el momento preciso.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA	iv
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE.....	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
Justificación	2
OBJETIVO	2
Objetivos Específicos	2
HIPÓTESIS	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Importancia del Café	4
Producción Mundial del Café	4
Consumo Mundial de Café	6
Producción Nacional de Café.....	6
Consumo Nacional de Café	8
Origen del Café.....	8
Taxonomía del Café	9
Descripción Botánica.....	10
Requerimientos Climáticos	10
Suelo	10
Temperatura	11
Altitud.....	11
Enfermedades Asociadas al Café	11
Roya <i>Hemileia vastatrix</i>	12
Antracnosis <i>Colletotrichum</i> spp.....	13
Marchitez vascular <i>Fusarium</i> spp.....	15
<i>Cladosporium</i> spp.....	16
Importancia del Uso de Extractos Para el Control de Fitopatógenos	17

Importancia del Control Biológico de Fitopatógenos	18
Importancia de Especies de <i>Trichoderma</i>	18
Importancia de <i>Bacillus</i> spp.	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
Muestreo	21
Aislamiento y Purificación.....	21
Actividad Antifúngica de Productos Biológicos y Naturales Para Control de <i>Colletotrichum</i> sp.....	22
Actividad Antifúngica de Metabolitos Secundarios de <i>Bacillus</i> , <i>Trichoderma</i> y de Extracto de <i>V. album</i> Contra <i>Colletotrichum</i> sp.....	22
Producción de Metabolitos Secundarios de <i>Bacillus</i> y <i>Trichoderma</i>	23
Obtención del Extracto Vegetal de <i>V. album</i>	23
Actividad Antifúngica de Metabolitos Secundarios de Especies de <i>Bacillus</i> , <i>Trichoderma</i> y de Extracto de <i>V. album</i> Contra <i>Colletotrichum</i> sp. por el Método de Microdilución en Placa.	23
Actividad Antagónica de <i>Trichoderma</i> Contra <i>Colletotrichum</i> sp. por el Método de Cultivos Duales.	26
Actividad Antagónica de Metabolitos Volátiles de Especies de <i>Trichoderma</i> Contra <i>Colletotrichum</i> sp.	27
Actividad Antagónica de <i>Bacillus</i> Contra <i>Colletotrichum</i> sp.....	28
Actividad Antifúngica de Extracto de <i>V. album</i> Contra <i>Colletotrichum</i> sp. ..	28
Análisis Estadístico	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
Resultados de Muestreo y Aislamiento.....	30
Actividad Antifúngica de Metabolitos Secundarios de Especies de <i>Bacillus</i> , <i>Trichoderma</i> y del Extracto de <i>V. album</i> Contra <i>Colletotrichum</i> sp. por el Método de Microdilución en Placa.	31
Actividad Antagónica de Especies de <i>Trichoderma</i> Contra <i>Colletotrichum</i> sp. por el Método de Cultivos Duales.....	33
Actividad Antagónica de Metabolitos Volátiles de Especies de <i>Trichoderma</i> Contra <i>Colletotrichum</i> sp.	34

Actividad Antagónica de <i>B. licheniformis</i> Contra <i>Colletotrichum</i> sp.....	35
Actividad Antifúngica de Extracto de <i>V. album</i> Contra <i>Colletotrichum</i> sp. ...	36
CONCLUSIONES	37
LITERATURA CITADA.....	38
APÉNDICE.....	51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Principales productores de café del mundo en el año 2018 (Gómez, 2019).	5
Cuadro 2. Indicadores de producción de café cereza por estado, (Bartra, 2012).....	7
Cuadro 3 Concentración inhibitoria al 50% (CI ₅₀) de los diferentes tratamientos contra <i>Colletotrichum</i> sp.....	32
Cuadro 4. Efecto de las diferentes especies de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento micelial de <i>Colletotrichum</i> sp. en cultivo dual y producción de metabolitos volátiles.	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Consumo mundial de café en millones de sacos (ICO,2019).....	6
Figura 2. Distribución de los tratamientos y concentraciones dentro de la microplaca.	24
Figura 3 Porcentaje de inhibición de los diferentes tratamientos contra <i>Colletotrichum</i> sp.	32
Figura 4. Inhibición de <i>Colletotrichum</i> sp. por metabolitos secundarios de <i>B.</i> <i>licheniformis</i>	35
Figura 5. Medidas del porcentaje de inhibición de <i>V. album</i> frente a <i>Colletotrichum</i> sp. por medio envenenado.....	36

ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE

Anexo 1. Hongos asociados al cultivo de café.	52
Anexo 2. Promedio de lecturas de absorbancia del bioensayo de microdilución en placa de metabolitos secundarios de especies de <i>Bacillus</i> , <i>Trichoderma</i> y del extracto de <i>V. album</i>	54
Anexo 3. Actividad antagónica de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Colletotrichum</i> sp. de acuerdo a la Escala de Bell <i>et al.</i> (1982).	54
Anexo 4. Análisis de varianza para el antagonismo de especies de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Colletotrichum</i> sp. por el método de cultivo dual.	54
Anexo 5. Análisis de varianza para los días a contacto entre <i>Colletotrichum</i> sp. y especies de <i>Trichoderma</i> . por el método de cultivo dual.	55
Anexo 6. Inhibición del crecimiento en centímetros de <i>Colletotrichum</i> sp. afectado por la actividad de metabolitos volátiles de especies de <i>Trichoderma</i>	55
Anexo 7. Análisis de varianza para el antagonismo de metabolitos volátiles de especies de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Colletotrichum</i> sp.	55
Anexo 8 Crecimiento radial de <i>Colletotrichum</i> sp. en centímetros frente a <i>B. licheniformis</i> por el método de cultivo dual.	55
Anexo 9. Crecimiento radial de <i>Colletotrichum</i> sp. en centímetros frente al extracto de <i>V. album</i> por el método de medio envenenado.	56

RESUMEN

Las enfermedades en el cultivo de café ocasionan pérdidas; para su control se utilizan productos químicos que causan problemas medioambientales y de resistencia. Por este motivo, se buscan alternativas ecológicas, como microorganismos de los géneros *Bacillus* y *Trichoderma*, metabolitos secundarios de microorganismos y extractos vegetales. El objetivo del presente trabajo se enfocó en determinar hongos asociados al cultivo de café, así como el uso de especies de *Bacillus*, *Trichoderma*, sus metabolitos secundarios y un extracto vegetal de *Viscum album*, como alternativa para control de *Colletotrichum* sp. *in vitro*. Se realizó un muestreo de cinco hojas y seis frutos por estrato foliar de la planta, esto en una finca de café del municipio de Villa Talea de Castro, Oaxaca, con la finalidad de conocer los hongos asociados a dicho cultivo; se realizaron cinco bioensayos con *Colletotrichum* sp: 1) Microdilución en placa para determinar actividad antifúngica de metabolitos secundarios de tres cepas de *Bacillus* y de *Trichoderma*, así como del extracto vegetal; 2) Cultivos duales para actividad antagonista de especies de *Trichoderma* 3) Compuestos volátiles de las especies de *Trichoderma* para determinar su efecto sobre *Colletotrichum* sp.; 4) Cultivos duales para actividad antagonista de la cepa de *Bacillus* con mejor actividad en microdilución y 5) Medio envenenado para evaluar la concentración inhibitoria al 50% del extracto vegetal de *V. album*, previamente obtenida en microdilución. Se realizaron seis repeticiones; los resultados se analizaron mediante pruebas de Tukey (0.05). Se encontraron asociados al cultivo hongos fitopatógenos de los géneros *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp. y la especie *Hemileia vastatrix*. Asimismo, se comprobó que los metabolitos secundarios de la especie *B. licheniformis* y el extracto vegetal fueron los que presentaron mejor efecto con 100 y 96.77% de inhibición de crecimiento del hongo. En cuanto a los cultivos duales *T. asperellum* presentó el mayor antagonismo en la escala de Bell. En compuestos volátiles, la especie *T. lignorum* tuvo mayor inhibición del patógeno, con 24.02%. *B. subtilis* presentó 50% de inhibición en cultivos duales y se corroboró la Concentración inhibitoria al 50% (CI₅₀) del extracto vegetal, con una inhibición del 100% a 100 ppm.

Se concluye que los productos utilizados son buena opción para el posible manejo de *Colletotrichum* sp. de manera ecológica.

INTRODUCCIÓN

El cafeto es originario de África, su nombre se deriva de la ciudad de Kaffa, en Etiopía, en donde crece como arbusto bajo el entramado de las selvas tropicales. De las más de 150 especies del género *Coffea*, los dos tipos más importantes en el mundo son: *Coffea arabica* que constituye 70 por ciento de la producción cafetalera mundial, y el *Coffea canephora*, especie conocida comúnmente como “robusta” (CCA,1999).

De acuerdo con el Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA, 2014), el café es uno de los principales productos agrícolas que se comercializan en los mercados internacionales y es importante en las exportaciones de los países productores. Actualmente, el café es el segundo “commodity” más comercializado en el mundo, sólo superado por el petróleo. En la última década, a diferencia de lo que fueron las dos décadas previas a ésta, se observan tasas moderadas de crecimiento en la producción mundial de café. Los datos revelan que las mayores tasas de crecimiento, en los últimos cinco ciclos se encuentran en los países asiáticos, Vietnam y Malasia, mientras que en América los países que reflejan las mayores tasas son Colombia, Honduras y Perú. A nivel mundial la producción de café ha crecido 73% entre 1980 y 2014. Por las características específicas en la forma de cultivarse, alrededor de 70% la producción mundial de café proviene de pequeñas explotaciones familiares con superficies menores a 10 ha, y de estas el 70% se cultiva en unidades de menos de 5 ha (CEDRSSA, 2014).

En México, la caficultura destaca por su importancia económica y social, actualmente el café se cultiva en 12 estados. La participación del grano en el valor del producto bruto agrícola solamente ha sido superada en los últimos años por el maíz, el algodón y la caña de azúcar, ocupa un lugar destacado en nuestro comercio internacional; es una fuente de ocupación para 95 mil productores a los que hay que agregar alrededor de 300 mil empleados y asalariados que trabajan en actividades cafetícolas. Todo esto significa que alrededor de dos millones de personas dependen del café en distinto grado (Nolasco, 1985). A nivel nacional Oaxaca es el segundo productor de café con una aportación del 30% (Domínguez, 2008).

Un problema grave en la producción del café es la fitosanidad de este cultivo; desde hace más de un lustro México enfrenta un declive en la producción de café provocado por la presencia de enfermedades, destacando entre ellas la roya *Hemileia vastatrix* la cual desde el 2013 afecta a los cafetales mexicanos; otros de los factores que afectan el rendimiento son el cambio climático y la falta de adopción de tecnología para proteger los cultivos (CEDRSSA, 2017). Las cifras de producción de café en 2012 fueron de 1,336,882 y para el 2017 solo fue de 835,380 ton; lo que significa que disminuyó la producción nacional en un 37.5% (CEDRSSA,2019).

Justificación

La presente investigación pretende determinar cuáles son los hongos asociados al cultivo de café en el municipio de Villa Talea de Castro, Oaxaca, para posteriormente determinar el efecto del control biológico *in vitro* de especies de *Trichoderma*, *Bacillus* y de un extracto vegetal de *Viscum album* en al menos uno de los hongos aislados. Se espera que esta investigación aporte información que posteriormente pueda servir para proyectos de investigación en la búsqueda de alternativas que disminuyan el impacto ambiental mediante el control biológico y de productos orgánicos de éstas, y que al mismo tiempo beneficie la economía de los productores.

OBJETIVO

Identificar hongos asociados al cultivo de café en el municipio de Villa Talea de Castro, Oaxaca, y determinar la capacidad antagonista de especies de *Bacillus*, *Trichoderma* y de un extracto vegetal sobre *Colletotrichum* sp.

Objetivos Específicos

- Determinar los hongos asociados al cultivo de café que ocasionan enfermedades en la planta.
- Estudiar la efectividad biológica de especies de *Trichoderma* sobre *Colletotrichum* sp.

- Estudiar la efectividad biológica de especies de *Bacillus* sobre *Colletotrichum* sp.
- Determinar la efectividad biológica de un extracto de *Viscum album* sobre *Colletotrichum* sp.

HIPÓTESIS

Hemileia vastatrix y *Colletotrichum* serán los hongos asociados al cultivo de café en el municipio de Villa Talea de Castro.

Trichoderma será capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo de *Colletotrichum* sp. de manera significativa.

Bacillus será capaz de inhibir el desarrollo micelial y esporulación de *Colletotrichum* sp.

El extracto vegetal de *Viscum album* tendrá la capacidad de inhibir el desarrollo micelial de *Colletotrichum* sp.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia del Café

El café tiene una gran importancia económica a nivel mundial, ya que sus semillas, tostadas, molidas y en infusión, constituyen la bebida no alcohólica más consumida. Su cultivo supone una actividad económica clave en muchos países en desarrollo, y se estima que su procesamiento y comercialización movilizan más de 70.000 millones de dólares al año y dan trabajo a más de 125 millones de personas. Los suministros comerciales de café provienen de más de una especie, pero es *Coffea arabica* la que suministra la mayor cantidad y mejor calidad de semillas (Jiménez *et al.*, 2014).

El café es el producto orgánico de mayor importancia en México (Gómez *et al.* 2002). El éxito de los cafés sustentables se asocia principalmente a la convergencia de intereses entre los productores para encontrar nuevas expresiones de su grano en el mercado mundial, y al interés de los consumidores por productos saludables, respetuosos del medio ambiente y producidos bajo ciertos parámetros de equidad social. Los principales estados involucrados en estos sistemas de producción son Chiapas y Oaxaca (Pérez *et al.*, 2005).

En México, la cafecultura es importante por el número de productores que se dedican a ella, en año 2017 se registró la participación de 500 mil cafecultores, y es aquí donde radica desde el punto de vista social, la importancia del café (SAGARPA, 2017).

Producción Mundial del Café

Más de 25 millones de personas que viven en los trópicos dependen del café como medio de subsistencia. Este cultivo es el soporte económico de muchos países y el segundo producto más comercializado del mercado mundial, después del petróleo (Amaya, 2009).

La producción mundial del café se integra por tres tipos: los suaves que son procesados por medio del método de lavado (despulpado, lavado y secado

inmediatamente después de haber sido recolectado), los arábigos que generalmente no son lavados (el grano recolectado se seca y almacena con su pulpa o cáscara exterior, y se despulpa posteriormente antes de ser entregado al comprador), y los robusta que son los menos cotizados en el mercado tanto por su calidad como por su precio (Cano *et al.*, 2004; Cinza *et al.*, 2002).

En la década de 1930, más del 90% de la producción de café provenía de Brasil, Colombia, México y Guatemala. A mediados de la década de 1950, este aporte se redujo significativamente para estabilizarse en aproximadamente dos terceras partes de la producción mundial (Cartay *et al.*, 1996).

En el año 2018 la producción mundial de café presentó un total de 163.51 millones de sacos de 60 kilogramos (ICO, 2019). El mayor productor de café del mundo sigue siendo Brasil, a pesar de que Vietnam consiguió recientemente la segunda posición en el mercado, por delante de Colombia, México por su parte se encuentra en el noveno lugar con el 1,7% de la producción mundial (Cuadro 1).

Cuadro 1. Principales productores de café del mundo en el año 2018 (Gómez, 2019).

Puesto	País	Producción (Ton.)	% producción mundial
1	Brasil	2.594.100	30,16%
2	Vietnam	1.650.000	19,18%
3	Colombia	840.000	--
4	Indonesia	660.000	7,46%
5	Honduras	581.000	--
6	Etiopía	532.000	4,46%
7	India	364.000	3,60%
8	Uganda	306.000	--
9	México	270.000	1,7%
10	Perú	258.000	--

Consumo Mundial de Café

El consumo mundial de café en el periodo 2017 - 2018 fue de 161,93 millones de sacos, lo que representa un aumento de 1.8% con respecto al periodo 2016-2017.

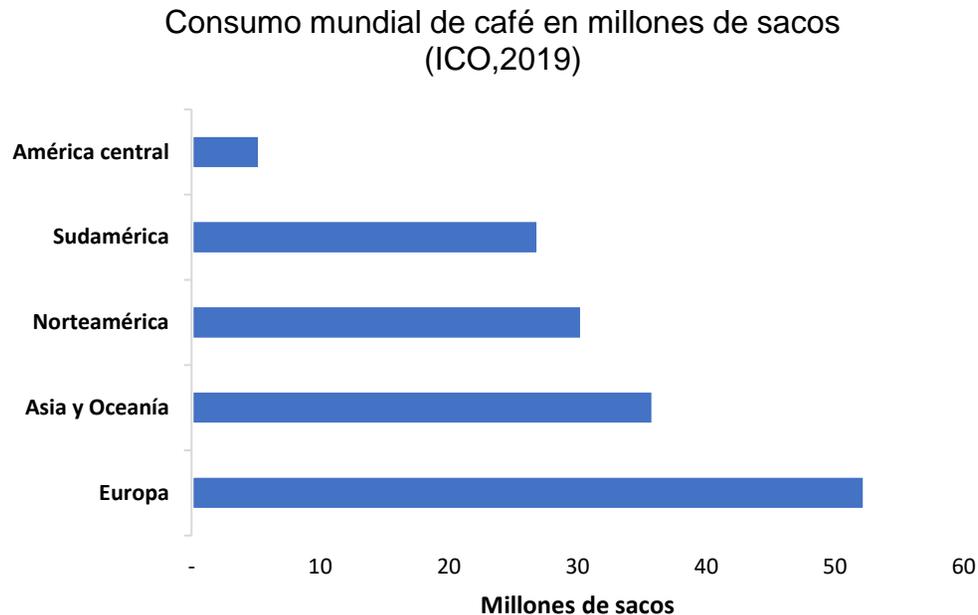


Figura 1. Consumo mundial de café en millones de sacos (ICO,2019)

Producción Nacional de Café

Con base en el registro del Padrón Nacional Cafetalero (PNC), el cultivo del café en México se desarrolla en 12 estados, 404 municipios, 4 mil 572 localidades, por 510 mil 544 productores y en 675 mil 258 hectáreas (AMECAFÉ-SIAP); se compone en 97.0% de café de la especie arábica cuyas principales variedades son Típica, Bourbon, Maragogipe, Caturra, Mundo Novo, Garnica, Catauai y Catimor (Benítez, 2014).

La producción cafetalera se concentra en los estados de Chiapas, Veracruz, Puebla y Oaxaca, representando el 94% del total de la producción, el 85% de la superficie

cosechada y el 83% de los productores. La producción tiene un carácter minifundista ya que cerca del 90% de los productores poseen superficies menores a cinco hectáreas. Aproximadamente, el 80% de la producción de café se destina a los mercados de exportación, generando divisas por las ventas de café alrededor de 800 millones de dólares, sólo superadas por las ventas externas de petróleo (Bartra, 2006).

Cuadro 2. Indicadores de producción de café cereza por estado, Bartra (2012).

Entidad	Producción (Toneladas)	Rendimiento (Ton/Ha)	Valor producción (miles de pesos)
Chiapas	532,582.79	2.09	3,481,899,684.22
Veracruz	369,455.21	2.65	2,584,749,838.42
Puebla	202, 947.48	3.43	1,564,469,924.11
Oaxaca	117,439.81	0.94	440,579,491.44
Guerrero	48,447.37	1.03	186,851,849.40
Hidalgo	32,880.30	1.25	212,070,140.00
S. L.P.	11,829.87	0.70	18,784,136.00
Nayarit	10,785.20	0.58	90,265,603.59
Jalisco	5,311.38	1.33	33,419, 020.20
Colima	2,043.58	0.82	16,366,251.20
Tabasco	953.68	0.92	7,131,360.75
Querétaro	108.00	0.40	972,000.00
Nacional	1,336,882.11	1.92	8,647,580,349.05

Chiapas es el principal productor mundial de café orgánico; 18 millones de toneladas anuales son producidas por más de 60 mil productores, una tercera parte son mujeres

indígenas y campesinas que cultivan los cafetos bajo la sombra de árboles nativos, sin usar agroquímicos para evitar contaminar la tierra (Mariscal, 2011).

Por otro lado, México se enfrenta a un declive en la producción desde hace más de un lustro, observándose que en el periodo 2015/2016 la producción fue la más baja registrada en 20 años. La baja producción de café ha sido provocada principalmente por la roya (*Hemileia vastatrix*), que desde el 2013 afecta a los cafetales mexicanos (CEDRSSA, 2017).

Consumo Nacional de Café

A nivel mundial, el consumo de café en los países productores ha sido bajo y se debe a que a lo largo de los años no se ha impulsado su consumo, ya que el objetivo siempre ha sido la exportación (Benítez, 2014).

El consumo per cápita de café en el país es de 1.6 Kilogramos anuales, es decir, 85% de los mexicanos toman de una a tres tazas al día (CEDRSSA, 2017).

En México, los principales participantes en el mercado de consumo son: Italian Coffee, Starbucks, Café Punta del Cielo; Punta Santa Veracruz y Cielito Querido Café, empresas que en conjunto representan más de 80.0% del mercado (Benítez, 2014).

Origen del Café

El primer registro histórico del café se sitúa en la antigua región de Abisinia, actual estado de Etiopía, concretamente en la región de Kaffa, alrededor del siglo X (Fisac, 2014). Los persas fueron el segundo pueblo que hizo uso del café y por fin los árabes que nos lo han transmitido (Gómez 2010). De allí, el grano pasó a Europa y desde el Viejo Continente y de la mano de los muchos europeos que se lanzaron a la aventura, el café llegó a América (D'Areny, 2008).

Fisac (2014) menciona que a lo largo del siglo XVIII el cultivo del café se fue extendiendo con fuerza por las Antillas, en Jamaica (1730), Haití, Santo Domingo, Cuba (1750); por América Central en Guatemala, Costa Rica (1779), Honduras; y por

Sudamérica en Colombia (1732), Brasil (1727) y Venezuela (1784). En el caso de nuestro país, se introdujo en México en 1796 en la región de Córdoba, Veracruz (SAGARPA, 2013).

Su uso como bebida data de la última década del siglo XVIII; a más de doscientos años de su introducción, el grano es considerado uno de los cultivos de mayor importancia económica, sociocultural y ambiental (Pérez *et al.*, 2000).

Taxonomía del Café

La planta del café se denomina cafeto. Pertenece al género *Coffea*, de la familia de las rubiáceas. El nombre «cafeto» deriva de la designación *Coffea*, aplicada por el botánico francés Antoine De Jussieu en el año 1732 (Fisac, 2014). De su total de especies, solo tres se mencionan como cultivadas comercialmente, sobresaliendo las dos primeras de acuerdo al siguiente orden: *Coffea arabica* L., *C. canephora* Pierre ex Froehner y *C. liberica* Bull ex Hiem (Alvarado *et al.*, 1994).

La clasificación taxonómica del cultivo de café de acuerdo a Carlier y Marzocca (1981) es la siguiente:

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Sub-división	Angiospermae
Clase	Magnoliata
Sub-clase	Asteridae
Orden	Rubiales
Familia	Rubiaceae
Género	<i>Coffea</i>
Especies (s)	<i>arabica</i> , <i>canephora</i> , <i>liberica</i> , etc.

Descripción Botánica

El cafeto es un arbusto o árbol pequeño, perennifolio, de tronco recto que puede alcanzar los 10 m en estado silvestre; en los cultivos se les mantiene normalmente en tamaño más reducido, alrededor de 3 metros (Figuerola *et al.*, s.f), las ramas primarias se oponen, en sentido horizontal o son caídas; las hojas crecen en pares en tallos cortos. Son de alrededor de 15 cm. de longitud, de color verde oscuro y brillante en apariencia (Doyle *et al.*, 2001; Clarke y Macrae, 1985).

Es una planta de flores hermafroditas y regulares; presenta un cáliz gamosépalo corto, de cinco divisiones poco pronunciadas; corola hipocraterimorfa o infundibuliforme, glabra o velluda en la garganta, de limbo cortado en cuatro o cinco lóbulos torcidos en el botón (Gómez, 2010).

En los cultivares comerciales el fruto maduro es una drupa elipsoidal ligeramente aplanada, cuyos tres ejes principales miden entre 12 y 18 mm de longitud, 8 y 14 mm de ancho y 7 y 10 mm de espesor. El fruto es de superficie lisa y brillante y de pulpa delgada; está constituido de tres partes diferentes: el epicarpio o epidermis, el mesocarpio o pulpa y el endospermo o semilla. Cuando madura puede ser de color rojo o amarillo, dependiendo del cultivar (Alvarado *et al.*, 1994).

Requerimientos Climáticos

Para el cultivo del café, al igual que para cualquier otro, existen características climáticas y edáficas bien definidas, las cuales en cuanto más se aproximen a las condiciones ideales requeridas por el cultivo, en sus diferentes fases fenológicas, mayores posibilidades tendrán de expresar todo su potencial genético, lo que se traducirá en mayor producción (Mora,2008).

Suelo

Su cultivo requiere suelos franco y franco-arcillosos, aunque se puede dar en una gran gama de suelos (Benacchio, 1982). El cafeto se desarrolla bien a pH de 4.5 a 5.5 (Morfín *et al.*, 2006).

Temperatura

Las temperaturas medias óptimas para la producción de café se encuentran entre 16 y 22°C, con una óptima nocturna y diurna de 17°C y 23°C, respectivamente. Los daños comienzan al pasar los límites de 13° y 27°C (Benacchio, 1982).

Altitud

La altura apropiada para la producción del café es de entre 900 a 1600 metros sobre el nivel del mar (Innatia, s.f). *Coffea arabica* crece mejor en un clima subtropical, libre de heladas y sin vientos fuertes (IFA, 1992).

Enfermedades Asociadas al Café

Las enfermedades que ocurren en el cafeto son causadas principalmente por hongos, bacterias y nemátodos, y afectan las plantas en distintas etapas de su desarrollo. La influencia que éstas puedan tener en el crecimiento, producción y rendimiento de los cafetos estará determinada por su incidencia, por la edad de la planta y por el manejo de todas las condiciones para el desarrollo del cultivo (Rodríguez, s.f).

Dentro de las enfermedades fungosas que más afectan a este cultivo se enlistan las siguientes:

- Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*)
- Ojo de gallo (*Mycena citricolor*)
- Mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*)
- Antracnosis (*Colletotrichum coffeanum*)
- Llaga negra (*Rosellinia bunodes*)
- Mal de Hilachas, Arañero (*Pellicularia koleroga*)
- Marchitez vascular (*Fusarium* spp.)
- *Cladosporium* spp.

A continuación, se describen las enfermedades encontradas en las muestras estudiadas.

Roya *Hemileia vastatrix*

También conocida como Roya anaranjada del cafeto. Fue descubierta en África a mediados del siglo XIX. La ocasiona el hongo *Hemileia vastatrix* que ataca a todas las variedades de café de la especie Arábica (d'Areny, 2004).

Etiología

La roya pertenece al phylum Basidiomycota, clase Pucciniomycetes, del orden Pucciniales (SINAVEF, 2013). Las esporas son de tamaño microscópico (30 μ de largo X 20 μ de ancho) de forma reniforme, lisas en la cara interna y rugosa en la externa, denominadas urediniosporas, que son producidas en grandes cantidades y corresponden al polvillo amarillo o naranja que se visualiza en el envés de las hojas de café y que es característico de esta enfermedad. Las teliosporas, cuya ocurrencia es muy baja, son de forma redondeada de 20-25 μ (CESAVER, 2015).

Síntomas

Los primeros síntomas de la enfermedad aparecen en el envés o cara inferior de las hojas como manchas pálidas de 1-3 mm de color amarillo claro, las cuales aumentan de tamaño y se unen formando manchas con abundante polvo amarillo (esporas); con el tiempo las lesiones viejas se necrosan. La germinación de esporas es favorecida en temperatura de 22°C, condiciones de obscuridad, periodo de mojado mínimo de 6 horas (Fernández *et al.*, 2009).

Epidemiología

La infección se favorece por la alta humedad y temperaturas frescas por lo que la mayor incidencia ocurre después de los periodos de lluvia (Rodríguez y Monroig, s.f). *H. vastatrix* requiere la presencia de una capa de agua en el envés de las hojas para germinar, todo esto acompañado de temperaturas entre 16 y 18°C y condiciones de baja intensidad luminosa (Kushalapa y Eskes, 1989). Es un parásito obligado, sobrevive únicamente en tejido vivo del hospedante, las urediniosporas pueden sobrevivir hasta por 6 semanas bajo condiciones ambientales secas (APS, 2011).

Manejo de la enfermedad

El principal objetivo para controlar la roya del cafeto radica en la necesidad de proteger el follaje durante el periodo de llenado de granos, por lo tanto, deben de considerarse cuatro factores, hospedero, patógeno, ambiente y manejo, los cuales determinan su aparición actuando de manera que puedan romperse o disminuirse las interacciones entre ellos, y así afectar el desarrollo de la enfermedad (Rivillas *et al.*, 2011).

Dentro del control cultural tenemos la integración de buenas prácticas agronómicas y un buen programa de nutrición al sistema de producción del cultivo de café (Batista, 2018); así mismo se recomienda reducir la sombra excesiva con el fin de evitar rangos de temperatura favorables para el desarrollo de la enfermedad (Rivillas *et al.* 2011). Como parte del control genético se ha reportado que la variedad “Catimor” presenta resistencia a la roya, la cual mantiene un nivel de infección menor al 15% (Moreno y Alvarado, 2000). Por último, se tiene el control químico, para ello es importante determinar las condiciones específicas y la fenología del cultivo, en la fase preventiva regularmente se aplica oxiclورو de cobre o acciones curativas con cyproconazol, azoxistrobin y triadimefon (SENASICA, 2016).

Antracnosis *Colletotrichum* spp.

La enfermedad adquiere importancia cuando se presenta en frutos de café en plena producción; generalmente se acompaña de otros hongos como *Cercospora* y *Phoma* lo que hace difícil distinguir los síntomas y daños de estos tres hongos (CENICAFE, 2002).

Etiología

Las colonias de crecimiento se distinguen por ser algodonosas de coloración obscura-gris a gris oliváceo en la superficie y verde oscuro en el reverso. Los conidios se producen a partir de hifas simples o en acérvulos; son rectos, cilíndricos, aseptadas y obtusas en el ápice, con dimensiones de 12.5 a 19.0 x 4.0 μm (CENICAFE, 2002).

Síntomas

Aparecen en los cuerpos florales como pequeñas rayas de color café oscuro sobre los pétalos (Sreenivasaprasad *et al.*, 1993). En frutos existen dos tipos de lesiones, las activas y las lesiones en costra, las lesiones activas inician como pequeñas manchas de color café-oscuro, las cuales conforme se unen, presentan ligero hundimiento; las lesiones en costra son normalmente pálidas ligeramente hundidas y después tienen anillos concéntricos de acérvulos negros (Masaba y Waller, 1992). En los bordes o en las puntas de las hojas se presentan manchas irregulares de color café oscuro, las ramas se necrosan y secan (CENICAFE, 1992).

Epidemiología

Las temperaturas mínimas y máximas óptimas para la germinación son de 22° y 30°C respectivamente y se requiere de 15°C para la formación de lesiones, aunque hay registros que sugieren que la infección puede ocurrir hasta temperaturas inferiores a los 10°C. La germinación de esporas y la formación de apresorios puede ocurrir con 5 horas de temperatura óptima (Waller *et al.*, 2007).

Manejo de la enfermedad

Se debe llevar un enfoque más preventivo que curativo debido a que las prácticas culturales realizadas están orientadas a evitar que la enfermedad alcance un nivel de daño económico (Reyes, 2006)

Se recomienda que después de la cosecha se realice una poda para permitir la aeración, eliminar las ramas viejas y delgadas originadas de tallos ramificados, debido a que son más susceptibles a la enfermedad que los tallos jóvenes (Gekone, 2013). En cuanto a la fertilización química se recomienda basarse en el análisis de suelo de los cafetales afectados por dicha enfermedad, y hacer énfasis en corregir las deficiencias de los elementos mayores como fósforo y potasio (Reyes, 2006).

Existen diversos productos que han demostrado tener un buen efecto de control de la enfermedad, entre los fungicidas sintéticos se pueden utilizar productos sistémicos como el silvacur, u otros productos de la familia de los triazoles, de igual forma se recomienda el uso de sulfato de cobre llamado caldo bordelés o caldo sulfocálcico; se usan en dosis comerciales y deben ser aplicados únicamente cuando la enfermedad ha sobrepasado los niveles críticos (FUNICA, s.f., Gutiérrez *et al.*, 2003).

Marchitez vascular *Fusarium* spp.

El hongo puede invadir la planta ya sea con el tubo germinativo o el micelio penetrando las raíces, una vez dentro de la planta, el micelio crece intercelularmente a través del tejido cortical. El micelio permanece en los conductos del xilema donde usualmente avanza la infección en dirección de la corona del tallo (Cook y Baker, 1983).

Etiología

El género *Fusarium* pertenece al phylum Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hipocreales y familia Nectriaceae (Tucuch, 2017). Produce tres tipos de esporas asexuales: las microconidias son de una o dos células y son las más abundantes, las macroconidias son formadas por tres a cinco células, curvadas en forma de media luna; y clamidosporas, son esporas redondas de una o dos células y de paredes gruesas producidas sobre el micelio viejo o en las macroconidias (Agrios, 1995).

Síntomas

Las raíces principales de las plántulas jóvenes muestran una mancha café oscuro con fisuras longitudinales provocando que la epidermis de la raíz se desprenda fácilmente (Girón, 1990). El crecimiento del hongo dentro del tejido vascular de la planta afecta el transporte de agua, esto induce el cerrado de los estomas de las hojas por lo que estas se marchitan y la planta muere (Agrios, 1995).

Epidemiología

El hongo puede sobrevivir como saprófito en el suelo, sobre tejidos de plantas o sobre materia orgánica muerta (Castaño, 1994). Los factores ambientales que favorecen el desarrollo de la enfermedad son una alta humedad relativa de 80%, temperaturas de 24 a 26°C, deficiencias nutricionales y mucha sombra (Procafe, 1998). El hongo puede sobrevivir como micelio o en sus tres diferentes tipos de esporas (Agris, 1995).

Manejo de la enfermedad

Se recomienda subir el pH entre 6.5 y 7.5 y emplear una fuente de nitrógeno en forma de nitrato en lugar de amoniacal (Jones *et al.* 1982), se recomienda realizar enmiendas de cal y solarización (Toruño, 1999), mantener la sanidad del cultivo, retirando plantas enfermas, residuos de podas, frutos enfermos, residuos de cosecha y evitar los residuos de malezas (Neshev, 2008) y realizar la desinfección correcta de herramientas, así como el uso de material de siembra limpio (Rutherford, 2006); otra forma de manejo es mediante el control biológico con el uso de endomicorrizas (Mariscal, 1996) y *Trichoderma* spp. (Harman, 1996). Los pesticidas químicos también se han sugerido como medida de control (Rutherford, 2006), el uso de fungicidas sistémicos como el benomil, de forma preventiva, también se recomiendan fungicidas como: captan, dazomet, clorotalonil (Mora, 2001).

***Cladosporium* spp.**

Es un fitopatógeno generalmente foliar, que puede ocasionar daños a cultivos de interés económico (Tendal y Madsen, 2011). Entre las enfermedades más comunes provocadas por este género se encuentran las costras, la cladosporiosis, manchas marrones y el punto negro que produce la acumulación de micotoxinas, lo que provoca la reducción del rendimiento de los cultivos (Kryczyński y Weber, 2011). En el caso del cultivo del café, no existen reportes de que afecte la calidad y la producción, sin

embargo, se ha reportado que este hongo puede presentar alta incidencia como saprofito cuando el fruto ha alcanzado su estado de madurez (Pereira *et al.*, 2005).

Importancia del Uso de Extractos Para el Control de Fitopatógenos

En la agricultura los primeros agroquímicos que se usaron fueron polvos o extractos de plantas y se utilizaron antes del surgimiento de los compuestos orgánicos sintéticos en la primera mitad del siglo XX; algunas de esas plantas fueron el tabaco, el crisantemo y la rotenona que fueron usadas contra distintos insectos plaga (Montes, 2009).

Puente *et al.* (2005) sostienen que el uso indiscriminado de pesticidas en las prácticas agrícolas ha causado contaminación ambiental, problemas a la salud humana y productos agrícolas inseguros. Por tal motivo es necesario desarrollar nuevos sistemas de manejo integrado basados en productos naturales de plantas, que reduzcan la dependencia de los productos sintéticos (Celis *et al.*, 2008).

Los extractos de origen vegetal se caracterizan por la presencia de determinados metabolitos secundarios los cuales forman parte de las estrategias defensivas de las plantas, y que pueden ser agrupados en compuestos nitrogenados, fenólicos y terpenoides, los cuales le dan la capacidad de ser antivirales, antimicrobianos, repelentes y antifúngicos (Philogene *et al.*, 2004). Como ejemplos tenemos el uso del tallo de *Cereus deficiens* (Cactaceae) para el control *in vitro* de diez hongos fitopatógenos crecidos en PDA; de igual forma se han utilizado metabolitos obtenidos del follaje *Lantana trifolia* L. para el control de malezas en diversos cultivos, así también se han evaluado extractos de diez especies diferentes de la familia Piperaceae para determinar su efecto insecticida sobre *Spodoptera frugiperda* (Celis *et al.*, 2009).

Recientemente se han explotado las diversas metodologías de extracción de propiedades antifúngicas de las plantas y se ha experimentado para crear técnicas integrales buscando así mejorar la producción de alimentos inocuos y la protección ambiental (Villa *et al.*, 2015).

Importancia del Control Biológico de Fitopatógenos

El uso indiscriminado de agroquímicos, en la agricultura convencional, han provocado problemas de contaminación del medio ambiente (suelo, aire y agua), de ahí que, la búsqueda de alternativas que contribuyan a una producción agrícola libre de agroquímicos es una opción que puede hacer sostenible su producción (Nina *et al.* 2011). Una de estas alternativas es el control biológico, esta constituye una práctica ampliamente difundida y sigue siendo objeto de investigación y desarrollo (Celis *et al.*, 2008).

Entre los agentes de control biológico más estudiados se encuentran los microorganismos pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Trichoderma* y *Bacillus* (Whipps, 2001). Estos dos últimos son considerados como una de las mejores opciones para el desarrollo de bioproductos aplicables en el campo para el control de enfermedades de origen fúngico (Reinoso *et al.*, 2007).

Importancia de Especies de *Trichoderma*

Los hongos antagonistas sobresalen en el control biológico de los fitopatógenos. En este sentido, el género *Trichoderma* es de los que más destacan (Infante *et al.*, 2009). Este género es un excelente modelo para ser estudiado debido a su fácil aislamiento y cultivo, rápido desarrollo en varios sustratos y por su condición de controlador biológico de una amplia gama de fitopatógenos (Fernández, 2001).

Las diferentes especies de *Trichoderma* se caracterizan por ser hongos saprófitos, los cuales son capaces de descomponer materia orgánica y en determinadas condiciones pueden ser anaerobios facultativos, lo que les permite mostrar una mayor plasticidad ecológica (Rodríguez, 1990).

En cuanto a la acción biocontroladora de *Trichoderma* se han descrito diferentes mecanismos de acción que regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos; los

principales son la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, los que tienen una acción directa frente al hongo fitopatógeno (Lorenzo, 2001). *Trichoderma* produce endoquitinasa y enzimas que le dan la capacidad de consumir hongos patógenos en un proceso llamado micoparasitismo (Mora, 2001). El micoparásito crece sobre el contenido de las hifas del patógeno (Harman, 1996), produciendo B-(1-3) glucanasa y quitinasa lo que causa exolisis, que consiste en la disolución de la pared y membrana celular seguido por derrame del contenido celular de la hifa del patógeno lo cual provoca la muerte (Cook y Baker, 1983). Además, produce sustancias de tipo antibiótico como tricodermin y harzianopiricona que causan un efecto antagónico sobre el fitopatógeno (Mora, 2001).

Importancia de *Bacillus* spp.

El género *Bacillus* fue reportado por primera vez por Cohn en 1872 quien lo describió como bacterias productoras de endosporas resistentes al calor (Maughan y Van der Auwera, 2011). Muchas de las especies pertenecientes a este género han demostrado tener actividad antagónica contra diversos microorganismos fitopatógenos de cultivos agrícolas, tales como maíz, arroz y frutales, entre otros (Wang *et al.* 2014). Bravo (2004) reporta que también tiene la capacidad de producir proteínas con actividad insecticida que actúan contra organismos de diferentes órdenes. *Bacillus* no sólo produce compuestos antibacteriales sino también antifúngicos entre dichos compuestos se encuentran la subtilina y antibióticos de la familia de las iturrinas (Santander, 2012). *Bacillus* spp. produce diversas clases de antibióticos como son la bacilomicina, fungimicina, micosubtilina y zwittermicina, los cuales son efectivos en suprimir el crecimiento de patógenos *in vitro* y/o *in situ*, este género posee diferentes modos de acción entre las que se encuentran la competencia por nutrientes, vía antibiosis, sitios de exclusión e infección, parasitismo y/o inducción de resistencia (Carreras, 2011).

Dentro de los bioproductos microbianos disponibles comercialmente, *Bacillus* es el género más explotado en la biotecnología agrícola, con un 85%, esto debido a su gran

versatilidad metabólica que le permiten llevar a cabo el control biológico de plagas y enfermedades por diversos mecanismos (Ongena y Jaques, 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Lo muestreos se realizaron durante el mes de abril de 2019 en una finca de café del municipio de Villa Talea de Castro, ubicado en la Sierra Norte del estado de Oaxaca, en las coordenadas 17°21' 42" Norte y 96°14'54" O, a una altura de 1663 msnm. Dicho municipio tiene una precipitación anual de 1,748 mm siendo el mes de enero el más seco y el de julio el más lluvioso, la temperatura media es de 18.5 °C y el mes más caluroso es el de abril con 21.1 °C.

El muestreo se realizó recolectando cinco hojas y fruto por cada estrato foliar de la planta (parte alta, parte media y parte baja), obteniendo un total de 15 muestras de hoja y seis frutos por planta. Dichas muestras se tomaron de plantas que presentaban síntomas de enfermedades causadas por hongos en fruto, tallo y hoja, en el caso de la raíz se colectó una parte de estas que eran las de absorción ya que son las de nuestro interés para analizar y observar que enfermedades pudieran estarla afectando. Las muestras se depositaron en bolsas de plástico que fueron etiquetadas con el número de muestra, estrato al que correspondía, así como la fecha y lugar de muestreo; a continuación, se colocaron en una hielera para su traslado a el laboratorio, donde se conservaron en el refrigerador hasta su análisis.

Aislamiento y Purificación

El proceso de diagnóstico consistió en el aislamiento, purificación e identificación de los hongos fitopatógenos presentes en las muestras colectadas. El aislamiento del hongo se realizó de las muestras que presentaban síntomas de enfermedad. Las muestras fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 3 min, se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril y se dejaron secar sobre papel sanita estéril bajo condiciones asépticas. Posteriormente se sembraron en cajas

Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). Las cajas fueron identificadas y en seguida se incubaron a $24^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, después de un periodo de 24 a 48 h se revisaron para observar el desarrollo del hongo; este procedimiento se repitió para cada una de las muestras de tallo, hoja, fruto y raíz.

Una vez que se observó el crecimiento de los diferentes hongos, se procedió a realizar la purificación de estos, para lo cual se tomó con la ayuda de una aguja de disección el borde del crecimiento de micelio de la colonia, transfiriéndolo en otra caja de Petri con medio PDA, y se incubó nuevamente a una temperatura de $24^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se realizaron purificaciones de estos hongos por punta de hifa y por aislamientos monospóricos con la finalidad de obtener las diferentes cepas de hongos y realizar su identificación.

La identificación de los organismos se realizó observando estructuras morfológicas, en el caso del género *Cladosporium* se identificó utilizando las claves de Barnett y Hunter (1998), y para los géneros de *Colletotrichum* y *Fusarium* con las claves de Abad (2002) y de Leslie y Sumerrel (1990) respectivamente.

Actividad Antifúngica de Productos Biológicos y Naturales Para Control de *Colletotrichum* sp.

Se realizaron cinco bioensayos para determinar la actividad anti fúngica de productos biológicos de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma yunnanense* y un extracto de *Viscum album*.

Actividad Antifúngica de Metabolitos Secundarios de *Bacillus*, *Trichoderma* y de Extracto de *V. album* Contra *Colletotrichum* sp.

Las especies de *Trichoderma* y *Bacillus* utilizadas para la elaboración de los bioensayos fueron proporcionadas por el laboratorio de Micología y Biotecnología del

Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, estas fueron codificadas con las claves de BAN1 (*B. subtilis*), BAN2 y BAN3 (*B. licheniformis*); TAN1 (*T. yunnanense*), TAN2 (*T. asperellum*), TAN3 (*T. lignorum*) y por último el extracto VA (*V. álbum*).

Producción de Metabolitos Secundarios de *Bacillus* y *Trichoderma*

Los metabolitos de *Bacillus* y *Trichoderma* se produjeron en medios de cultivo líquido con la siguiente composición: infusión de 350 g de papa por litro de agua, 3.5 g de extracto de levadura, 3.5 g de malta, 15 g de azúcar y 0.1 g de cloruro de calcio. Para el caso de *Bacillus* spp. los medios de cultivo se inocularon con una asada de un cultivo de 24 h; mientras que en el caso de *Trichoderma* spp. se inocularon con 50 µL de una suspensión de esporas con una concentración de 1×10^8 . Los matraces se mantuvieron en agitación a 125 rpm durante 120 h (Shaker VWR, modelo 3500); posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min y se filtró con una membrana de nitrocelulosa (0.2 µm) (Ragazzo, 2011).

Obtención del Extracto Vegetal de *V. album*

El extracto de *V. album* utilizado para la elaboración de los bioensayos fue proporcionado por el laboratorio de Micología y Biotecnología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Actividad Antifúngica de Metabolitos Secundarios de Especies de *Bacillus*, *Trichoderma* y de Extracto de *V. album* Contra *Colletotrichum* sp. por el Método de Microdilución en Placa.

Para el establecimiento de este bioensayo se utilizó la metodología propuesta por Masoko *et al.* (2005), adaptada de acuerdo a los tratamientos a emplear. Se realizaron

tres repeticiones; los tratamientos utilizados fueron los metabolitos secundarios de *B. licheniformis* (BAN2 y BAN3), *B. subtilis* (BAN1), *T. asperellum* (TAN2), *T. lignorum* (TAN3), *T. yunnanense* (TAN1), y por último el extracto de *V. album* (VA). Para ello se utilizaron placas de Elisa con 96 pocillos (Figura 2).

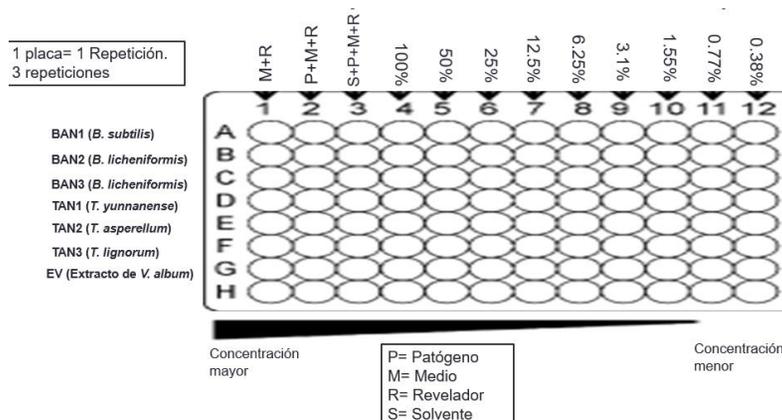


Figura 2. Distribución de los tratamientos y concentraciones dentro de la microplaca.

El procedimiento para realizar el bioensayo de microdilución en placa se describe a continuación:

1. Se depositaron 100 μ L del medio Sabouraud en cada uno de los pocillos de la microplaca.
2. La columna número uno fue el control negativo, la columna dos el control con el patógeno y la columna número tres contenía el solvente, patógeno y el revelador.
3. De la columna número cuatro a la doce se agregaron los tratamientos estudiados (concentraciones).
4. A partir de la columna cuatro se colocaron 100 μ L de cada uno de los tratamientos hasta llegar a la fila G (Figura 2).
5. Con la ayuda de la micropipeta multicanal se mezclaron tres veces dichos tratamientos, posteriormente se tomaron 100 μ L y a partir de dicha columna y se transfirieron a la siguiente columna, así sucesivamente hasta llegar a la columna

12, se desecharon los 100 µL sobrantes, de esta forma se obtuvieron diluciones seriadas al 50% (Figura 2).

6. Se añadieron 40µL del revelador (cloruro de trifenil tetrazolio) en cada uno de los pocillos.
7. Se tomaron 10 µL de la solución de esporas del fitopatógeno (*Colletotrichum* sp.) a una concentración de 1×10^8 , a partir de la columna 2 se añadió dicha solución a cada uno de los pocillos excepto a la columna 1 la cual sirvió de testigo negativo.
8. Se incubó a una temperatura de $24^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ por 48 h.
9. Transcurridas las 48 h. se realizó la lectura de absorbancia a 490 nm en un espectro fotómetro Multiskan Go (Thermo Scientific). Se consideró crecimiento positivo del hongo a los tratamientos donde el pozo presentó un color rosado y negativo a los que no presentaron ningún color, además de sus respectivos valores de absorbancia.

A partir de los resultados obtenidos en la lectura, se obtuvo la CI_{50} y se calculó el porcentaje de inhibición de cada uno de los tratamientos frente a *Colletotrichum* sp. utilizando la fórmula citada por Tucuch *et al.* (2018):

$$\% \text{ de crecimiento} = [(A-B) / C] * 100$$

Donde:

A= Absorbancia del tratamiento.

B= Absorbancia del testigo negativo.

C= Absorbancia del testigo positivo.

% inhibición= 100 - % de crecimiento.

Actividad Antagónica de *Trichoderma* Contra *Colletotrichum* sp. por el Método de Cultivos Duales.

La evaluación del antagonismo de las especies de *Trichoderma* contra *Colletotrichum* sp. se analizó mediante la técnica de cultivos duales, para lo que se empleó la metodología propuesta por Cherif y Benhamou (1990). El bioensayo se estableció con tres tratamientos de las especies *T. asperellum* (TAN 2), *T. lignorum* (TAN 3) y *T. yunnanense* (TAN 1) con seis repeticiones cada uno y un testigo absoluto. En cajas Petri con PDA se depositó en un extremo un disco de 5 mm de diámetro con micelio activo previamente crecido en PDA de colonias del fitopatógeno de seis días y en el otro extremo se colocó un disco de micelio y PDA de 5 mm de diámetro con *Trichoderma*. Las cajas se incubaron a $27^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ y se observaron cada 24 h para registrar el número de días al primer contacto entre el antagonista y el fitopatógeno, se midió el crecimiento de ambas colonias (cm) y el diámetro de intersección y/o traslape (cm). Para determinar la actividad antagónica se utilizó la escala propuesta por Bell *et al.* (1982) la que consta de cinco clases y son las siguientes:

Clase 1: *Trichoderma* sobrecrece completamente el patógeno y cubre toda la superficie.

Clase 2: *Trichoderma* sobrecrece al menos dos tercios de la superficie.

Clase 3: *Trichoderma* y el patógeno colonizaron aproximadamente la mitad de la superficie (más de un tercio y menos de dos tercios) y ninguno de los organismos parece dominar al otro.

Clase 4: el patógeno coloniza al menos dos tercios de la superficie y parece resistir la invasión de *Trichoderma*.

Clase 5: el patógeno sobrecrece completamente a *Trichoderma* y ocupa toda la superficie.

Se consideró que *Trichoderma* es antagonista del patógeno cuando la media de la escala obtenida es ≤ 2 y no antagonista cuando ≥ 3 (Bell *et al.*, 1982).

Actividad Antagónica de Metabolitos Volátiles de Especies de *Trichoderma* Contra *Colletotrichum* sp.

Este bioensayo consistió en determinar la actividad antagónica de metabolitos volátiles producidos por las especies de *Trichoderma* contra *Colletotrichum* sp. Para esto se utilizó la metodología propuesta por Dal Bello (1992) y Osorio *et al.* (2016). El bioensayo se estableció utilizando cajas Petri con medio PDA, se depositó una porción de medio de cultivo de 5 mm de diámetro con micelio de *Trichoderma* y se incubó a $24^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por un día. Por otra parte, se perforó la tapa de las cajas Petri con especies de *Trichoderma* con la ayuda de un sacabocados de 1.5 cm de diámetro bajo condiciones asépticas y se unió a la caja Petri que contenía el crecimiento de *Colletotrichum* sp. (la caja Petri en la cual se depositó el hongo fitopatígeno se colocó sin tapa) y enseguida se selló con Clean pack. La caja Petri que contenía el patógeno se colocó en la parte inferior las primeras 24 h para que el disco de 5 mm se adhiriera al medio de cultivo con su micelio y evitar así que el disco cayera por el orificio de la caja Petri inoculada con especies de *Trichoderma*. Posteriormente se invirtieron las placas, para permitir que los compuestos volátiles producidos por las cepas de *Trichoderma* circularan por el orificio de la caja donde se depositó el disco del fitopatígeno. Se realizaron tres tratamientos con seis repeticiones cada uno y un testigo absoluto. Los datos se tomaron hasta que el testigo absoluto llenó por completo la caja Petri. Finalmente se calculó el porcentaje de inhibición, utilizando la siguiente fórmula:

% de inhibición micelial= $[(D1-D2) / D1] * 100$; donde:

D1= Diámetro de la colonia de *Colletotrichum* sp. en cajas con PDA libre de *Trichoderma* (Testigo absoluto).

D2= Diámetro de la colonia de *Colletotrichum* sp. creciendo con *Trichoderma*.

Actividad Antagónica de *Bacillus* Contra *Colletotrichum* sp.

Se comprobó la actividad antagónica de la cepa de *Bacillus* con mejor porcentaje de inhibición obtenido en la prueba de micro dilución en placa. Este bioensayo se realizó mediante la técnica de cultivo dual propuesta por Velasco *et al.* (2016). Para esto se colocó un disco con micelio del patógeno en el centro de la caja de Petri con PDA, posteriormente la bacteria se inoculó a través de una asada en los cuatro puntos cardinales de la caja de Petri. Se realizó un tratamiento con seis repeticiones y un testigo absoluto. Las cajas se incubaron a $24^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, y se efectuaron mediciones hasta que el testigo absoluto cubrió toda la caja Petri. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial se calculó mediante la fórmula siguiente:

$\text{PICR} = \left[\frac{(R1-R2)}{R1} \right] * 100$; donde:

R1= crecimiento radial del patógeno (diámetro en centímetros)

R2= Diámetro de la colonia en la placa tratada (centímetros).

Actividad Antifúngica de Extracto de *V. album* Contra *Colletotrichum* sp.

Finalmente se determinó la actividad anti fúngica del extracto de *V. album* utilizando la técnica de medio envenenado empleada por Ochoa *et al.* (2018), con la finalidad de corroborar la CI_{50} obtenida en el bioensayo de microdilución. Se emplearon cinco concentraciones, 12.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm y 200 ppm, con seis repeticiones y un testigo absoluto. El extracto se agregó al medio PDA estéril y se homogenizó antes del vaciado en las placas; una vez que el medio solidificó, se tomó un disco con micelio de *Colletotrichum* sp. y se colocó en el centro de las cajas con medio envenenado. Las cajas se incubaron a $24^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ y se midió el crecimiento radial del micelio cada 24 h hasta que el testigo absoluto llenó la caja Petri. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial, empleando la siguiente fórmula:

PICR= $[(R1-R2) / R1] * 100$; donde:

R1= crecimiento radial del patógeno (diámetro en centímetros).

R2= Diámetro de la colonia en la placa tratada (centímetros).

Análisis Estadístico

Para los bioensayos de microdilución en placa y medio envenenado se determinó la CI_{50} mediante análisis Probit y posteriormente con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza mediante pruebas de Tukey ($P < 0.5$). En el caso de los bioensayos de cultivos duales de *Trichoderma* y *Bacillus*, así como de metabolitos volátiles se realizó un análisis de varianza mediante prueba de medias de Tukey ($P < 0.5$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados de Muestreo y Aislamiento

Al realizar los aislamientos de las muestras colectadas se obtuvieron cuatro géneros de hongos fitopatógenos, los cuales se encuentran reportados como agentes causales de enfermedades que afectan al cultivo de café; estos fueron *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp. y *Hemileia vastatrix* (Rodríguez, s.f).

En el caso de *Cladosporium* sp., este presentó manchas color oscuras en el haz de las hojas y puntos oscuros, en medio de cultivo PDA se observó crecimiento de micelio aterciopelado color gris oscuro con bordes irregulares y crecimiento lento, en las características microscópicas se observaron conidióforos largos, oscuros, ramificados cerca del ápice; conidios unicelulares o bicelulares, de forma ovoide, pigmentados, en cadenas ramificadas, lo que coincide a lo señalado por Barnett y Hunter (1998). *Colletotrichum* sp. se obtuvo a partir de fruto con lesiones ligeramente hundidas y oscuras, y de manchas irregulares color cafesuscas en el ápice de la hoja. En el medio de cultivo el hongo presentó colonias algodonosas oscuras a grises y oscuras en el reverso, de color anaranjado en el centro de la colonia y margen entero, microscópicamente se observaron hifas simples con conidios rectos, cilíndricos aseptados y obtusos en el ápice de 12.5 x 4.0 μm en promedio, presentó acérvulos separados en forma de disco con setas oscuras y conidióforos simples y elongados, lo que coincide con la descripción dada para este género por Abad (2002) y Rojo *et al.* (2017). Por otro lado, *Fusarium* sp. se aisló de síntomas de pudrición radical y daño en el interior del tallo donde se observaron coloraciones oscuras. El hongo presentó micelio algodonoso de color morado en medio PDA y al ser cultivado en medio Clavel-Agar se observaron microconidios abundantes de una célula, macroconidias de tres septos en forma de media luna de 27.60 x 3-5 μm y clamidiosporas, estas características son similares a las reportadas para este género por Leslie y Sumerrel (1990). Finalmente *H. vastatrix* presentó lesiones polvosas color amarillo en el envés de las hojas y urediniosporas microscópicas reniformes, rugosas en la cara externa de

tamaño de 30 x 20 µm en promedio, lo que concuerda con la descripción citada por Talhinhos *et al.* (2017).

Actividad Antifúngica de Metabolitos Secundarios de Especies de *Bacillus*, *Trichoderma* y del Extracto de *V. album* Contra *Colletotrichum* sp. por el Método de Microdilución en Placa.

Los resultados del bioensayo para determinar la actividad antifúngica de metabolitos secundarios de especies de *Bacillus* y *Trichoderma*, así como del extracto vegetal de *V. album*, mostraron que las CI₅₀ obtenidas con los diferentes tratamientos variaron de 2.45 a 42.47 ppm (Cuadro 3) correspondientes a los tratamientos BAN3 y BAN1 respectivamente; las especies de *Trichoderma* mostraron baja actividad inhibitoria sobre el fitopatógeno. El análisis de varianza demostró diferencia significativa entre tratamientos, indicando que todos los tratamientos fueron diferentes entre sí. Las CI₅₀ más bajas se observaron con los tratamientos BAN3 (*B. licheniformis*), BAN2 (*B. licheniformis*) y VA (extracto de *V. album*) con 2.45%, 8.88% y 24.73 ppm respectivamente. En relación al porcentaje de inhibición el extracto vegetal de *V. album* (VA), inhibió 94.54% el crecimiento del hongo a 62.50 ppm y la especie de *B. licheniformis* (BAN3) el 100% a 6.25%; siendo estos tratamientos los que presentaron mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum* sp. (Figura 3).

El efecto antifúngico de *B. licheniformis* ha sido demostrado por otros autores como lo señala Jiménez *et al.* (2018) quienes señalaron que la especie *B. licheniformis* puede inhibir al 100% el desarrollo de *Venturia inaequalis* con metabolitos secundarios a una concentración de 25%. Esta actividad puede ser atribuida a la síntesis de surfactinas, iturrinas y fengicinas (Ongena y Jacques, 2008). La actividad antifúngica de los metabolitos secundarios ocasiona en los hongos cambios fisiológicos como la disrupción de la pared celular e inhibición en el desarrollo de conidios (Tucuch *et al.*, 2018).

Cuadro 3 Concentración inhibitoria al 50% (CI₅₀) de los diferentes tratamientos contra *Colletotrichum* sp.

Tratamiento	CI ₅₀ **
BAN1 (<i>B. subtilis</i>)	42.47 d
BAN2 (<i>B. licheniformis</i>)	8.88 f
BAN3 (<i>B. licheniformis</i>)	2.45 g
TAN1 (<i>T. yunnanense</i>)	*
TAN2 (<i>T. asperellum</i>)	*
TAN3 (<i>T. lignorum</i>)	*
VA (Extracto vegetal de <i>V. album</i>)	24.73 e

** = valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$)

* = las especies de *Trichoderma* mostraron baja actividad inhibitoria.

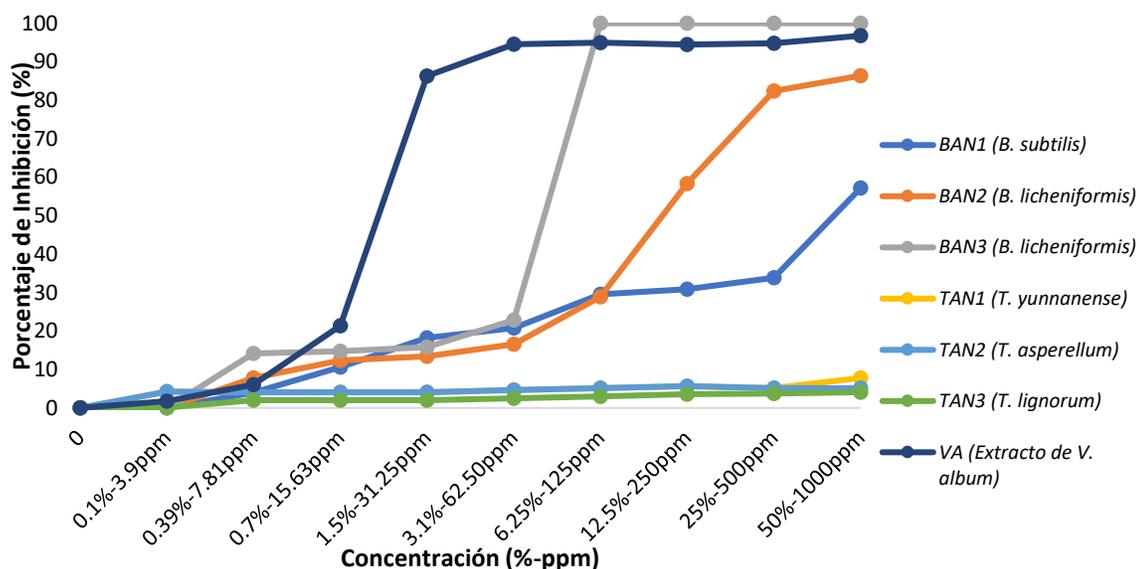


Figura 3 Porcentaje de inhibición de los diferentes tratamientos contra *Colletotrichum* sp. **ppm para *V. album* y % para especies de *Bacillus* y *Trichoderma*.

Actividad Antagónica de Especies de *Trichoderma* Contra *Colletotrichum* sp. por el Método de Cultivos Duales.

Los resultados obtenidos en este bioensayo indican que el crecimiento de las especies de *Trichoderma* al momento de hacer contacto con el fitopatógeno osciló entre 4.68 y 4.98 cm. Los días a contacto entre las especies de *Trichoderma* y *Colletotrichum* sp. presentó una diferencia estadística (Cuadro 4), siendo de dos días en *T. yunnanense* y de tres días para *T. asperellum* y *T. lignorum*.

Cuadro 4. Efecto de las diferentes especies de *Trichoderma* sobre el crecimiento micelial de *Colletotrichum* sp. en cultivo dual y producción de metabolitos volátiles

Tratamiento	Días a contacto ¹	Escala de Bell ²	Compuestos volátiles ^{1,2}
TAN1 (<i>T. yunnanense</i>)	2 b	2 a	7.54 b
TAN2 (<i>T. asperellum</i>)	3 a	1 b	15.38 c
TAN3 (<i>T. lignorum</i>)	3 a	2 a	24.02 d

1= valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$)

2= se refiere a porcentaje de inhibición de *Colletotrichum* sp.

De acuerdo a la escala de Bell *et al.* (1982) las especies de *Trichoderma* de este bioensayo se ubican en las clases 1 y 2, con diferencia estadística entre la especie TAN2 (*T. asperellum*) y las otras especies (Cuadro 4). La especie de TAN2 fue la que presentó mayor actividad antagónica contra *Colletotrichum* sp. al colonizar por completo la caja Petri en 3 días alcanzando la clasificación 1 en la escala de Bell *et al.* (1982), mientras que las especies restantes no colonizaron por completo al patógeno por lo que se colocaron en la clase 2; las tres especies se consideran antagónicas ya que sus promedios mediante la escala de Bell *et al.* (1982) fueron ≤ 2 .

La habilidad de las especies de *Trichoderma* para inhibir el crecimiento de *Colletotrichum* sp. en cultivos duales varió entre las especies utilizadas, los resultados del estudio indican que la capacidad antagónica puede ser atribuida al potencial antagónico que pueda tener cada especie (Hernández-Castillo *et al.*, 2011). Al respecto Flores (2016) observó que de varios organismos antagónicos *T. harzianum*

presentó clasificación de 2 en escala de Bell *et al.* (1982) sobre *C. gloesporoides*; en adición Hernández-Castillo *et al.* (2011) probaron 41 aislados de diferentes especies de *Trichoderma* contra *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia cepivorum* agrupando las especies de *Trichoderma* dentro de la clase 1 y 2, tardando de dos a tres días en hacer contacto con el fitopatógeno.

La alta capacidad de *Trichoderma* puede ser atribuida a la fácil adaptación que presenta en diferentes sustratos y medios de cultivo, volviéndolo un organismo eficiente en el control biológico de enfermedades ya que presenta alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y por la producción de enzimas, dentro de las que destacan las glucanasas, quitinasas y proteasas (Fernández y Suárez, 2009; García *et al.*, 2016). Aunado a esto también posee diferentes mecanismos de acción, entre los que resaltan el mico parasitismo, la competencia por el sustrato y nutrientes, y la actividad antibiótica producida por metabolitos que inhiben la actividad parasítica de los fitopatógenos (Hidalgo, 1999).

Actividad Antagónica de Metabolitos Volátiles de Especies de *Trichoderma* Contra *Colletotrichum* sp.

En este bioensayo se observó actividad antifúngica de los metabolitos volátiles de especies de *Trichoderma*, los que provocaron efecto inhibitorio en el crecimiento micelial de *Colletotrichum* sp. El análisis de varianza muestra diferencia estadística entre las especies estudiadas (Cuadro 4). La inhibición máxima obtenida por los compuestos volátiles fue de 24.02% con TAN3 seguida de TAN2 con 15.38%. En este sentido Sanmartín *et al.* (2012) reportan que el efecto antagónico de metabolitos volátiles producidos por *T. asperellum* sobre el crecimiento micelial de *C. gloesporoides* osciló entre 24% y 37%; en tanto que Hernández-Castillo *et al.* (2011) observaron que *T. longibrachiatum* produjo metabolitos volátiles capaces de inhibir el desarrollo micelial de *S. sclerotiorum* y *S. cepivorum* en 31.5% y 59.2% respectivamente. Esta capacidad de inhibir el desarrollo de hongos fitopatógenos de

plantas por parte de las diferentes especies de *Trichoderma* puede ser atribuido a la producción de 6-pentil- α -pirona (Hernández *et al.*, 2011).

Actividad Antagónica de *B. licheniformis* Contra *Colletotrichum* sp.

La actividad antagónica de la especie BAN 3 de *B. licheniformis* por el método de cultivos duales, mostró inhibición del 50% del crecimiento micelial del hongo (Figura 4). Los resultados obtenidos en el presente estudio son inferiores a los reportados por Ruíz *et al.* (2014) quienes al utilizar *Bacillus subtilis* obtuvieron porcentajes de inhibición de entre el 60% y 80% sobre *C. gloesporoides*; sin embargo, nuestros datos coinciden a los obtenidos por Orberá *et al.* (2009) quienes al utilizar cepas de *Bacillus licheniformis* contra *C. gloesporoides* observaron porcentajes de inhibición de 50% a 60%. Se infiere que dichos resultados pueden ser debido a que las especies de *Bacillus* poseen la capacidad de producir enzimas líticas como quitinasas, glucanasas y proteasas, las cuales degradan los principales polisacáridos que conforman la pared celular del fitopatógeno (Compant *et al.*, 2005).



Figura 4. Inhibición de *Colletotrichum* sp. por metabolitos secundarios de *B. licheniformis*

Actividad Antifúngica de Extracto de *V. album* Contra *Colletotrichum* sp.

Finalmente, al estudiar la actividad antifúngica del extracto de *V. album* (VA) por el método del medio envenenado sobre el crecimiento de *Colletotrichum* sp. se observó que la inhibición del crecimiento micelial del hongo empezó a partir de 12.5 ppm aumentando conforme se incrementó la concentración del extracto llegando al 100% de inhibición a 100 ppm (Figura 5); la CI_{50} obtenida fue de 28.61 ppm, esta fue ligeramente superior a la obtenida por el método de microdilución en placa la cual fue de 24.73 ppm (Cuadro 3). En este aspecto Akalazu *et al.* (2016) reportaron una CI_{50} de 25 ppm al utilizar extractos de *V. album* contra los hongos *Aspergillus nigger*, *Fusarium oxysporum*, *Botrydiplodia theobromae* y *Geotrichum candidum*. La actividad antifúngica por parte del extracto de *V. álbum* se puede atribuir a las viscotoxinas presentes en esta especie vegetal las cuales son péptidos que se encuentran en tallos, hojas y semillas y que han sido reportadas como citotóxicas para células de mamíferos (Giudici *et al.* 2004); sin embargo, existen pocos estudios del extracto de *V. album* sobre hongos fitopatógenos por lo que es necesario continuar realizando investigaciones en este sentido.

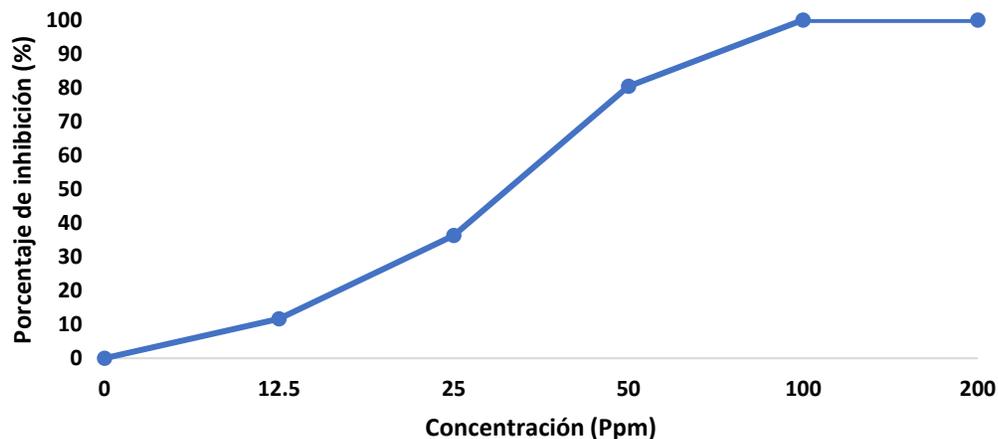


Figura 5. Porcentaje de inhibición de *V. album* frente a *Colletotrichum* sp. por medio envenenado.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales en que se desarrolló el presente bioensayo se concluye que:

En la zona productora de café de Villa Talea de Castro, Oaxaca, se encuentran asociados al cultivo hongos fitopatógenos de los géneros *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp. y la especie *H. vastatrix*.

Los metabolitos secundarios de *T. asperellum*, *T. lignorum* y *T. yunnanense* estudiados muestran baja actividad antifúngica sobre *Colletotrichum* sp. esto de acuerdo al bioensayo de microdilución en placa.

Los días a contacto entre los géneros de *Trichoderma* y *Colletotrichum* sp. varió de dos (*T. yunnanense*) a tres días (*T. asperellum* y *T. lignorum*); estas tres especies se consideran antagonistas a *Colletotrichum* sp. ya que sus promedios se ubican en <2 según la escala de Bell *et al.* (1982).

Las especies de *T. asperellum*, *T. lignorum* y *T. yunnanense* producen metabolitos volátiles que inhiben el crecimiento de *Colletotrichum* sp., teniendo mayor efecto *T. lignorum*.

Los metabolitos secundarios de *B. licheniformis* y *B. subtilis* estudiados muestran alta actividad antifúngica sobre *Colletotrichum* sp., los cuales presentan una CI₅₀ que oscila entre 2.45% y 42.47%. La especie de *B. licheniformis* (BAN3) presenta mayor actividad antagonista al inhibir un 50% el crecimiento micelial de *Colletotrichum* sp.

El extracto vegetal de *V. album* (VA) muestra actividad antifúngica al inhibir en 100% el crecimiento micelial de *Colletotrichum* sp. a 100 ppm.

LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 1995. Fitopatología. Uteha-Noriega editores. México. 838 pp.
- Akalazu, J. N, Ohazurike, N. C. y Onuoha, C. I. 2016. Antifungal activity of *Viscum Album* (African Mistletoe) leaf extract on *Dioscorea rotundata* (Poir) (White Yam) Tuber rot disease. International Journal of advances in Science in Engineering and Technology. 4:189-192.
- Alvarado S. M. y Rojas C. G. 1994. Cultivo y beneficiado del café. San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia. P. 11,14.
- Alexopoulos, C. J. y Mims, C. W. 1979. Introducción a la Micología. Eudeba. Buenos Aires. Argentina. 615 p.
- Amaya, G. R. 2009. El café: importancia del café. recuperado de <http://ecocafesal.blogspot.mx/2009/10/importancia-del-cafe.html>
- AMECAFÉ-SIAP. s.f. Padrón Nacional Cafetalero. Recuperado de <http://amecafe.org.mx/padron-nacional-cafetalero/>
- Anacafe. s.f. ¿Qué es la roya del cafeto? Asociación Nacional del Café. Recuperado de https://www.anacafe.org/glifos/index.php/12PRIN:Que_es_la_Roya
- Bartra, A. 2006. Virtudes económicas, sociales y ambientales del café certificado. El caso de la coordinadora estatal de productores de café de Oaxaca. México DF. p. 436.
- Batista, R. I. 2018. Enfermedades del cultivo del café. Componente de República Dominicana del Programa Centroamericano para la Gestión Integrada del Café. República Dominicana. P 4.
- Bell, D. K., Wells, H. D. y Markham, C. R. 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology, 72: 379-382.
- Benacchio, S.S. 1982. Algunas exigencias agroecológicas en 58 especies de cultivo con potencial de producción en el Trópico Americano. FONAIAP-Centro

- Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Ministerio de Agricultura y Cría. Maracay, Venezuela. 202 p.
- Benítez G., E. 2014. Transmisión de los precios internacionales del café y su relación con los precios que reciben los productores de la Sierra Norte de Puebla. Colegio de Postgraduados, Campus Puebla. Posgrado en estrategias para el desarrollo agrícola regional. México.
- Bravo, A. 2004. *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Colombia. 293 pp.
- Cano, F. M., Delfin, F. L., Dáz, A. M., García, L. T., González, H. R., Meneses, A. B., Oliva, Z. M., Quintana, R. J., Ramírez, J. J., Ramírez, S. J., Romero, P. E. y Sesma, B. 2004. Estudio de mercado sobre consumo de café en la ciudad de Xalapa, Veracruz. Revista IIESCA. Universidad Veracruzana. Veracruz, México. 2: 108- 127.
- Carreras, B. 2011. Aplicaciones de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* en el control de fitopatógenos. Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 12: 129-133.
- Cartay, R. y Ghérsi, G. 1996. El escenario mundial alimentario. Fundación Polar. Caracas, Venezuela. 318 pp.
- Castaño, Z. J. 1994. Principios Básicos de Fitopatología. Zamorano Academic Press. 2ed. Zamorano, Honduras. 518 pp.
- Celis, A.; Mendoza, C.; Pachón, M.; Cardona, J.; Delgado, W. y Cuca, J.L. 2008. Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Agronomía Colombiana. 26:97-106.
- Celis, A.; Mendoza, C. F. y Pachón, M. E. 2009. Uso de Extractos Vegetales en el Manejo Integrado de Plagas, Enfermedades y Arvenses. Temas Agrarios. 14: 5-16 pp.

- Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA). 2014. Producción y mercado de café en el mundo y en México. México, D.F. Pp.18.
- Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA). 2017. El café en México, diagnóstico y perspectiva. México, D.F. pp.14.
- Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA). 2019. Propuestas para reactivar la producción y comercialización de café en México 2019-2024. Ciudad de México. pp. 5-7.
- Centro Nacional de Investigación de Café (CENICAFE). 2002. La enfermedad de las cerezas del café CBD causadas por *Colletotrichum coffeanum*. Recuperado de: <http://www.infocafes.com/descargas/biblioteca/219.pdf>
- Centro Nacional de Investigación de Café (CENICAFE). 2011. Ojo de gallo o gotera del cafeto *Omphalia flavida*. Chinchiná, Caldas, Colombia.
- Centro Nacional de Investigación de Café (CENICAFE). 1992. Enfermedades foliares del cafeto. Colombia. p. 4.
- Cherif, M. y Benhamou, N. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology*, 80 : 1406-1414.
- Cinza, B., R., Visconti, A., Mennella, C., Anese, M., Fogliano, V. 2002. Chemical Characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 6527-6533.
- Clarke, R.J., Macrae, R. 1985. Coffee.: Chemistry. Reselvier. EUA. 1: 306.
- Comisión para la Cooperación Ambiental (CCA).1999. El mercado internacional del café. Ed. CCA. Montreal. pp.115.

- Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Veracruz (CESAVER). 2015. Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*). Recuperado de <http://www.cesvver.org.mx/roya-del-cafe-hemileia-vastatrix/>
- Cook, R. J. y Baker, K. F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society. St. Paulo, Minnesota. P 539.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., y Barka, E. A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and Environmental Microbiology. 71: 4951-4959.
- D'Areny. 2008. El café en Sudamérica. Forum Café. Recuperado de http://www.forumdelcafe.com/sites/default/files/biblioteca/f-34_cafe_sudamerica.pdf
- D'Areny.2004. Las enfermedades del Café. Fórum café. Recuperado de http://www.forumdelcafe.com/sites/default/files/biblioteca/f_16_enfermedades.pdf
- Dal Bello, G.M. 1992. Técnica simple de bioensayo con metabolitos volátiles producidos por especies fúngicas. Revista de la Facultad de Agronomía La Plata; 68:87-89.
- Domínguez, E. 2008. El café de México en el mundo. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. CDMX. P 56.
- Doyle, M. P., Beuchat, L. R., Monteville, T. J. 2001. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. ASM. Press. E.U.A. P 768.
- Fernández, R. D. C., Evans, H. C. y Barreto, R. W. 2009. Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. Tropical Plant Pathology, 34:108-113.
- Fernández, L. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas. 62:96-100.

- Fernández, J.; Suárez, C. 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. 62:4743-4748.
- Figuroa, H., E.; Pérez S. y L. Godínez M. s.f. La producción y el consumo del café. ECORFAN. España. P 7.
- Fisac, P.R. 2014. El mundo del café. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. pp 15-18.
- Flores, W. D. 2016. Control biológico in vitro de *Colletotrichum gloesporoides* causante de la antracnosis frente a *Clonostachys rosea*, *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma harzianum*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú. P 103.
- Fundación para el Desarrollo Tecnológico Agropecuario y Forestal de Nicaragua (FUNICA). s.f. Guía de identificación y manejo de antracnosis en café. Nicaragua. P 23.
- García, C. N.; Mamani, M. M.; Chávez, G. A. y Álvarez, M. T. 2016. Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible biocontrolador. Journal of the Selva Andina Research Society. 7: 20-32.
- Gekone, M. 2013. Pest Management decision guide: green and yellow list. Coffee Berry Disease. Plantwise-CABI. República de Kenia. P 1.
- Giudici, A. M., Regente, M. C., Villalaín, J., Pfüller, K., Pfüller, U., y De La Canal, L. 2004. Mistletoe viscotoxins induce membrane permeabilization and spore death in phytopathogenic fungi. Physiologia plantarum. 121: 2-7.
- Gómez, G. 2010. Cultivo y beneficio del café. Revista de geografía agrícola.45:103-193.
- Gómez, M. A.; Gómez, L. y Schwentesius, R. 2002. Dinámica del mercado internacional de productos orgánicos y las perspectivas para México. Revista Momento Económico 120:54-68 pp.

- Gómez, P. S. 2019. Los 10 mayores productores de café del mundo. Recuperado de <https://quecafe.info/mayores-productores-de-cafe-en-el-mundo/>
- Gutiérrez, Y.; Barrios, M.; Moraga, P. y Monzón, A. 2003. Boletín informativo N. 2. Antracnosis, seria amenaza. Grupo Café. Nicaragua.
- Harman, G. E. 1996. *Trichoderma* for biocontrol of plant pathogens: from basic research to commercialized products. In Proceedings of the Cornell Community Conference on Biological Control. Ithaca, NY. Vol. 1113.
- Hidalgo, N. 1999. Uso de *Trichoderma* spp. en combate biológico. San José. Universidad de Costa Rica. Recuperado de <http://www.ibun.unal.edu.co/r2r7e.html>
- Hernández, E. O., Castillo, D. H., Herrera, R. R., Fuentes, E. V., Drouaillet, B. E. y Santillán, A. L. 2016. Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani* *in vitro*. Investigación y Ciencia. 24: 5-11.
- Hernández, F.D., Berlanga, A. M., Gallegos, G., Cepede, M., Rodríguez, R., Aguilar, C. N. y Castillo, F. 2011. In vitro Antagonist Action of *Trichoderma* Strains Against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. American Journal of Agricultural and Biological Sciences. 6: 410-417.
- Infante, D.; Martínez, B.; González, N. y Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Revista de Protección Vegetal. Vol 24.
- Infocafé. s.f. Artículo Mancha de Hierro o Chasparría en Cafe. Recuperado de www.infocafes.com
- Infocafe. s.f. Principales consumidores de café del mundo. Recuperado de <http://www.infocafe.es/cafe/principales-consumidores-cafe.php>
- Innatia. s.f. Las condiciones ambientales en la producción de café. Consultado en: <http://www.innatia.com/s/c-produccion-cafe/a-ambiente-para-producir-cafe.html>

- International Fertilizer Industry Association (IFA). 1992. World Fertilizer Use Manual. International Fertilizer Industry Association. Paris, Francia. Pp. 37-550
- Jiménez, M. D. C.; Hernández, F. D., Alcalá, E. I. L., Morales, G. G., Valdés, R. A., y Reyes, F. C. 2018. Biological effectiveness of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. on apple scab (*Venturia inaequalis*) in vitro and under field conditions. European Journal of Physical and Agricultural Sciences. Vol 6.
- Jones, J.P.; Jones, J.B. y Miller, J.W. 1982. *Fusarium* wilt of tomato. Plant Pathology. Circular N°237. Fla. Dep. Agric. & Consumer Serv. Division of Plant Industry. 2p.
- Kryczyński S. y Weber, Z. 2011. Phytopathology. Diseases of crop plants 2: 294-298.
- Kushalapa A. C. y Eskes A. R. 1989. Advances in coffee rust research. Annual Review of Phytopathology. Pp. 503-531.
- Lorenzo, N. 2001. Prospección de hongos antagonistas en la provincia de Cienfuegos. Efectividad y posibilidades de reproducción de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. Tesis de Maestría en Protección Vegetal. Universidad Agraria de La Habana. La Habana, Cuba.
- Mariscal, A. 2011. El café orgánico de Chiapas crece a contracorriente y sin incentivo. CNN México. Recuperado en http://www.ecosur.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=1184:el-cafe-organico-de-chiapas-crece-a-contracorriente-y-sin-incentivo&catid=154:ecomedios&Itemid=1138&lang=tze
- Mariscal, E. 1996. Evaluación del efecto de las micorrizas (hongos) en almácigos de café. Investigaciones y descubrimientos sobre el cultivo de café. ANACAFE. P 93-98.
- Martínez G., E.; Sanromá G.; Rovesti L. y Palma R. 2006. Manejo Integrado de Plagas. Manual Práctico. Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV). Cuba.
- Masaba D. y Waller J. M. 1992. Coffee Berry Disease: The Current Status. Inglaterra. P. 237-249.

- Masoko, P., Picard, J. y Eloff, J. N. 2005. Antifungal activities of six south African Terminalia species (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 99:301-308
- Maughan, H. y Van der Auwera G. 2011. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*. 11: 789-797.
- Montes B. R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología*. México. 29:73-82.
- Mora, S. N. 2008. Agrocadena de café. Ministerio de Agricultura y Ganadería Dirección Regional Huetar Norte. Costa Rica. pp.5
- Mora, C. J. R. 2001. Control biológico de la pudrición radicular por *Fusarium oxysporum* en semilleros de café usando endomicorriza y *Trichoderma harzianum*. Tesis de licenciatura. Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras. P 25.
- Moreno, R. G. y Alvarado, A. G. 2000. La Variedad Colombia 20 años de adopción y comportamiento frente a nuevas razas de la roya del cafeto. Centro Nacional de Investigación del Café (Cenicafé). Chinina, Cladas, Colombia. 32 P.
- Morfin, V. A., Castillo, P. y G. Vizcaíno. 2006. El cultivo de café (*Coffea arabica* L.) en colima. Instituto de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Folleto Técnico Núm. 1. Campo Experimental Ticomán. 85 P.
- Neshev, G. 2008. Major soil-borne phytopathogens on tomato and cucumber in Bulgaria, and methods for their management. *Europa*. pp.1-22.
- Nina, R.; Smeltekop, H.; Almanza, J.C. y Loza, M.M. 2011. Evaluación de la actividad biocontroladora de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp en café (*Coffea arabica*) en condiciones experimentales. *Journal of the Selva Andina Research Society*. 2:9 p.
- Nolasco, M. 1985. Café y sociedad en México. Ed. Altadena 8. 1ª Edición. México. D.F. Pp. 11-37.

- Ochoa, Y. M.; Cerna, E.; Beltrán, B. M. y Delgado, O. J. C. 2018. Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica del extracto de *Heliopsis longipes* en cepas de *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Texcoco, México. 9: 871-877 pp.
- Ongena, M. y Jacques, P. 2008. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology. 16:115-125.
- Orberá, T. D., Serrat, M. D. J., y González, Z. 2009. Potencialidades de bacterias aerobias formadoras de endosporas para el biocontrol en plantas ornamentales. Fitosanidad, 13: 95-100.
- Organización Internacional del Café (ICO). 2019. Anuario 2017/18. P 58. Recuperado de <http://www.ico.org/documents/cy2018-19/annual-rVAiew-2017-18-c.pdf>
- Organización Internacional del Café (ICO). 2016. Aumenta el consumo mundial de café, pero los precios siguen bajos. Recuperado de <http://www.ico.org/documents/cy2015-16/cmr-0216-c.pdf>
- Osorio, E.; Hernández, F. D.; Rodríguez, R.; Varela, S. E.; Estrada, B. y López, J. A. 2016. Actividad Antagónica de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani* *in vitro*. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. 67:5-11.
- Pereira, T. G., Pfenning, L. H., y Castro, A. D. 2005. Caracterização e dinâmica de colonização de *Cladosporium cladosporoides* (Fresen.) de Vries em frutos do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Ciência e Agrotecnologia, 29: 1112-1116.
- Pérez A. P. y Echanove H. F. "Cadenas globales y café en México" cuadernos geográficos de la Universidad de Granada. 38: 69-86.
- Pérez, J. R.; Díaz, C. S. 2000. El café, bebida que conquistó al mundo. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 151 p.
- Philogene, C., Regnault, R. y Vincent, C. 2004. Productos fitosanitarios insecticidas de origen vegetal: promesas de ayer y de hoy. Biopesticidas de origen vegetal. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.

- Procafe. 1998. Manejo integrado de enfermedades en viveros de café. Fundación Salvadoreña para investigaciones del café. El Salvador. 8 p.
- Puente, M., Campos, A. y León, A. L. 2005. Efecto fungicida o fungistático de un extracto vegetal sobre plantas susceptibles al hongo fitopatógeno del suelo *Sclerotium rolfsii* Sacc. en condiciones de cultivo protegido. Memorias XVII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas (ALAM). Varadero, Matanzas, Cuba. pp 637-643.
- Ragazzo, J. A.; Robles, A.; Lomelí, L.; Luna, G. y Calderón, M. 2011. Selección de cepas de *Bacillus spp.* Productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. Revista Chapingo Serie Horticultura, 17: 5-11.
- Reinoso, Y.; Vaillant, D.; Casadesús, L.; García, E. y Álvarez, V. R. 2007. Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. Fitosanidad. 11: 35-40.
- Reyes, D. J. 2006. evaluación de alternativas para el manejo de antracnosis (*Colletotrichum spp.*) en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.) en fincas de los departamentos de Carazo, Granada y Masaya. Tesis doctoral. Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua. 72 p.
- Rivillas, O.C.; Serna, G.C.; Cristancho, A. M. y Gaitán, B. A. 2011. La roya del Cafeto en Colombia (Impacto manejos y costos del control, resultados de investigación). Centro Nacional de Investigación del Café (Cenicafe). Chinina, Cladas, Colombia. 53 p.
- Rodríguez, I. 1990. Efecto antagónico de ocho aislamientos de *Trichoderma* contra *Fusarium moniliforme* (Booth) y *Fusarium subglutinans* (Booth). Tesis al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Agraria de La Habana. Habana, Cuba.
- Rodríguez, R. y Monroig, M. F. s.f. Enfermedades del cafeto. Ecos del café. Consultado en <http://academic.uprm.edu/mmonroig/id52.htm>
- Royo, J. E. y Pérez, C. E. 2014. *Café I (G. Coffea)*. REDUCA Biología. 7: 113-132.

- Rojo, I., Álvarez, B., García, R. S., León, J., Sañudo, A. y Allende, R. 2017. Situación actual de *Colletotrichum* spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35: 549-570.
- Ruiz, E.; Mejía, M. Á.; Cristóbal, J.; Valencia, A. y Reyes, A. 2014. Actividad antagónica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporoides* (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. Texcoco, México. 5:1325-1332.
- Rutherford, M. A. 2006. Current knowledge of coffee wilt disease, a major constraint to coffee production in Africa. *Phytopathology*. St. Paulo, Minnesota. 96:663-666.
- Sanmartín, N.P.; López, X.; Pemberthy, M. P.; Granada, S. D. y Rueda, E. A. 2012. Análisis del modo de acción y de la capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre *Colletotrichum gloeosporoides* y *Fusarium* sp. *Revista Tumbaga*. 7:29-49.
- Santander, A. J. 2012. Uso de *Trichoderma harzianum* Rifai y *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn para el control de (*Colletotrichum gloeosporioides* Pens.) causante de la antracnosis en mango (*Mangifera indica* L.). Facultad de Agronomía Postgrado en Agronomía-Universidad Central de Venezuela. Venezuela. Pp 5-26.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2013. Manual operativo de la campaña preventiva contra la Roya del Cafeto. Recuperado de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/157277/Roya_del_cafeto.pdf
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2017. Recuperado de http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/Paginas/JA_C_00264_03.aspx
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2014. Situación epidemiológica de la roya del cafeto y otros riesgos fitosanitarios asociados al cultivo del café en Chiapas, Puebla y Veracruz. Informe Epidemiológico mayo 2014. México. 12 p.

- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2016. Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*). México. 23 p.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (SINAVEF). 2013. Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*). México. 28 p.
- Sreenivasaprasadl S., Averil E. y Millsl R. 1993. Coffee Berry disease pathogen in Africa: genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporoides*. The Queen's University of Belfast. Mycol. Pp 995-1000.
- Talhinhas, P.; Batista, D.; Diniz, I., Vieira, A.; Silva, D. N.; Loureiro, A.; Tavares, S.; Pereira, A. P.; Azinheira, H.; Guerra, L.; Várzea, V. and Silva, M. 2017. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology*, pp 1039-1051.
- Tendal, K. y Madsen, A.M. 2011. Exposure to airborne microorganisms, hyphal fragments, and pollen in a field of organically grown strawberries. *Aerobiologia*, 27: 13-23.
- The American Phytopathological Society (APS). 2011. Coffee rust (*Hemileia vastatrix*). Recuperado de <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/CoffeeRust.aspx>.
- Thurston H. D. 1989. Enfermedades de cultivos en el trópico. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica. P.235.
- Toruño, G. 1999. Control de *Fusarium oxysporum* en semilleros de repollo en la localidad de Mirafior, Estelí, Nicaragua, mediante el uso de solarización y enclamiento como tratamientos alternativos al uso de químicos. Tesis de licenciatura. Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras. 44 p.
- Tucuch, M. A. 2017. Actividad antifúngica de extractos vegetales y de *Bacillus* spp. para el control de *Fusarium oxysporum* en tomate bajo condiciones de invernadero. Tesis de maestría. UAAAN. Saltillo, Coahuila. 92 p.

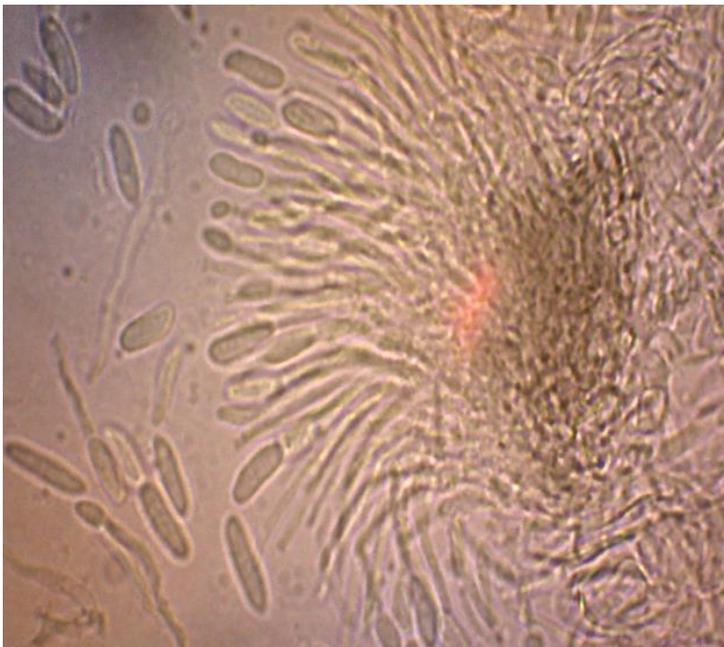
- Tucuch, M. A.; Hernández, F.D.; Arredondo, R. y Laredo, E.I. 2018. Antifungal activity of metabolites from *Bacillus* spp. against *Fusarium oxysporum* using micro dilution in plate method. *European Journal of Biotechnology and Genetic Engineering*. 5: 30 p.
- Velasco, C. R.; Cisneros, J. M. C.; Reyes, D. I. B.; Cisneros, M. F. R.; Paz, J. J. O.; Marina, M. Á. S. y Prieto, V. M. G. 2016. Identification and antagonistic activity in vitro of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 34:84-99.
- Vichi, F. 2015. La producción de café en México: ventana de oportunidad para el sector agrícola en Chiapas. *Espacio I+ D, Innovación más Desarrollo*. 4:7.
- Villa, A.; Pérez, R.; Morales, H. A.; Basurto, M.; Soto, J. M. y Martínez, E. 2015. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*. 64:194-205.
- Villaseñor A. 1987. Caficultura moderna en México. Agrocomunicación Sáenz Colín y Asociados. Estado de México, México. P 469.
- Waller, J. M.; Bigger, M. y Hillocks, R. J. 2007. *Coffee Pests, Diseases and Their Management*. British Library, London. U. K. pp 211-225.
- Wang, X.; Wang, L.; Wang, J.; Jin, P.; Liu, H., y Zheng, Y. 2014. *Bacillus cereus* AR156-induced resistance to *Colletotrichum acutatum* is associated with priming of defense responses in loquat fruit. *PLOS One*. 9 (11).
- Whipps, J. 2001. Microbial Interaction and Biocontrol in the Rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 52:487-511.

APÉNDICE

Anexo 1. Hongos asociados al cultivo de café.



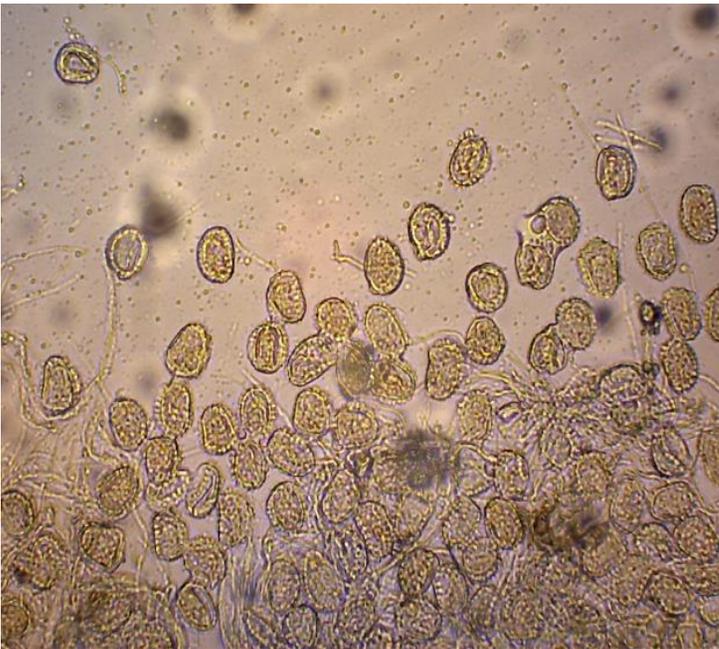
Cladosporium sp.



Colletotrichum sp.



Fusarium sp.



Hemileia vastatrix

Anexo 2. Promedio de lecturas de absorbancia del bioensayo de microdilución en placa de metabolitos secundarios de especies de *Bacillus*, *Trichoderma* y del extracto de *V. album*.

Tratamiento	1	2	3	50%	25%	12.5%	6.25%	3.10%	1.50%	0.70%	0.39%	0.10%
<i>B. subtilis</i>	0.1147	0.4723	1.0341	0.3171	0.4270	0.4414	0.4475	0.4889	0.5009	0.5369	0.5681	0.5880
<i>B. licheniformis</i>	0.0662	0.4547	1.1439	0.1791	0.1979	0.3114	0.4506	0.5088	0.5237	0.5287	0.5503	0.5940
<i>B. licheniformis</i>	0.0672	0.4833	1.0884	0.1113	0.0999	0.0855	0.1011	0.4792	0.5123	0.5175	0.5200	0.6071
<i>T. yunnanense</i>	0.1624	0.3765	1.2630	0.5502	0.5627	0.5602	0.5627	0.5652	0.5677	0.5677	0.5677	0.5672
<i>T. asperellum</i>	0.0564	0.4280	0.8855	0.5627	0.5627	0.5602	0.5627	0.5652	0.5677	0.5677	0.5677	0.5672
<i>T. lignorum</i>	0.0525	0.4758	1.1808	0.5677	0.5694	0.5702	0.5727	0.5752	0.5777	0.5777	0.5777	0.5864
<i>V. album</i>	0.0566	0.4734	1.0513	0.1300	0.1394	0.1408	0.1385	0.1405	0.1797	0.4860	0.5585	0.5787

Anexo 3. Actividad antagónica de *Trichoderma* sobre *Colletotrichum* sp. de acuerdo a la Escala de Bell *et al.* (1982).

Repeticiones	<i>T. yunnanense</i>	<i>T. asperellum</i>	<i>T. lignorum</i>
R1	2	1	2
R2	2	1	2
R3	2	1	2
R4	2	1	2
R5	1	1	2
R6	2	1	2
Promedio	1.83	1.00	2.00

Anexo 4. Análisis de varianza para el antagonismo de especies de *Trichoderma* sobre *Colletotrichum* sp. por el método de cultivo dual.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	2	2.111111111	1.055555556	7.31	0.0061
ERROR	15	2.166666667	0.144444444		
TOTAL	17	4.277777778			
C.V.	23.58984%				
Nivel de significancia	0.05				

Anexo 5. Análisis de varianza para los días a contacto entre *Colletotrichum* sp. y especies de *Trichoderma*. por el método de cultivo dual.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	2	3.44444444	1.72222222	31.00	0.0001
ERROR	15	0.83333333	0.05555556		
TOTAL	17	4.27777778			
C.V.	9.026895%				
Nivel de significancia	0.05				

Anexo 6. Inhibición del crecimiento en centímetros de *Colletotrichum* sp. afectado por la actividad de metabolitos volátiles de especies de *Trichoderma*.

Repeticiones	<i>T. yunnanense</i>	<i>T. asperellum</i>	<i>T. lignorum</i>	Testigo
R1	7.47	6.55	6.79	8
R2	7.25	6.85	5.85	8
R3	7.47	6.91	5.68	8
R4	7.47	6.55	6.79	8
R5	7.47	6.85	5.68	8
R6	7.25	6.91	5.68	8
Promedio	7.40	6.77	6.08	8.00

Anexo 7. Análisis de varianza para el antagonismo de metabolitos volátiles de especies de *Trichoderma* frente a *Colletotrichum* sp.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	3	12.26824583	4.08941528	46.62	0.0001
ERROR	20	1.75441667	0.08772083		
TOTAL	23	14.02266250			
C.V.	4.194399%				
Nivel de significancia	0.05				

Anexo 8 Crecimiento radial de *Colletotrichum* sp. en centímetros frente a *B. licheniformis* por el método de cultivo dual.

Repeticiones	Diámetro	Testigo
R1	4.11	8
R2	4.08	8
R3	3.81	8
R4	4.01	8
R5	4.09	8
R6	4.11	8
Promedio	4.03	8

Anexo 9. Crecimiento radial de *Colletotrichum* sp. en centímetros frente al extracto de *V. album* por el método de medio envenenado.

CONCENTRACIONES						
Repeticiones	200 ppm	100 ppm	50 ppm	25 ppm	12.5 ppm	Testigo
R1	--	--	1.4	5.40	7.00	8
R2	--	--	2.1	4.90	7.10	8
R3	--	--	1.9	5.10	6.90	8
R4	--	--	1.5	5.30	7.00	8
R5	--	--	1.2	5.00	7.30	8
R6	--	--	1.3	5.20	7.10	8
Promedio	--	--	1.57	5.10	7.07	8.00