

Selection *in vitro* of mycoparasites with potential for biological control on Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*)

Selección *in vitro* de micoparásitos con potencial de control biológico sobre roya del café (*Hemileia vastatrix*)

Irene Gómez-De La Cruz, Emiliano Pérez-Portilla, Esteban Escamilla-Prado, Centro Regional Universitario Oriente. Universidad Autónoma Chapingo, Carretera Huatusco-Xalapa, Km 6, CP. 94100, Huatusco, Veracruz; Misael Martínez-Bolaños*, Campo Experimental Rosario Izapa. INIFAP. Carretera Tapachula-Cacahoatan, Km 18, CP. 30870, Tuxtla Chico, Chiapas; Gloria Luz L. Carrión-Villarnovo, Instituto de Ecología, A. C. Carretera antigua a Coatepec No. 351, El Haya, CP. 91070, Xalapa, Veracruz; Tania I. Hernández-Leal, Instituto Tecnológico Superior de Xalapa, Sección 5ª de la Reserva Territorial S/N, CP. 91060, Xalapa, Veracruz. *Autor para correspondencia: misael1480@hotmail.com.

Recibido: 02 de Agosto, 2017.

Aceptado: 11 de Diciembre, 2017.

Gómez-De La Cruz I, Pérez-Portilla E, Escamilla-Prado E, Martínez-Bolaños M, Carrión-Villarnovo GLL, Hernández-Leal TI. 2017. Selection *in vitro* of mycoparasites with potential for biological control on Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*). Revista Mexicana de Fitopatología 36(1) 172-183.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1708-1

Primera publicación DOI: 24 de Diciembre, 2017.

First DOI publication: December 24, 2017.

Resumen. Con el objetivo de aislar e identificar micoparásitos de pústulas de *Hemileia vastatrix* y conocer su potencial de control de la roya de café, de diciembre del 2014 a enero del 2015 se muestrearon hojas de café arábico con pústulas de roya y presencia de posibles micoparásitos. Los hongos asociados a las pústulas se aislaron e identificaron morfométricamente a nivel de género. Se evaluó el porcentaje de micoparasitismo *in vitro* de tres de los aislamientos sobre pústulas de roya. Se obtuvieron

Abstract. In order to isolate and identify mycoparasites of *Hemileia vastatrix* and to know their potential as a biological control for Coffee Leaf Rust, from December 2014 to January 2015, samples of Arabica coffee with pustules and the presence of possible mycoparasites were sampled. The fungi associated with the pustules were isolated and identified morphometrically at the genus level. The percentage of mycoparasitism *in vitro* of three of the isolates on rust pustules was evaluated. We obtained 23 isolates of microorganisms associated with rust pustules: *Lecanicillium* spp. (7), *Calcarisporium* sp. (4), *Sporothrix* sp. (4) and *Simplicillium* spp. (8). All the isolates evaluated showed mycoparasitism in rust uredospores; however, 120 h after inoculation, the highest percentages ($P = 0.05$) were obtained with *Simplicillium* sp. (89%) and *Lecanicillium* sp. (68%).

Key words: *Lecanicillium*, *Calcarisporium*, *Sporothrix*, *Simplicillium*.

23 aislamientos de microorganismos asociados a pústulas de roya: *Lecanicillium* spp. (7), *Calcarisporium* sp. (4), *Sporothrix* sp. (4) y *Simplicillium* spp. (8). Todos los aislamientos evaluados mostraron micoparasitismo en las uredosporas de roya; sin embargo, 120 h después de la inoculación, los mayores porcentajes ($P=0.05$) se obtuvieron con *Simplicillium* sp. (89%) y *Lecanicillium* sp. (68%).

Palabras clave: *Lecanicillium*, *Calcarisporium*, *Sporothrix*, *Simplicillium*.

La roya del café es causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, un patógeno biotrófico que afecta hojas de *Coffea* y se considera la enfermedad más importante en el cultivo a nivel mundial. Este hongo causa defoliación y reduce el rendimiento de los cafetos (Avelino *et al.*, 2015). La severidad de las recientes epidemias de la roya en Centroamérica y México ha ocasionado pérdidas del 40 al 50% en el rendimiento del cultivo (Cressey, 2013). De acuerdo a la Organización Internacional del Café (OIC, 2015), los factores económicos (descapitalización de productores) y agronómicos (falta de manejo del cultivo) han contribuido a alcanzar dichas pérdidas.

En respuesta a la crisis cafetalera debida a la roya de café, en Centroamérica se implementaron acciones a corto plazo; sin embargo, las principales estrategias para su manejo se enfocan especialmente hacia el control químico y el uso de variedades resistentes (Zambolim *et al.*, 1997; Avelino *et al.*, 2015 y Escamilla, 2016).

El control químico se considera poco promisorio para la cafecultura mexicana, por tratarse de un cultivo de importancia social, además de considerar el sector de productores orgánicos. El control biológico representa una alternativa, potenciando el uso de microorganismos que provengan del mismo ambiente de acción del fitopatógeno.

Coffee Leaf Rust is caused by the fungus *Hemileia vastatrix*, a biotrophic pathogen that affects *Coffea* leaves, and is considered the most important disease on this crop worldwide. This fungus causes defoliation and reduces the yields of the coffee plants (Avelino *et al.*, 2015). The severity of the recent rust epidemics in Central America and Mexico has caused losses of 40 to 50% in the yield of the crop (Cressey, 2013). According to the International Coffee Organization (ICO, 2015), economic factors (decapitalization of farmers) and agronomic factors (lack of management of the crop) have contributed to reach these losses.

In response to the coffee crisis caused by Coffee Leaf Rust, short-term actions were implemented in Central America; however, the main strategies for their management focus particularly on chemical control and the use of resistant varieties (Zambolim *et al.*, 1997; Avelino *et al.*, 2015 and Escamilla, 2016).

Chemical control is considered scarcely promissory for Mexican coffee growing activities, since it is a socially important crop, as well as considering the organic farming sector. Biological control is an alternative, boosting the use of microorganisms that come from the same action environment as the plant pathogen.

Within the strategies for the biological control of plant pathogens, one of the options is the use of mycoparasites, fungi that are able to survive at the expense of another fungus (Boosalis, 1964), affecting the reproductive structures of the pathogen, which limits its development and spreading (Barros *et al.*, 1999).

Different mycoparasites have been reported on plant pathogens, including *Trichoderma* sp. and *Penicillium vermiculatum* on *Rhizoctonia solanii* (Rolz *et al.*, 2013); *Calcarisporium parasiticum*, as well as *Physalospora* spp., and *Trichoderma* spp. only *Armilaria mellea* (Boosalis, 1964) and other

Dentro de las estrategias de control biológico de los fitopatógenos, una de las opciones es el uso de micoparásitos, hongos que tienen la capacidad de sobrevivir a expensas de otro hongo (Boosalis, 1964) afectando las estructuras reproductivas del patógeno, lo cual limita su desarrollo y diseminación (Barros *et al.*, 1999).

Diferentes micoparásitos han sido reportados sobre fitopatógenos, entre ellos, *Trichoderma* sp. y *Penicillium vermiculatum* sobre *Rhizoctonia solanii* (Rolz *et al.*, 2013); *Calcarisporium parasiticum*, así como *Physalospora* spp., y *Trichoderma* spp. sobre *Armillaria mellea* (Boosalis, 1964) y otros hongos como *Sclerotinia* spp. (Hoyos *et al.*, 2008), *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora nicotianae*, *P. capsici* y *Pythium aphanidermatum*, sobre *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. (Sandoval y López, 2001). Dentro del grupo de las royas, las principales relaciones micoparasíticas reportadas son: *Cladosporium tenuissimum* sobre *Uromyces appendiculatus* (Assante *et al.*, 2004); *Cladosporium uredinicola* sobre *Puccinia puta* (Barros *et al.*, 1999); *Simplicillium lanosoniveum* afectando a *Phakopsora pachyrizi* (Gauthier *et al.*, 2014) y *Verticillium lecanii* en *Puccinia recóndita* (Spencer y Atkey, 1981).

Dada la importancia de la enfermedad de la roya de café, se han realizado diferentes estudios para determinar las especies con micoparasitismo asociados a *H. vastatrix* (Carrión, 1988; Carrión y Rico, 2002; Mahfud *et al.*, 2006; Rolz, 2013 y Haddad *et al.*, 2014); sin embargo, la mayoría de ellos sólo registró la presencia de micoparásitos de la roya del café y no su potencial como posibles agentes de control biológico de la enfermedad. Con base en los antecedentes descritos, en el presente trabajo se plantearon los objetivos de aislar e identificar micoparásitos de pústulas de *H. vastatrix*, así como evaluar su potencial de control de la enfermedad *in vitro*.

fungi such as *Sclerotinia* spp. (Hoyos *et al.*, 2008), *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora nicotianae*, *P. capsici* and *Pythium aphanidermatum*, on *Penicillium* sp. and *Fusarium* sp. (Sandoval and López, 2001). Within the group of rusts, the main mycoparasitic relations reported are: *Cladosporium tenuissimum* on *Uromyces appendiculatus* (Assante *et al.*, 2004); *Cladosporium uredinicola* on *Puccinia puta* (Barros *et al.*, 1999); *Simplicillium lanosoniveum* affecting *Phakopsora pachyrizi* (Gauthier *et al.*, 2014) y *Verticillium lecanii* en *Puccinia recóndita* (Spencer and Atkey, 1981).

Given the importance of the Coffee Leaf Rust disease, different Studies have been carried out to determine the species with mycoparasitism related to *H. vastatrix* (Carrión, 1988; Carrión and Rico, 2002; Mahfud *et al.*, 2006; Rolz, 2013 and Haddad *et al.*, 2014); however, most of them only recorded the presence of mycoparasites of Coffee Leaf Rust and not their potential as possible agents of biological control of the disease.

Based on these precedents, the aim of this investigation is to isolate and identify mycoparasites of *H. vastatrix* pustules, as well as to evaluate their potential to control the disease *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Collection sites. In an altitudinal profile in the state of Veracruz, three coffee-growing locations were chosen: Matlaluca, in the municipal area of Zentla (at an altitude of 650 masl, an average annual temperature of 22°C and 1300 mm of yearly rainfall); El Ocote (at an altitude of 1030 masl, an average annual temperature of 19.8°C and 1682 mm of yearly rainfall) and Tlavictépan (1250 masl, an average annual temperature of 17.2°C and 1967 mm of yearly rainfall), in the municipal area of (Table 1).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de colecta. En un perfil altitudinal en el estado de Veracruz, se seleccionaron tres localidades productoras de café: Matlaluca, del municipio de Zentla (con altitud de 650 msnm, temperatura media anual de 22 °C y 1300 mm de precipitación anual); El Ocote (con altitud de 1030 msnm, temperatura media anual de 19.8 °C y 1682 mm de precipitación anual) y Tlavipectepan (1250 msnm, temperatura media anual de 17.2 °C y 1967 mm de precipitación anual), del municipio de Huatusco (Cuadro 1).

Muestreo de material vegetativo. En cada localidad se recorrieron cinco parcelas de una hectárea, en cada una se realizaron muestreos dirigidos a plantas con síntomas de roya y con signos de posibles micoparásitos en las pústulas. El periodo de colecta fue de diciembre de 2014 a enero de 2015 y en cada parcela se colectaron 40 hojas

Sampling of plant material. In each location, five plots, each with a surface area of one hectare, samples were taken of plants with symptoms of rust and with signs of possible mycoparasites in the pustules. The collection period was between December 2014 and January 2015, and in each plot, 40 leaves were taken from different coffee plants. The leaves were wrapped in sterile paper towels and placed inside properly labeled plastic bags. They were transferred to the Fungus Biodiversity and Systematics of the Environment Institute, A. C. Lab for their preparation and analysis.

Isolation of mycoparasites. In the lab, six rust pustules were taken from each leaf, with signs of possible mycoparasites. Under a stereoscopic microscope (Leica® Heerbrug, Suiza), and with the aid of a hypodermic needle, portions of fungal mycelia related to rust pustules were taken and placed in Petri dishes with oat agar culture medium with an antibiotic (Cloranfenicol® Toluca, México)

Cuadro 1. Descripción de los sitios de colecta de micoparásitos de roya del café.
Table 1. Description of the sites of collection of mycoparasites of the Coffee Leaf Rust.

Localidad	Coordenadas	Altitud (msnm)	Temperatura media anual (°C)	Precipitación media anual (mm)	Sistema de producción	Variedad
Matlaluca	19°07'56'' 96°46'30''	650	22	1300	Policultivo Tradicional	Typica, Bourbon
El Ocote	19°07'56'' 96°53'30''	1030	19.8	1682	Policultivo comercial	Costa Rica, Colombia, Typica
Tlavipectepan	19°09'40'' 96°56'34''	1250	17.2	1967	Policultivo comercial	Costa Rica, Colombia, Typica

Nota. Según la clasificación de Nolasco y Toledo (1996), se define como sistema de Policultivo comercial al que utiliza diferentes combinaciones de árboles del bosque y frutales introducidas, incluyendo control de arvenses y poda selectiva de cafetos y sin manejo fitosanitario, mientras que el Policultivo comercial utiliza especies comerciales de sombra, realizando labores generales y particulares en los cultivos / Note. According to the classification by Nolasco and Toledo (1996), a commercial polyculture system is one which used different combinations of introduced forest and fruit trees, including weed control and the selective trimming of coffee plants and without phytosanitary management, whereas commercial polyculture uses commercial shade species, carrying out general and particular tasks in the crops.

Fuente: Servicio Meteorológico Nacional, 2000 / Source: Servicio Meteorológico Nacional, 2000.

en diferentes cafetos. Las hojas se envolvieron con papel absorbente estéril y se colocaron dentro de bolsas plásticas debidamente etiquetadas. Se trasladaron al laboratorio de Biodiversidad y Sistemática de Hongos del Instituto de Ecología, A. C. para su preparación y análisis.

Aislamiento de micoparásitos. En laboratorio, de cada hoja colectada se seleccionaron seis pústulas de roya con presencia de signos de posibles micoparásitos. Bajo un microscopio estereoscópico (Leica® Heerbrug, Suiza) y con la ayuda de una aguja hipodérmica se tomaron porciones de micelio de los hongos asociados a las pústulas de roya y se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo agar avena con antibiótico (Cloranfenicol® Toluca, México) al 1%. Los cultivos se mantuvieron a $24\pm 1^\circ\text{C}$ por diez días y se purificaron por punta de hifa.

Identificación taxonómica. La caracterización morfológica de los aislamientos puros se realizó mediante la elaboración de preparaciones temporales y permanentes de los aislamientos, y su posterior observación en un microscopio compuesto (Leica, DM550®, Heerbrug, Suiza) y el software Leica Application Suite Educational Zoom (LAS EZ) versión 3.0. La identificación a género consideró la presencia y dimensiones de fialides y conidios ($n=30$), y se describieron con ayuda de las claves taxonómicas especializadas: Barranco (2004), Barnet and Lilly (1958), Domsch *et al.*, (1980), Hirose *et al.*, (2011), Hoog (1974), Zare *et al.* (2000), Zare y Gams, 2001.

Evaluación del potencial micoparasítico de microorganismos aislados. Tres aislamientos (*Lecanicillium* sp.-TlaP4, *Simplicillium* sp.-MaP2 y *Calcarisporium* sp.-Ocp2) se seleccionaron para evaluar su potencial como microorganismo micoparásito de

at 1%. The cultures were kept at $24\pm 1^\circ\text{C}$ for ten days and purified by hyphal tip isolation.

Taxonomic identification. The morphometric characterization of the pure isolations was carried out with the production of temporary and permanent preparations of the isolations, followed by their observation under a compound microscope (Leica, DM550®, Heerbrug, Switzerland) and the software Leica Application Suite Educational Zoom (LAS EZ) version 3.0. The genus identification considered the presence and dimensions of phialides and conidia ($n=30$), and they were described with the aid of specialized taxonomic keys: Barranco (2004), Barnet and Lilly (1958), Domsch *et al.*, (1980), Hirose *et al.*, (2011), Hoog (1974), Zare *et al.* (2000), Zare and Gams, 2001.

Evaluation of the mycoparasitic potential of isolated microorganisms. Three isolations (*Lecanicillium* sp.-TlaP4, *Simplicillium* sp.-MaP2 and *Calcarisporium* sp.-Ocp2) were selected for the evaluation of their potential as *H. vastatrix* mycoparasitic microorganisms; the criterion for selection was the growth rate of the isolations. The isolations were incubated in Potato Dextrose Agar (PDA) for 10 days, followed by the production of a spore suspension at a concentration of 5×10^6 spores ml^{-1} ; each suspension was added an aliquot of Tween 20® at 0.01%.

The test *in vitro* to evaluate the mycoparasitism was carried out according to the methodology proposed by Eskes *et al.* (1991), with adaptations. Leaves of *Coffea arabica* plants of the bourbon variety, with symptoms of Coffee Leaf Rust, were taken in the field and kept in polypaper bags for their analysis in the lab. Under a stereoscopic microscope, pustules were analyzed to select only those that presented no mycoparasitic microorganisms. Five leaf disks, each 1.5 cm in diameter, with the

H. vastatrix; el criterio de selección fue la tasa de crecimiento de los aislamientos. Los aislamientos se incubaron en Papa Dextrosa Agar (PDA) por 10 días, posteriormente se realizó una suspensión de esporas a una concentración de 5×10^6 esporas ml^{-1} , a cada suspensión se le adicionó una alícuota de Tween 20® al 0.01%.

La prueba *in vitro* para evaluar el micoparasitismo se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Eskes *et al.* (1991), con adaptaciones. Hojas de *Coffea arabica* de la variedad bourbón con síntomas y signos de roya anaranjada, se colectaron en campo y se conservaron en bolsas de polipapel para su análisis en laboratorio. Bajo microscopio estereoscópico se analizaron las pústulas para seleccionar sólo aquellas que no presentaron microorganismos micoparásitos. Cinco discos foliares de 1.5 cm de diámetro, con la presencia de al menos una pústula de roya, se colocaron en una placa Petri con agar agua; cada disco se consideró como una repetición de cinco. Se asperjó 1 ml de la suspensión de esporas previamente preparada con cada una de las cepas y al grupo testigo se le asperjó agua destilada estéril. Los tratamientos fueron establecidos bajo un diseño completamente al azar y se mantuvieron a fotoperiodos de 12 h luz y 12 h oscuridad, a 24 °C.

Para determinar el porcentaje de micoparasitismo en las pústulas de roya, de cada disco foliar se realizó un raspado de las lesiones esporulantes y se suspendió en 1 ml de agua destilada adicionándole 100 μl de Tween 80 al 0.01%. De la dilución obtenida se tomaron 100 μl y se observaron bajo microscopio para contabilizar el número de uredosporas parasitadas y no parasitadas en la muestra. Las evaluaciones se realizaron cada 24 horas por un periodo de cinco días.

Análisis estadístico. El porcentaje de parasitismo en las uredosporas evaluadas cada 24 horas

presence of at least one rust pustule, were placed in a Petri dish with agar water; each leaf disk was considered as a repetition of five. We sprayed 1 ml of the spore suspension previously prepared with each one of the strains, and the control group was sprayed with sterile distilled water. The treatments were established under a totally random design and kept under light periods of 12 h and 12 h of darkness, at 24 °C.

To determine the percentage of mycoparasitism in rust pustules, in each leaf disk, the sporulating lesions were scraped and suspended in 1 ml of distilled water, adding 100 μl of Tween 80 at 0.01%. From the dilution obtained, 100 μl were taken and observed under the microscope to count the number of parasited and non-parasited uredospores in the sample. The evaluations were carried out every 24 hours for a period of 5 days.

Statistical analysis. The percentage of parasitism in the uredospores evaluated every 24 hours was analyzed with an analysis of variance and a Tukey average separation test, with the aid of the program Statistica version 6.0.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of mycoparasites. A total of 23 mycoparasite isolations were obtained from the different sampling sites. The highest number (10) was obtained from the middle altitude zone (El Ocote, 1030 masl), and the lowest number (6), from the low altitude zone with a higher temperature and rainfall than the other sampling sites (Zentla, 650 masl). Considering that weather conditions are factors that determine the development of fungi, our results differ from those reported by Martins *et al.*, (2015), who report a greater incidence of mycoparasites on *H. vastatrix* in the dry season

se analizaron a través de un análisis de varianza y una prueba de separación de medias de Tukey con ayuda del programa Statistica versión 6.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de micoparásitos. Se obtuvieron un total de 23 aislamientos de micoparásitos de los diferentes sitios de muestreo. El mayor número (10) se obtuvo de la zona altitudinal media (El Ocote, 1030 msnm), y el menor número (6) de la zona altitudinal baja con mayor temperatura y precipitación respecto a los otros sitios de muestreo (Zentla, 650 msnm), considerando que las condiciones climáticas son factores que determinan el desarrollo de los hongos, los resultados difieren de lo reportado por Martins *et al.*, (2015), que reporta mayor incidencia de micoparásitos sobre *H. vastatrix* en la estación seca del año, quien también sugiere que el micoparásito *Lecanicillium lecanii* podría ser más persistente a bajas temperaturas. Esto también difiere de lo reportado por Bagyaraj *et al.*, (2015) que encontró mayor población de bacterias y hongos en sistemas de rusticanos, por lo que en este caso se reporta mayor diversidad en condiciones de policultivo comercial donde la sombra es menos diversa que en el sitio de zona baja.

Se identificaron cuatro géneros de hongos: *Calcarisporium* sp. (4), *Lecanicillium* spp. (7), *Simplicillium* spp. (8), *Sporothrix* sp. (4), siendo los más abundantes *Simplicillium* spp. y *Lecanicillium* spp.

Descripción microscópica de los géneros.

***Lecanicillium* spp.** Presentó hifas septadas, hialinas; con fialides (15-23 x 0.5-1.2 µm) ordenadas en grupos de tres a cinco por verticilo (Zare y Gams, 2001), y no en pares o solitarias como lo señaló Cañedo y Ames (2004), además fueron ligeramente

of the year, and also suggest that the mycoparasite *Lecanicillium lecanii* could be more persistent at lower temperatures. This is also different to reports by Bagyaraj *et al.*, (2015) who found a greater bacteria and fungus populations in rustican systems, and therefore, in this case, there are reports of a higher diversity in conditions of commercial polyculture, where shade is less diverse than in the lower zone site.

Four fungal genera were identified: *Calcarisporium* sp. (4), *Lecanicillium* spp. (7), *Simplicillium* spp. (8), *Sporothrix* sp. (4), with *Simplicillium* spp. and *Lecanicillium* spp. being the most abundant.

Microscopic description of the genera.

***Lecanicillium* spp.** Presented septated hyphae, hyalines; with con phialides (15-23 x 0.5-1.2 µm) ordered in groups of three to five per whorl (Zare and Gams, 2001), and not in pairs or individually, as pointed out by Cañedo and Ames (2004); they were also slightly wider at the base. The conidia were elliptical (5-7x1-2 µm) and emerging in the top of the phialide (Figure 1 A); they were generally observed in conidial heads (Barranco, 2004).

***Calcarisporium* sp.** Presented hyaline and septated hyphae, which hold short conidiphora (Figure 1 B), and on them, verticillated phialides measuring 4-6 x 1-2 µm. A characteristic that distinguishes this genus is the shape of the phialides, which appeared wider in the base and end in small denticles on the apex (Hirose *et al.*, 2011). The simple phialides are formed directly from the hypha (Barnet, 1958). The conidia are ovoidal and measure 3-5x1.3-1.8 µm.

***Simplicillium* spp.** Presented hialine, this and septated hyphae; the conidiophora (15-35x0.8-1µm) emerge in ones (Zare *et al.*, 2000), perpendicular to the hyphae and become thinner

más anchas en la base. Los conidios fueron elípticos (de 5-7x1-2 μm) y emergiendo en el extremo superior de la fialide (Figura 1 A); generalmente se observaron en cabezuelas (Barranco, 2004).

***Calcarisporium* sp.** Presentó hifas hialinas y septadas, las cuales sostienen conidióforos cortos (Figura 1 B) y sobre ellos, fialides verticiladas que miden 4-6 x 1-2 μm . Una característica que distingue a este género es la forma de las fialides, las cuales se observaron anchas en la base y terminan en pequeños denticulos en el ápice (Hirose *et al.*, 2011).

towards the tip (Molina *et al.*, 2012). Hyphae are generally interlaced (Figure 1 C). The conidia (1-3 μm) were circular and sometimes elliptical, with an abundant sporulation and an arrangement in mucoidal heads (Domsch *et al.*, 1980).

***Sporothrix* sp.** Presented hyalin vegetative hyphae, with short septa and denticles (Figure 1 D); no conidiophora were observed after 10 days; the conidia were observed on the denticles of the hyphae (Hoog, 1974); there was an abundant sporulation in the Agar-Oat medium.

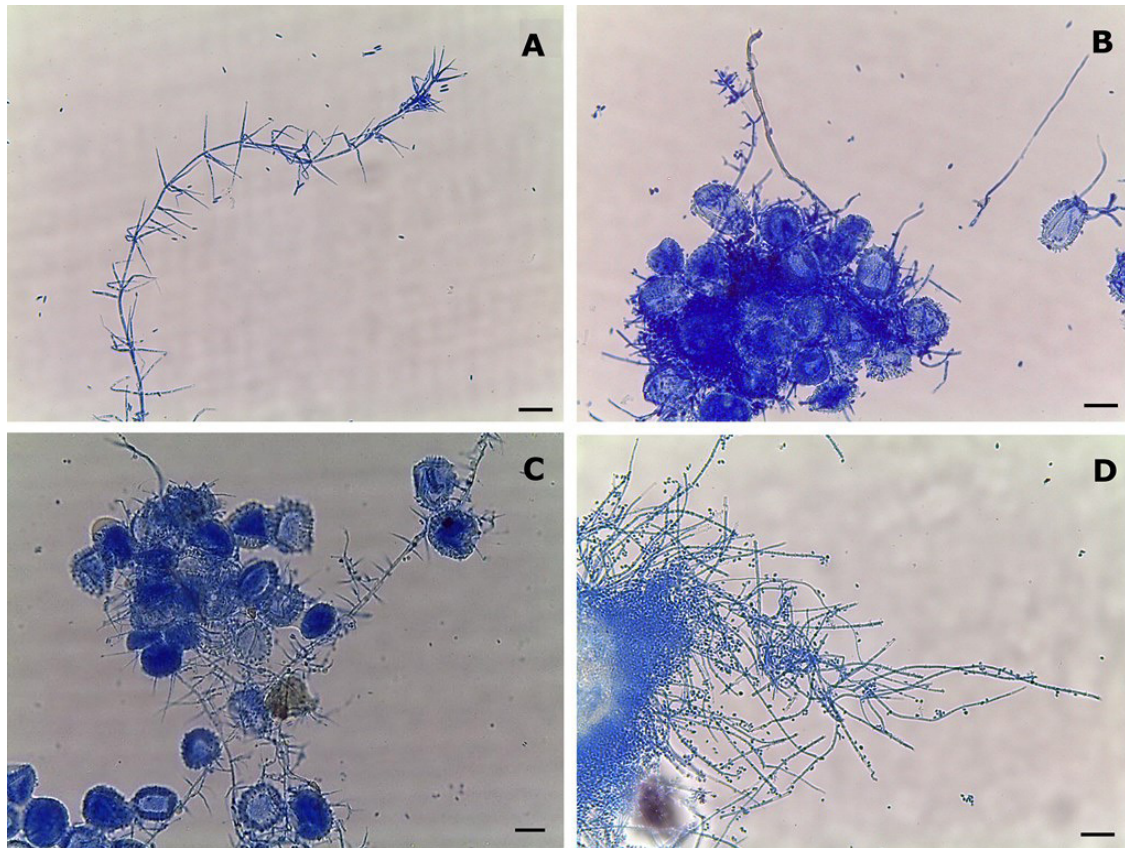


Figura 1. Micoparásitos encontrados en pústulas de Roya del Cafeto (*Hemileia vastatrix*) y sus características morfológicas en Avena-Agar. Dónde: *Lecanicillium* sp. (A-40X); *Calcarisporium* sp. (B-40X); *Simplicillium* sp. (C-40X) y *Sporothrix* sp. (D-40X). Barra: 10 μm .

Figure 1. Mycoparasites found in Coffee Leaf Rust pustules (*Hemileia vastatrix*) and their morphological characteristics in Oat-Agar. Where: *Lecanicillium* sp. (A-40X); *Calcarisporium* sp. (B-40X); *Simplicillium* sp. (C-40X) and *Sporothrix* sp. (D-40X). Bar: 10 μm .

Las fiálides simples se forman directamente de la hifa (Barnet, 1958). Los conidios son ovoides con medidas de 3-5x1.3-1.8 µm.

***Simplicillium* spp.** Presentó hifas hialinas, delgadas y septadas; los conidioforos (15-35x0.8-1µm) emergiendo solitarios (Zare *et al.*, 2000) en forma perpendicular a las hifas y adelgazan hacia la punta (Molina *et al.*, 2012). Las hifas generalmente se observaron entrelazadas (Figura 1 C). Los conidios (1-3 µm) fueron circulares y en ocasiones elípticos, con esporulación abundante y disposición en cabezas mucoides (Domsch *et al.*, 1980).

***Sporothrix* sp.** Presentó hifas vegetativas hialinas, con septos cortos y dentículos (Figura 1 D); no se observaron conidióforos a los 10 días, los conidios se observaron sobre los dentículos de las hifas (Hoog, 1974); se observó abundante esporulación en medio Agar-Avena.

Micoparasitismo *in vitro* sobre *H. vastatrix*. Cuarenta y ocho horas posteriores a la inoculación de tratamientos, se obtuvieron diferencias estadísticas significativas (P=0.05) entre tratamientos (Cuadro 2). Los mayores porcentajes de micoparasitismo observados durante las primeras 72 horas corresponden

Mycoparasitism *in vitro* on *H. vastatrix*. Forty-eight hours after the inoculation of treatments, significant statistical differences (P=0.05) were obtained between treatments (Table 2). The highest percentages of mycoparasitism observed in the first 72 hours were found in isolations of *Simplicillium* sp., and *Calcarisporium* sp., whereas 96 and 120 h after inoculation, the highest percentages were found in *Simplicillium* sp. and *Lecanicillium* sp. (Table 2).

The genus *Simplicillium* is reported as part of the fungi related to Coffee Leaf Rust in Puerto Rico and Mexico (James *et al.*, 2016). The species of this genus have been registered mainly in relation with *H. vastatrix* (Zare and Gams, 2001), while its potential as a biological control agent of other diseases has had little studies. It has been recorded in association with pathogenic fungi in plants, such as *Alternaria brassicicola*, *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* (Shyang *et al.*, 2017), as well as with nematodes (Gams and Zare, 2003) and aphids (Shyang *et al.*, 2017).

The genus *Lecanicillium* has been widely studied, and documented as a biological control agent for mildews and uredinales (Alavo, 2015). Mahfund *et al.* (2006) point out that the effects of two species of this genus can vary between

Cuadro 2. Evaluación del porcentaje de parasitismo de tres microorganismos sobre pústulas de roya de café (*Hemileia vastatrix*) en condiciones *in vitro*.
Table 2. Evaluation of the percentage of parasitismo of three microorganisms on Coffee Leaf Rust pustules (*Hemileia vastatrix*) in *in vitro* conditions.

Tratamiento	Horas después de la inoculación				
	24	48	72	96	120
Testigo	0.00±0a	0.00±b	0.00±c	0.00±c	0.00±0c
<i>Calcarisporium</i> sp.	0.00±0a	20.87±13ab	41.02±13ab	50.12±0.7b	51.60±10b
<i>Lecanicillium</i> sp.	2.68±2 a	9.85±6b	17.49±16bc	49.19±13b	68.10±12b
<i>Simplicillium</i> sp.	0.89±2 a	42.73±9a ^z	51.19±16a ^z	83.48±3a ^z	88.86±11a ^z

^a=Medias ±Desviación estándar, los valores con la misma letra en las columnas no difieren estadísticamente (Tukey p=0.05) / ^z=Means ±Standard deviation, values with the same letter in the columns do not differ statistically (Tukey p=0.05)

a los aislamientos de *Simplicillium* sp., y *Calcarisporium* sp., mientras que a las 96 y 120 h posteriores a la inoculación, los mayores porcentajes correspondieron a *Simplicillium* sp. y *Lecanicillium* sp. (Cuadro 2).

El género *Simplicillium* se reporta como parte de los hongos asociados a roya del café en Puerto Rico y México (James *et al.*, 2016). Las especies de este género han sido registradas principalmente en asociación con *H. vastatrix* (Zare y Gams, 2001), mientras que su potencial como agente de control biológico de otras enfermedades ha sido poco estudiado. Ha sido registrado en asociación con hongos fitopatógenos como *Alternaria brassicicola*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani* (Shyang *et al.*, 2017), también con nematodos (Gams y Zare, 2003) y áfidos (Shyang *et al.*, 2017).

El género *Lecanicillium* ha sido ampliamente estudiado, documentándose como agente de control biológico de mildius y uredinales (Alavo, 2015). Mahfund *et al.* (2006) señala que los efectos de dos especies de este género pueden actuar desde la decoloración de uredosporas, formación de micelio blanco sobre ellas o necrosamiento, dependiendo del tiempo de aplicación. Esto sugiere que el porcentaje de parasitismo de *Lecanicillium* sp., varía entre especies y aislamientos (Arriola *et al.*, 1998).

Finalmente, en estudios previos se ha señalado el parasitismo de *Calcarisporium* sp., sobre roya del cafeto de manera natural (Carrión y Rico, 2002).

CONCLUSIONES

Los géneros *Lecanicillium* sp., *Calcarisporium* sp., *Sporothrix* sp. y *Simplicillium* sp. fueron aislados de pústulas de roya de cafeto en los municipios de Huatusco y Zentla, en el estado de Veracruz, México.

the decoloring of uredospores, the formation of white mycellia on them, or necrosis, depending on the time of application. This suggests that the percentage of parasitism of *Lecanicillium* sp. varies between species and isolations (Arriola *et al.*, 1998).

Finally, previous studies have pointed out the natural parasitism of *Calcarisporium* sp. on Coffee Leaf Rust (Carrión and Rico, 2002).

CONCLUSIONS

The genera *Lecanicillium* sp., *Calcarisporium* sp., *Sporothrix* sp. and *Simplicillium* sp. were isolated from rust pustules in the municipal areas of Huatusco and Zentla, in the estate of Veracruz, Mexico.

The highest percentages of mycoparasitism in the *in vitro* tests were obtained with the strains of *Simplicillium* sp. (88.86%) and *Lecanicillium* sp. (68.10%), 120 hours after inoculation.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

Los mayores porcentajes de micoparasitismo en las pruebas *in vitro* se obtuvieron con las cepas de *Simplicillium* sp. (88.86%) y *Lecanicillium* sp. (68.10%), a las 120 horas posteriores a la inoculación.

## LITERATURA CITADA

- Alavo BC. 2015. The insect pathogenic fungus *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas and its use for pests control: A review. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* 3:337-345. [http://dx.doi.org/10.18006/2015.3\(4\).337.345](http://dx.doi.org/10.18006/2015.3(4).337.345)
- Arriola MC, Chet I and Rölz C. 1998. Hongos que atacan la roya del café: Un breve comentario. *Universidad Del Valle de Guatemala* 8:2-6. Disponible en línea: <http://uvg.edu.gt/publicaciones/revista/volumenes/revista8.pdf>

- Assante G, Maffi D, Sarachi M, Farina G, Morica S and Raggi A. 2004. Histological studies on the mycoparasitism of *Cladosporium tenuissimum* on urediniospores of *Uromyces appendiculatus*. *Mycology* 108:170-182. <https://doi.org/10.1017/S0953756203008852>
- Avelino J, Cristancho M, Georgiou S, Imbach P, Aguilar L, Bornemann G, Läderac P, Anzueto F, Hruska AJ and Morales C. 2015. The coffee rust crisis in Colombia and Central America (2008-2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security* 7: 303-321. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0446-9>
- Barnett HL and Lilly VG. 1958. Parasitism of *Calcarisporium parasiticum* on species of *Physalospora* and related fungi. *Boletín* 420T. West Virginia University Agricultural Experiment Station. 1-37 pp. Disponible en línea: [https://ia902300.us.archive.org/13/items/parasitismofcalc420barn/parasitismofcalc420barn\\_bw.pdf](https://ia902300.us.archive.org/13/items/parasitismofcalc420barn/parasitismofcalc420barn_bw.pdf)
- Barranco, FJE. 2004. Contribución al estudio de las actividades enzimáticas involucradas en el mecanismo de patogenicidad de *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* cultivado en medio sólido. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, México, D.F.
- Barros ST, Oliveira TN, Bastos T G and Maia CL. 1999. Hyperparasitism of *Cladosporium uredinicola* over *Puccinia puti* on the host *Ipomoea fistulosa*. *Mycologist* 13:23-24. [https://doi.org/10.1016/S0269-915X\(99\)80071-8](https://doi.org/10.1016/S0269-915X(99)80071-8)
- Bagyaraj JD, Thilagar J, Ravisha C, Kashalapa GC, Krishnamurthy NK and Vaast P. 2015. Below ground microbial diversity as influenced by coffee agroforestry systems in the Western Ghats, India. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 202:198-202. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.01.015>
- Boosalis MG. 1964. Hyperparasitism. *Annual Review of Phytopathology* 2:363-376. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.02.090164.002051>
- Carrión G and Rico-Gray V. 2002. Mycoparasites on the coffee rust in Mexico. *Fungal Diversity* 11:49-60. Disponible en línea: [http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD\\_11\\_49-60.pdf](http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD_11_49-60.pdf)
- Carrión G. 1988. Estudios sobre el control biológico de la roya del café mediante *Verticillium lecanii* en México. *Micología Neotropical* 1:79-86.
- Cressey D. 2013. Coffee rust regains foothold: researchers marshal technology in bid to thwart fungal outbreak in Central America. *Nature* 493 (7434):587. Disponible en línea: <http://www2.tap-ecosur.edu.mx/mip/Plagas/Roya/pdfs/Notas/Coffee%20rust%20regains.pdf>
- Domsch KH, Gams W and Anderson TH. 1980. *Compendium of soil fungi*. Vol. 1. Academic Press. London, UK. 860p.
- Escamilla PE. 2016. Boletín informativo: Políticas públicas. Las variedades de Café en México ante el desafío de la Roya. Inédito. Disponible en línea: [http://pmcarbono.org/pmc/descargas/proyectos/redd/Breves\\_de\\_Políticas\\_Publicas\\_No.4-Varietades\\_de\\_café\\_en\\_México.pdf](http://pmcarbono.org/pmc/descargas/proyectos/redd/Breves_de_Políticas_Publicas_No.4-Varietades_de_café_en_México.pdf)
- Eskes AB, Mendes MD and Robbs CF. 1991. Laboratory and field studies on parasitism of *Hemileia vastatrix* with *Verticillium lecanii* and *V. leptobactrum*. *Café-Cacao-Thé*, 35:275-282.
- Gauthier WN, Maruthachalam K, Subbarao VK, Brown M, Xiao Y, Robertson L and Schneider WR. 2014. Mycoparasitism of *Phakospora pachyrizi*, the soybean rust pathogen, by *Simplicillium lanosoniveum*. *Biological Control* 76:87-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.05.008>
- Gams W and Zare R. 2003. A taxonomic review of the clavicipitaceous anamorphs parasitizing nematodes and other microinvertebrates. 17-73. In: *Clavicipitalean Fungi: Evolutionary biology, Chemistry, Biocontrol and Cultural Impacts*. DOI: 10.1201/9780203912706.pt1
- Haddad, F, Saraiva R, Mizubuti E, Romeiro R and Maffia L. 2014. Isolation and selection of *Hemileia vastatrix* antagonists. *European Journal of Plant Pathology* 139:763-772. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-014-0430-9>
- Hirose D, Dewaga Y and Inaba S. 2012. The anamorphic genus *Calcarisporiella* is a new member of the Mucoromycotina. *Mycoscience* 53:256-260. <https://doi.org/10.1007/S10267-011-0160-1>
- Hoog GS. 1974. The genera *Blatobotrys*, *Sporothrix*, *Calcarisporium* and *Calcarisporiella* Gen. Nov. *Studies in Mycology* 7:70-73.
- Hoyos L, Duque G y Orduz S. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp., y *Rhizoctonia* spp. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 2: 76-86. <https://doi.org/10.17584/rcch.2008v2i1.1175>
- James T, Marino J, Perfecto I and Vandermeer J. 2016. Identification of putative coffee rust micoparasites via single-molecule DNA sequencing of infected pustules. *Applied and Environmental Microbiology* 83: 631-639. DOI: 10.1128/AEM.02639-15
- Mahfund MC, Mior AZ, Meon S and Kadir J. 2006. *In Vitro* and *in Vivo* Tests for Parasitism of *Verticillium psalliotae* Treschow on *Hemileia vastatrix* Berk and Br. *Malaysian Journal of Microbiology*. 2:46-50. Disponible en línea en: <http://www.myjournal.my/public/article-view.php?id=10291>
- Martins JS, Soares CA, Medeiros VH, Santos CV, Pozza EV. 2015. Contribution of host and environmental factors to the Hyperparasitism of coffee rust under field conditions. *Australasian Plant Pathology* 44:605-610. <https://doi.org/10.1007/s13313-015-0375-2>
- Moguel P y Toledo V. 1996. El café en México, ecología, cultura y sustentabilidad. *Ciencias* 43:40-51.
- Molina RE, Morales RR, Valenzuela FE, y Vives GI. 2012. Caracterización morfológica de *Acremonium* sp. asociado a *Neonectria fuckeliana* en *Pinus radiata* en Chile. *Boletín de Micología* 27: 32-38. <http://dx.doi.org/10.22370/bolmicol.2012.27.2.883>
- OIC. 2015. Informe sobre el brote de la roya del café en Centroamérica y Plan de acción para combatirla. Organización Internacional del Café. Disponible en línea: <http://www.ico.org>
- Rolz AC, De León LR y Paniagua O. 2013. Evidencia de un antagonismo *in vitro* de especies de *Trichoderma* contra *Hemileia vastatrix* (roya del café). Centro de Ingeniería Bioquímica, Instituto de Investigaciones. Universidad del Valle de Guatemala. *Revista* 25 de la Universidad del Valle de Guatemala. Disponible en línea: [http://uvg.edu.gt/publicaciones/revista/volumenes/numero25/8\\_evidencia%20de%20un.pdf](http://uvg.edu.gt/publicaciones/revista/volumenes/numero25/8_evidencia%20de%20un.pdf)

- Sandoval S y López OM. 2001. Hiperparasitismo de *Trichoderma harzianum*, *T. viridae* y *T. pseudokoningii* sobre diferentes hongos fitopatógenos. Revista de Fitosanidad, 5:41-44. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Playa, Ciudad La Habana, Cuba. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209118258010>
- Servicio Meteorológico Nacional. (2000). Normales climatológicas. Disponible en línea: <http://smn.cna.gob.mx>
- Schieber E. 1972. Economic impact of coffee rust in Latin America. Annual Review of Phytopathology 10:491-510. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.10.090172.002423>
- Shyang CR, Huang CC, Li CJ and Tsay GJ. 2017. Evaluation of characteristics of *Simplicillium lanosoniveum* on pathogenicity to aphids and *in vitro* antifungal potency against plant pathogenic fungi. International Journal of Environmental & Agriculture Research 3:55-61. Disponible en línea: <http://www.ijoear.com/Paper-January-2017/IJOEAR-JAN-2017-7.pdf>
- Spencer DM and Atkey PT. 1981. Parasitic effects of *Verticillium lecanii* on two Rust fungi. Transactions of the British Mycological Society. 77:535-542. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(81\)80101-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(81)80101-5)
- Zambolim L, Vale FXR, Pereira A e Chaves G. 1997. Café (*Coffea arabica* L.), Controle de Doenças. In: Vale FXR, Zambolim L. (eds.). Controle de Doenças de Plantas: Grandes Culturas, vol. 1. Suprema Gráfica e Editora, Visconde do Rio Branco, Brasil. 83-40 pp.
- Zare R and Gams W. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. Nov. Nova Hedwigia 73:1-50. DOI: 10.1127/nova.hedwigia/71/2001/1
- Zare R, Gams W and Culham A. 2000. A revision of *Verticillium* sect. *Prostata* I. Phylogenetic studies using ITS sequences. Nova Hedwigia 71:465-480. Disponible en línea: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20023073040>
- Zare R, Gams W and Culham A. 2000. A revision of *Verticillium* sect. *Prostata* I. Phylogenetic studies using ITS sequences. Nova Hedwigia 71:465-480. Disponible en línea: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20023073040>