

UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Evaluación de cinco cepas de hongos nativos como controladores biológicos de la enfermedad “Ojo de Pollo” (*Mycena citricolor*) en café (*Coffea arabica*) en condiciones in vitro.

Tesis de Grado previo la
Obtención del título de
Biólogo

AUTORES

Katty Elizabeth Ojeda Gutiérrez
Juan Andrés Suès cum Jaramillo

DIRECTOR

M. Sc. Humberto Vinicio Carrión

Loja – Ecuador
2012

M. Sc. Humberto Vinicio Carrión
DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

Que una vez revisado el proyecto de investigación efectuado por la Srta. Katty Elizabeth Ojeda Gutiérrez y el Sr. Juan Andrés Suescum Jaramillo se ha establecido que el trabajo previo a la obtención del título de BIÓLOGO, cumple con los requisitos establecidos por la Universidad Técnica Particular de Loja y por la Escuela de Biología y por ello se autoriza la presentación final.

Loja, 25 de abril de 2012

ACTA DE DECLARACIÓN Y CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

“Nosotros Katty Elizabeth Ojeda Gutiérrez y Juan Andrés Suès cum Jaramillo, declaramos ser autores del presente trabajo y eximimos expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente declaramos conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos de tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

Katty Elizabeth Ojeda Gutiérrez

CI. 1104742893

Juan Andrés Suès cum Jaramillo

CI. 1104056542

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

“Las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo, son de exclusiva responsabilidad de los autores”.

Nombre

Firma

Katty Elizabeth Ojeda Gutiérrez

Juan Andrés Suèscum Jaramillo

DEDICATORIA

A nuestros padres por su constante apoyo y comprensión.

A nuestros hermanos, abuelitos, tíos y amigos, por sus consejos y constante compañía.

AGRADECIMIENTOS

A todo el personal y compañeros becarios del Laboratorio de Servicios Agropecuarios de la UTPL.

A nuestro director M. Sc. Vinicio Carrión por todo su apoyo y amistad.

A nuestros profesores y compañeros de la carrera de Biología por su amistad, sus palabras de apoyo y motivación.

Índice de Contenidos

Certificación del director de la tesis.....	II
Cesión de derechos.....	III
Autoría.....	IV
Dedicatoria.....	V
Agradecimientos.....	VI
Resumen.....	VIII
1. Introducción.....	1
2. Marco Teórico.....	4
3. Objetivos de la investigación.....	17
4. Materiales y Métodos.....	19
5. Resultados.....	28
6. Discusión.....	42
7. Conclusiones.....	52
8. Recomendaciones.....	54
8. Referencias bibliográficas.....	56
9. Anexos.....	68

RESUMEN

El ojo de pollo causado por el hongo *M. citricolor*, es una de las enfermedades que provocan mayores daños fitosanitarios, en las plantaciones de café en América Latina (Canet e Ibarra, 2002; Martínez, 2008). Nuestro trabajo consistió en probar cinco hongos nativos como posibles antagonistas de la enfermedad; para ello, se hizo una caracterización morfológica del *M. citricolor* y se determinaron los mecanismos de antagonismo.

La caracterización morfológica se realizó midiendo el largo y ancho de las conidias (μm) que corresponden al estado asexual del hongo. Y el largo del pedicelo y ancho de la gema. Ninguna de estas variables presentó diferencias estadísticamente significativas entre los sitios de muestreo.

Las cepas de los posibles antagonistas corresponden a *Xylaria feejeensis*, *Pleospora* spp, *Schizophyllum commune* y *Pycnoporus sanguineus*. Éste último, demostró una inhibición del crecimiento micelial de *M. citricolor*, ubicándolo en la clase 3 de la escala de antagonismo de Bell. En las pruebas de micoparasitismo,

Pycnoporus sanguineus presentó parasitosis y destrucción o lisis de las hifas de *M. citricolor*. EL testigo *Trichoderma harzianum*, continúa siendo el mejor antagonista de *M. citricolor*.

ABSTRACT

The American leaf spot of coffee or “Ojo de pollo”, caused by the fungus *M. citricolor*, is a disease that causes the greatest damage in the coffee plantations in Latin America (Canet and Ibarra, 2002; Martinez, 2008). Our aim was to test five native fungi as potential antagonists of disease. Morphological characterization was made of *M. citricolor* and determined the antagonist mechanisms.

Morphological characterization was performed by measuring the length and width of conidia (μm), corresponding to the asexual stage of the fungus. And the length of the pedicel and width of the germ. None of these variables showed statistically significant differences between sampling sites.

Strains correspond to potential antagonists *Xylaria feejeensis*, *Pleospora* spp. *Schizophyllum commune*,

Pycnoporus sanguineus. This showed a mycelia growth inhibition of *M. citricolor* placed in Class 3 of the scale of Bell's antagonism. In test of mycoparasitism *Pycnoporus sanguineus* introduced, parasites, destruction or lysis of hyphae of *M. citricolor*. *Trichoderma harzianum* remains the best antagonist of *M. citricolor*.

1.INTRODUCCIÓN

El ojo de pollo, es una de las enfermedades que causa graves daños en las plantaciones de café en América Latina (Martínez, 2008; Canet e Ibarra, 2002). Es ocasionada por el hongo *M. citricolor*, un Basidiomycota que produce dos tipos de cuerpos fructíferos: las gemas o cabecitas que corresponden al estado asexual y el basidiocarpo que corresponde al estado sexual. La reproducción sexual (desarrollo de carpóforos o cuerpos fructíferos) en *M. citricolor* es bastante raro y ocurre principalmente en las hojas muertas al final de la epidemia, lo que parece sugerir que cualquier participación de basidiosporas en el desarrollo de la epidemia es insignificante (Mora *et al.*, 1989; Wang y Avelino *et al.*, 2007; Rivillas *et al.*, 2011). El principal daño que ocasiona el ojo de pollo en las plantaciones de café es la defoliación, la cual disminuye considerablemente el área fotosintética de las plantas y consecuentemente ocasiona pérdidas de cosecha entre 13% y 35%, según los niveles de infección (Fischersworing y Robkam, 2001; Cárdenas, 2007).

Con el fin de controlar esta enfermedad fueron probados cinco cepas hongos nativos: *Pleospora* spp.,

Schizophyllum commune, *Xylaria feejeensis*, *Pycnoporus sanguineus* y *Trichoderma harzianum* como posibles antagonistas de *M. citricolor*. Para ello se realizó la caracterización morfológica de *M. citricolor* y además la determinación del mecanismo de antagonismo que se realiza con los hongos estudiados.

El presente estudio se realizó en los cantones Olmedo y Chaguarpamba de la provincia de Loja durante el período de Mayo del 2011 a Marzo del 2012.

2.MARCO TEÓRICO

2.1. *Mycena citricolor*

2.1.1. Descripción morfológica del *Mycena citricolor*

Mycena citricolor es un hongo Basidiomycota que produce dos tipos de cuerpos fructíferos: las gemas o cabecitas que corresponde al estado asexual y el basidiocarpo, corresponde al estado sexual, que crecen en la vegetación rastrera de cafetales descuidados y en el monte cercano a los ríos; ésta forma de reproducción es difícil de observar. (Wang y Avelino, 1999; González, 2003; Muller *et al.*, 2004). El basidiocarpo es una pequeña estructura en forma de sombrilla de color amarillo intenso, tiene un diámetro de 0.5 a 1 mm, es más grande que la gema, produce y libera una gran cantidad de basidiosporas. Las estructuras asexuales conocidas como gemas son el principal medio de diseminación del hongo y constan de dos partes: un pedicelo que posee una longitud de aproximadamente 2-3 mm y la gema que tiene un diámetro entre 0.25 y 0.35 mm (López, 2001).

La gema es de color amarillo y tiene forma de alfiler, tiene bordes muy redondeados, la cara superior es esferoidal y la inferior tiene en el centro un punto entrante que es donde se inserta el pedicelo que la sostiene. El espacio entre las células está cubierto por un mucílago transparente, que permite a la gema adherirse a la hoja (Vargas *et al.*, 1984; González, 2003; López, 2001) (Fig.1A).

El micelio de este hongo consiste de hifas hialinas, bien desarrolladas, septadas y profundamente ramificadas, que generalmente crecen en forma de abanico; siendo el color característico el blanco, amarillo o anaranjado (López, 2001) (Fig.1B-C).

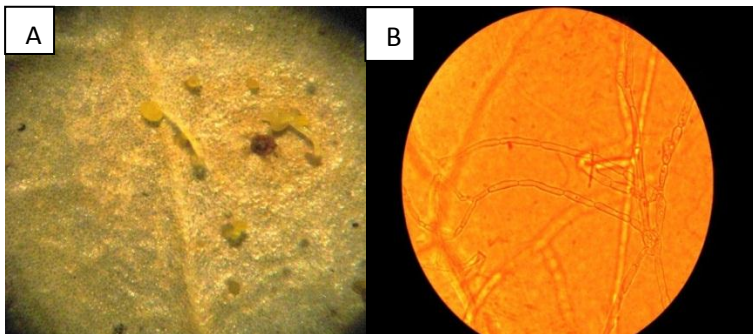




Figura 1. A) Gema de *Mycena citricolor* en forma de alfiler; B) Hifas del *Mycena citricolor*; C) Micelio del *Mycena citricolor* in vitro.

2.1.2. Descripción de la enfermedad

El ojo de pollo causada por el hongo *M. citricolor*, es una de las enfermedades más graves en las plantaciones de café en américa latina (Canet e Ibarra, 2002). Se caracteriza por la aparición de manchas de color marrón en las hojas de 0.5 a 1 cm de diámetro y causa una gran defoliación (Rao *et al.*, 1987; Guilcapi, 2009), disminuyendo notablemente el área fotosintética. Según Porras (2000) los cafetos defoliados ocupan sus reservas alimenticias en la producción de nuevo follaje y no en la producción de frutos y los pocos frutos formados

son atacados también por la enfermedad, de tal forma que se vuelven muy susceptibles a la caída (Fig. 2).

La infección se da cuando el propágulo o gema se desprende al ponerse en contacto con el agua (Avelino *et al.*, 2007). Cuando el hongo está dentro el desarrollo del micelio empieza a invadir los tejidos de las hojas penetrando profundamente en el parénquima y comienza su actividad al modificar las células constitutivas y transformando la clorofila, dando origen a las lesiones características del hongo (Borbón, 1999).

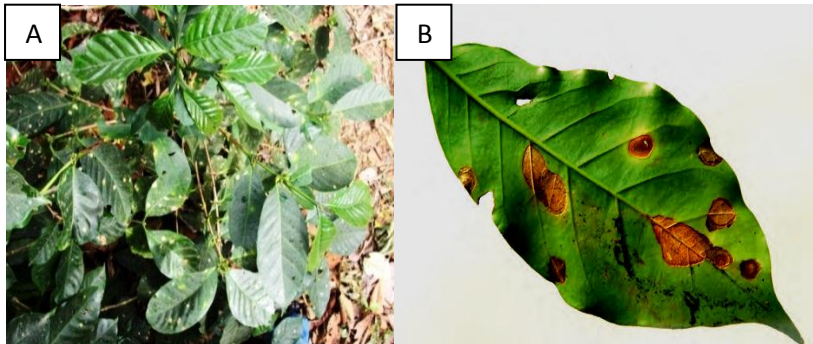


Figura 2. A) Desarrollo de la enfermedad; B) Mancha del ojo de pollo en las hojas del café.

2.1.2.1. Epidemiología

Se sabe que la enfermedad se desarrolla particularmente en zonas húmedas con poca luz. De hecho la lluvia contribuye mucho hacia la liberación y diseminación de propágulos y hacia la infección, la cual ocurre solo en presencia de agua (Avelino *et al.*, 2007).

Las temperaturas entre 18 y 24⁰C, precipitaciones anuales de 2.000 a 4.000 mm y uno o más meses del año sin excesos de agua, favorecen al desarrollo del patógeno. Por lo tanto, el desarrollo de la enfermedad no depende únicamente de la temperatura sino también de la humedad relativa del ambiente (López, 2001).

Otras características importantes de este hongo son la capacidad de sobrevivir en tejidos muertos y la facultad de mantenerse inactivo durante los meses de sequía. (Fischersworing y Robkam, 2001; Cárdenas, 2007).

2.1.2.2. Mecanismo de patogénesis del *Mycena citricolor*

Sequeria and Steeves (1954) han reportaron un ácido indolacético – oxidasa que es responsable de algunos de los efectos patógenos de este hongo. Así mismo el modo de penetración del hongo fue observado por Rao y Teweri (1987), donde observaron la presencia de ácido oxálico sobre cristales tetraédricos perfectos compuestos de oxalato de magnesio, tanto en los puntos de infección como en el tejido necrótico, por lo que se sugirieron que estos cristales jugaban un papel importante en la patogénesis del hongo. El ácido oxálico es liberado por el hongo antes de la penetración sobre el tejido de la planta donde el calcio de las paredes celulares es capturado, de esta manera el tejido se debilita y permite la entrada de la hifa, y posteriormente el desarrollo del patógeno.

2.2. Descripción general de los hongos analizados

2.2.1. *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr.

Phylum: Basidiomycota
Clase: Agaricomycetes
Orden: Polyporales
Familia: Polyporaceae
Género: *Pycnoporus*

Hongo saprófito de carpóforo correoso, de 20 a 60 cm de diámetro, de vistosa fructificación semicircular dispuesta en repisa, color rojo anaranjado, con superficie lisa a ligeramente marcada en zonas concéntricas. Habita sobre troncos, ramas, tocones, empalizadas de maderas frondosas, pudiendo hacerlo también sobre coníferas (Bobadilla, 2004; Valenzuela, 2000; Mycobank, 2011).

2.2.2. *Schizophyllum commune*

Phylum: Basidiomycota

Clase: Basidiomycetes

Subclase: Agaricomycetidae

Orden: Agaricales

Familia: Schizophyllaceae

Posee un carpóforo en forma de concha o de abanico de 0,5-5 cm de diámetro; presenta bordes enrollados hacia abajo y en su parte superior es blanco grisáceo o pardo gris; con frecuencia es lanoso o felpudo. Los cuerpos fructíferos generalmente están adheridos en forma lateral al sustrato, aunque algunos presentan un pie o estípite pequeño, de 0,3-0,8 cm de longitud y 0,3-0,5 cm de ancho (Bran *et al.*, 2009; Chaves *et al.*, 2008).

2.2.3. *Xylaria feejeensis* (Berk.) Fr.

Phylum: Ascomycota

Clase: Pyrenomycetes

Orden: Xylariales

Familia: Xylariaceae

Cuerpo fructífero erecto, simple, con una altura total de 6-26 mm, la cabeza fértil mide 22.5 mm de alto x 1.5-3 mm de diámetro, cilíndrico ligeramente claviforme, recto o ligeramente curvado, aplanado. El estroma con ápices redondeados y fértiles, ostiolos papilados que le confieren un aspecto rugoso al estroma, la corteza exterior negra correosa de 15-20 micras de espesor, el interior blanco cremoso, sólido y esponjoso. Peritecios inmersos, subglobosos, de 0.3-0.5 mm de diámetro, tiene ostiolos ampliamente cónicos, negros de 170 micrómetros de diámetro (Medel *et al.*, 2008; Fournier, 2009).

2.2.4. *Pleospora spp*

Phylum: Ascomycota
Clase: Ascomycetes
Orden: Coniochaetales
Familia: Coniochaetaceae
Género: Pleospora

Ascomas inmersos en posición peritecial. Pared compuesta por varias capas de pequeñas células

marrón. Posee una única asca fusiforme con un pequeño anillo apical. Ascosporas elipsoides fusiformes, hialinas, germinando en el asco y la formación de pequeñas asconidias con estructura ramificada, asexual, alantoides e hialinas (Ramaley, 1997).

2.2.5. *Trichoderma*

Phylum: Eumycota
Subdivisión: Deuteromycotina
Clase: Hyphomycetes
Orden: Hyphales (Moniliales)
Familia: Moniliaceae

Trichoderma sp. se caracteriza por poseer conidióforos hialinos, erectos, muy ramificados y sin verticilos, las ramas son sencillas o están agrupadas y los conidios son hialinos, unicelulares, de forma ovoide y se originan en pequeños racimos terminales. Se puede identificar fácilmente en medio de cultivo por su rápido crecimiento y por las masas de conidios verdes. Es un saprófito común de suelo y madera (Hidalgo, 1989; Domsch *et al.*, 1993; Porras, 2000).

2.3. Control Biológico

El Control Biológico consiste en el empleo o utilización de enemigos naturales como patógenos, depredadores y parasitoides, con el propósito de mantener las poblaciones (Alomar *et al.*, 2005). Su objetivo es reducir la densidad del inóculo o de las actividades del patógeno o parásito en su estado activo o latente. En esta relación hay múltiples factores involucrados, como: el hospedante, el parásito y el ambiente (Porrás, 2000).

Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales (Fernández, *et al.*, 2001). En el caso de los hongos, los más utilizados en control biológico son los de la clase Hyphomycetes y de éstos, varias especies de los géneros *Trichoderma* (Infante *et al.*, 2009; Ezziyyani *et al.*, 2004) y bacterias de *Actinomicetales*, *Pseudomonas* (Ezziyyani *et al.*, 2007).

Los mecanismos de acción por medio de los cuales los antagonistas afectan a los fitopatógenos son:

Antibiosis: Se define como el antagonismo a través de metabolitos, fungicidas o antibióticos como compuestos: enzima lítica, compuestos volátiles, sideróforos u otras sustancias tóxicas (Wafaa *et al.*, 2007).

Competencia: Constituye un mecanismo de acción antagónica muy importante. Suprime el desarrollo de un microorganismo, ya sea, por la lucha por espacio, nutrientes o cualquier otro factor ambiental que limite su desarrollo (Porras, 2000).

Micoparasitismo: Es definido como una simbiosis antagónica entre organismos. Generalmente, están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasa, celulasa, b1, 3-glucanasa y proteasa, que rompen las estructuras de los hongos parasitados (Infante, 2009).

Janisciewicz y Korsten (2002) que mencionan por lo general más de un mecanismo puede estar implicado en el biocontrol y en ningún caso se ha observado que exista un solo mecanismo de acción involucrado en el control del patógeno (Bautista, 2006).

3.OBJETIVOS

3.1. General

Evaluar la eficacia de la aplicación de cinco cepas de hongos nativos como controladores biológicos del *M. citricolor* en el cultivo de café.

3.1. Específicos

- Caracterizar morfológicamente aislamientos de *Mycena citricolor* que crecen en distintas zonas de vida en los cantones Olmedo y Chaguarpamba.
- Probar la eficacia de la utilización de hongos nativos como controladores biológicos del *Mycena citricolor*, en condiciones in vitro.
- Determinar los mecanismos de antagonismo que presentan los hongos estudiados.

4.MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación

El experimento se llevó a cabo en el sur de Ecuador, provincia de Loja, cantones Olmedo (1200 m s.n.m) y Chaguarpamba (1050 m s.n.m).

4.2. Muestreo

Los cantones fueron separados en tres zonas de vida clasificadas según Holdridge (1967) en: Bosque muy seco Tropical (bms- T), Bosque seco Montano Bajo (bs-MB) y Bosque seco Pre Montano (bs-PM). En cada una de ellas se establecieron dos parcelas de 400 m² (Fig. 3). De las plantas de café que presentaban la enfermedad, se muestrearon diez individuos diferentes y de cada una se colectaron diez hojas al azar. Esta actividad se realizó basándonos en el método planteado por Mostacedo y Fredericksen (2000).

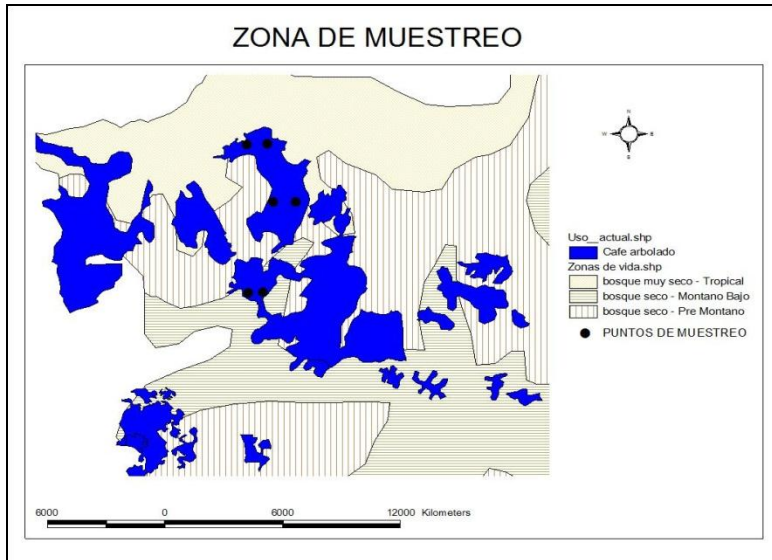


Figura 3. Localización de la zona de muestreo

4.3. Aislamiento del *Mycena citricolor*

Retiramos de la hoja de café infectada una porción de 1x1 cm (Arzate *et al.*, 2006), mitad sana y mitad enferma y la desinfectamos con hipoclorito de sodio al 1% por un minuto, para luego ser enjuagadas con agua destilada estéril y se secaron con papel filtro estéril (Agrios, 2002). Éstos segmentos de hojas fueron sembrados en cajas Petri que contenían medio de cultivo MEA (Malt extract agar) y se incubaron a 25°C (Mier *et al.*, 2002).

4.4. Caracterización morfológica del *Mycena citricolor*

Con el fin de hacer una caracterización morfológica del *M. citricolor* y para evidencia o descartar posibles morfotipos de esta especie se tomaron 20 gemas de cada sitio de estudio y con ayuda de un estereoscopio y el programa Imagine Tools Software versión 3.0, medimos el diámetro de la gema (mm), longitud del pedicelo (mm) y el largo total de la gema del *M. citricolor* como se indica en la Fig. 4 (López, 2001).

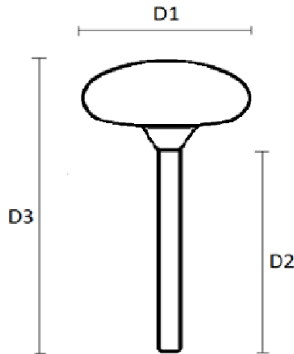


Figura 4. Medias tomadas del cuerpo fructífero de *M. citricolor*: D1= diámetro de la gema, D2= longitud del pedicelo y D3= Largo total.

Las mediciones microscópicas correspondieron al ancho y largo de 50 conidias por cada sitio de muestreo (Anexo 1 y 2).

4.5. Pruebas de Antagonismo y Porcentaje de Inhibición

Se tomó un disco de 5 mm de diámetro de micelio de un hongo nativo y se lo depositó en un extremo de la caja Petri, en el otro extremo sembramos el *M. citricolor*, y evaluamos midiendo el radio de crecimiento (cm) de los hongos cada 24 horas aplicando la escala planteada por Bell *et al.*, (1982) citado por Arzate *et al.*, (2006) donde:

- 1: El hongo nativo crece por completo sobre el patógeno y cubre la superficie del plato.
- 2: El hongo nativo cubre al menos 2/3 partes de la superficie del medio respecto al fitopatógeno.
- 3: Ambos hongos cubren la mitad de la superficie del plato.
- 4: El patógeno coloniza 2/3 partes del plato respecto a el hongo nativo.

- 5: El patógeno rodea por completo al hongo nativo y cubre la superficie del plato.

Se consideró que los hongos que se encuentren dentro de las clases 1, 2 y 3 serían los que presenten antagonismo.

Se hicieron 4 repeticiones para cada tratamiento que corresponde a las 4 cepas de los hongos nativos y 1 testigo (Fig. 5). Las cepas de los hongos nativos y el testigo se obtuvieron de la colección del laboratorio de Fitopatología de la Universidad Técnica Particular de Loja. Los tratamientos fueron:

T1= *M. citricolor* + *Pleospora* spp.

T2= *M. citricolor* + *Schizophyllum commune*

T3= *M. citricolor* + *Xylaria feejeensis*

T4= *M. citricolor* + *Pycnoporus sanguineus*

T5= *M. citricolor* + *Trichoderma harzanium* (Testigo)

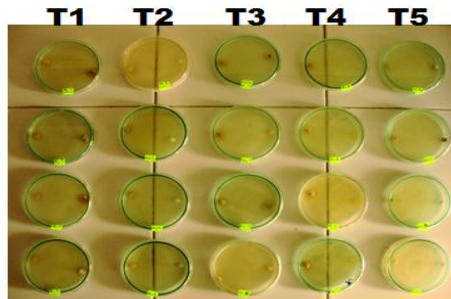


Figura 5. Prueba de antagonismo con 4 repeticiones cada tratamiento.

4.6. Evaluación por competencia de espacio

Al reverso de cada caja se dibujaron orientaciones fijas: Norte, Sur, Este y Oeste (Álvarez *et al*, 2001) (Fig. 6) y con ayuda de una regla milimetrada, medimos cada día los radios de crecimiento del patógeno (RCP) y de los antagonistas (RCA) (Fernández *et al.*, 2009) tanto para el testigo como para los cultivos duales. Así mismo se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), y se calculó con base a la siguiente fórmula (Arzate *et al.*, 2006; Aceves *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2009):

$PICR = [(D1-D2)/D1 \times 100]$ empleando la fórmula de Ezziyani *et al.* (2004); donde:

D1 = radio del patógeno testigo

D2 = radio del patógeno frente al posible antagonista

La evaluación por competencia de espacio fue considerada a los 12 días de sembrados los hongos, cuando el patógeno cubrió totalmente la caja Petri en el tratamiento testigo (sin el hongo antagonista).

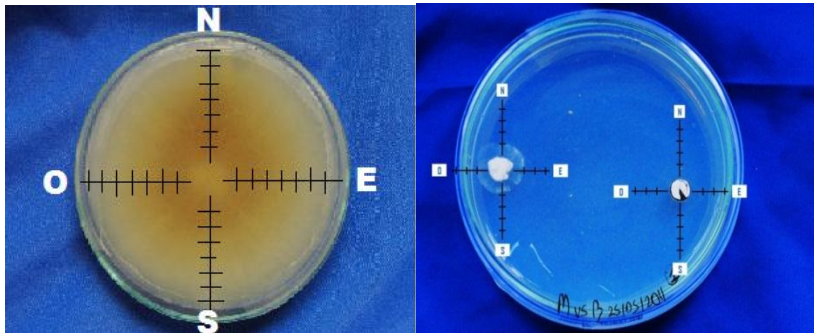


Figura 6. Orientación dibujada en la parte posterior de la caja Petri tanto en el testigo y en los cultivos duales.

4.7. Determinación de micoparasitismo

De los hongos que presentaron efecto antagónico se tomó una porción de la franja de unión con una aza

estéril. Se colocó en un portaobjetos con una gota de azul de metileno y KOH, y se evaluó la interacción de las hifas por observación en un microscopio óptico Olympus CX31 con cámara incorporada Cannon Eos RebelT T2I con lente Canon 60mm, con aumento de 100x. La evaluación consistió en identificar el tipo de micoparasitismo: la deformación, vacualización, penetración, enrollamiento, estrangulamiento, fragmentación del micelio de los patógenos causados por las cepas antagónicas (Martínez *et al.*, 2008; Reyes *et al.*, 2008; Quiroz *et al.*, 2009). Se analizaron 4 muestras por tratamiento.

El análisis estadístico se realizó haciendo un análisis de varianza (Anova), y la prueba de comparaciones de Tukey con el programa estadístico SPSS versión 15.0 para Widows.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterización morfológica del *Mycena citricolor*

En promedio en los sitios de muestreo, el largo del estípite o pedicelo del cuerpo fructífero tiene un rango de (0,2) 0,9-1,2 (1,9) mm y (0,2) 0,2 (0,3) mm de ancho de la gema. Mientras que los resultados de análisis de varianza que se exhibe en la Tabla 1, indica que no hay diferencias significativas en el largo del estípite o pedicelo ($P=0,819$) ni en el ancho de la gema ($P=0,929$) del cuerpo fructífero en estado asexual en las diferentes zonas de vida (Figura 7).

Tabla 1. Análisis de varianza de largo del estípite y ancho de la gema

				Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Largo de Estípite * Sitio de Muestreo	Inter-grupos	(Combinadas)		0,064	2	0,032	0,201	0,819
	Intra-grupos			9,126	57	0,160		
	Total			9,190	59			
Ancho de la Gema* Sitio de Muestreo	Inter-grupos	(Combinadas)		0,000	2	0,000	0,073	0,929
	Intra-grupos			0,130	57	0,002		
	Total			0,130	59			

Resultados

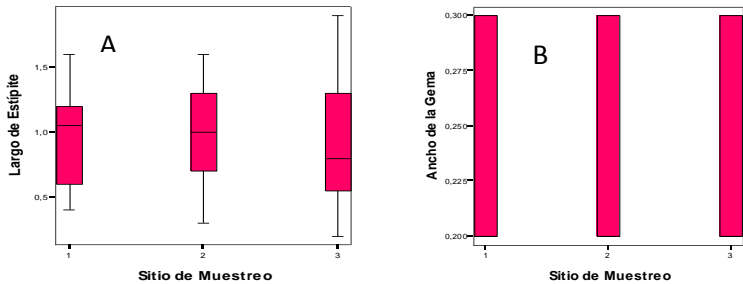


Figura 7. A) Largo del Estípite y B) Ancho de la gema de *M. citricolor* en cada sitio de muestreo muestran que no existen diferencias significativas entre las medias.

Las mediciones de las conidias, presentaron unas dimensiones entre los rangos de (3) 5 - 6 (8) μm de largo y de (1) 1-1,5 (3) μm de ancho. El resultado de análisis de varianza en la tabla 2 demuestra que no existe diferencia significativa entre largo ($P=0,278$) y ancho ($P=0,701$) en los sitios de estudio (Fig. 8).

Tabla 2. Análisis de varianza de largo y ancho de las conidias de *M. citricolor*.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Largo	Inter-grupos	2,813	2	1,407	1,291	0,278
	Intra-grupos	160,180	147	1,090		
	Total	162,993	149			
Ancho	Inter-grupos	0,093	2	0,047	0,357	0,701
	Intra-grupos	19,240	147	0,131		
	Total	19,333	149			

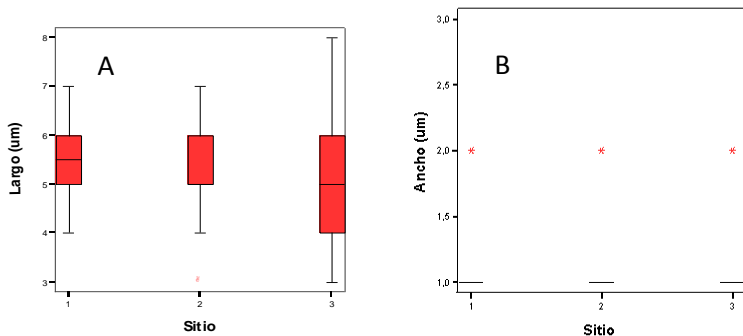


Figura 8. A) Largo de las conidias y B) ancho de las conidias en los distintos sitios de muestreo no muestran diferencias significativas.

5.2. Pruebas de Antagonismo y Porcentaje de Inhibición

Los hongos que se encuentran dentro de las clases 1,2 y 3 en la escala de Bell son los que presentan antagonismo es así que únicamente *Pycnoporus sanguineus* presenta actividad antagónica frente a *M. citricolor* ubicándose en la clase 3, donde ambas especies cubren la mitad de la superficie del plato que corresponde a la clase 3 (97,5%). Además el testigo *Trichoderma harzianum* presenta un antagonismo escala 1 (70%) y escala 2 (30%) en el cual, este hongo crece

Resultados

por completo sobre el *M. citricolor* y cubre las 2/3 partes de la superficie del medio (Tabla 3, Fig. 9).

Tabla 3. Análisis de antagonismo planteada por Bell *et al.*, (1982).

Escala de Bell	<i>P. spp</i> (%)	<i>X. feejeensis</i> (%)	<i>S. commune</i> (%)	<i>P. sanguineus</i> (%)	Testigo: <i>T.harzianum</i> (%)
1	0	0	0	0	70
2	0	0	0	2,5	30
3	8,8	0	0	97,5	0
4	91,2	100	58,5	0	0
5	0	0	41,5	0	0

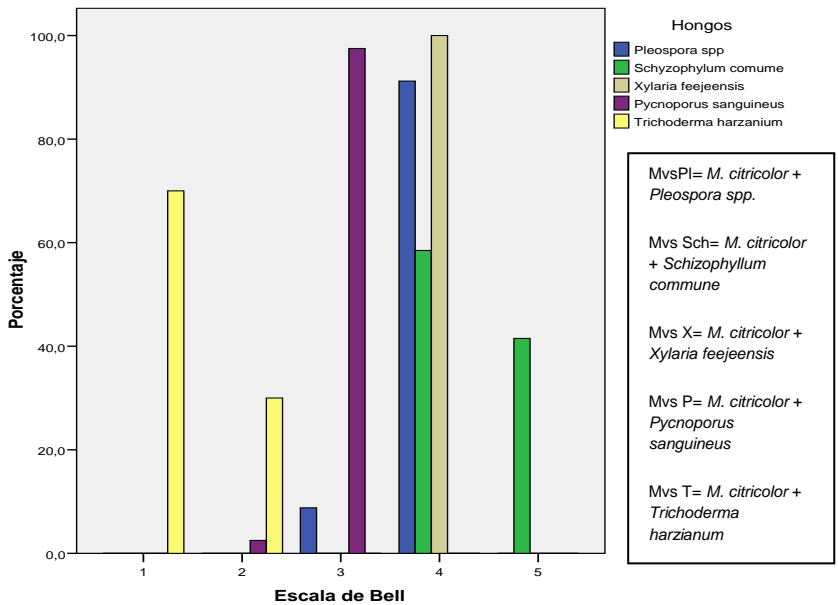


Figura 9. Escala de antagonismo planteada por Bell *et al.*, (1982) indica que *P. sanguineus* y *T. harzianum* muestran antagonismo ubicándose en clase 1, 2 y 3.

5.3. Competencia por espacio

Los radios de crecimiento de los antagonistas (RCA) y los radios de crecimiento del patógeno (RCP) se presentan en el Anexo 3. En base a los promedios, el testigo *Trichoderma harzianum*, tiene un promedio de crecimiento de 4,7 cm frente a la enfermedad (1,13 cm). A su vez, *Pycnoporus sanguineus* obtuvo un promedio de 3,6 cm frente al crecimiento del *M. citricolor* de 3,15 cm (Fig. 10 y 11). En los otros casos los radios de crecimiento de *M. citricolor* fueron superiores con respecto a los radios de crecimiento que presentaron los antagonistas.

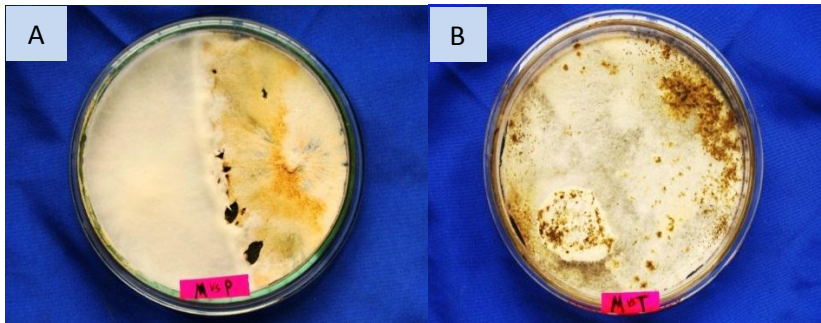
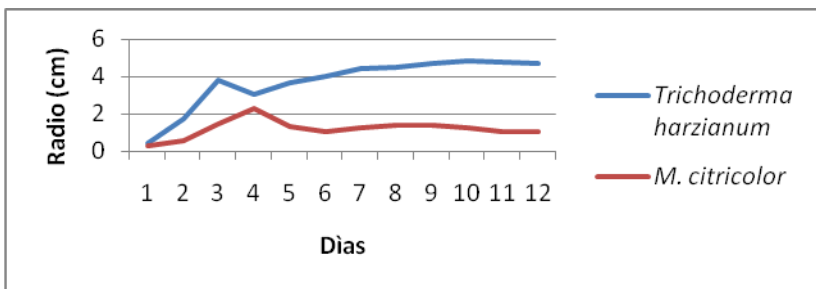
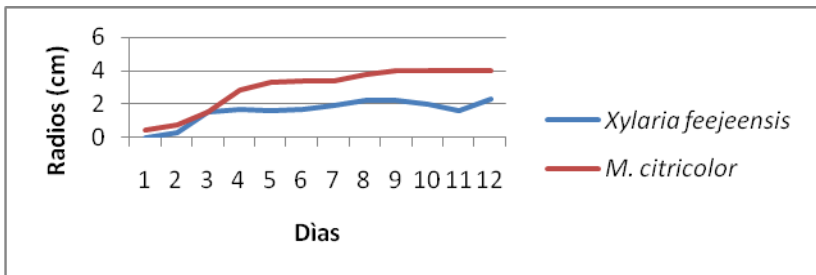
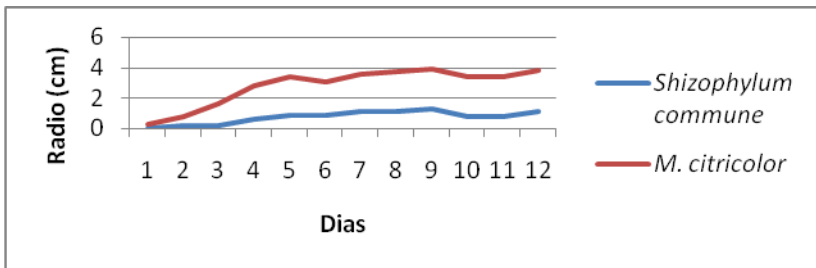
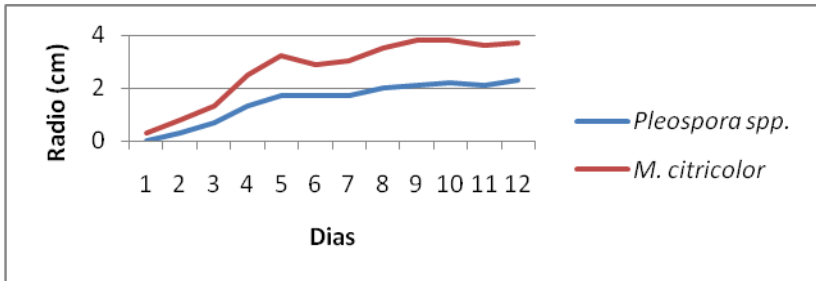


Figura 10. A) Antagonismo de *P. sanguineus* frente a *M. citricolor* y B) *T. harzianum* frente a *M. citricolor* in vitro.

Resultados



Resultados

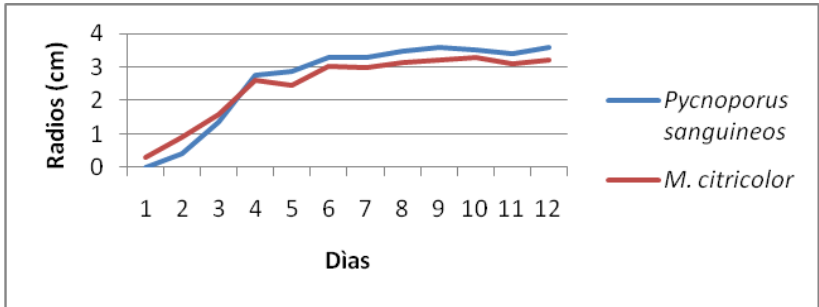


Figura 11. Crecimiento radial de *M. citricolor* frente aislamientos de hongos nativos en cultivos duales, por 12 días de evaluación en donde únicamente *P. sanguineus* y *T. harzianum* muestran radios superiores a *M. citricolor*.

El análisis de varianza muestra que existen diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 4) y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey indica que los tratamientos con *P. sanguineus* y *T. harzianum* son distintos a los otros tratamientos probados (Anexo 4).

Tabla 4. Análisis de varianza del radio de crecimiento de los antagonistas (RCA) y radio de crecimiento del patógeno (RCP) en los distintos tratamientos.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Radio de Crecimiento del Antagonista	Inter-grupos	36,002	4	9,001	21,890	0,000
	Intra-grupos	6,168	15	0,411		
	Total	42,170	19			

En el comportamiento de los cultivos duales con respecto a la reducción del crecimiento de *M. citricolor*, se observa que para el doceavo día, *Trichoderma harzianum* fue quien exhibió el mayor porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) con un 78,3 %, seguido de *Pycnoporus sanguineus* con un 30,6 %. Los demás tratamientos mostraron una reducción del crecimiento del *M. citricolor* menor al 20% (Fig. 12).

El análisis de varianza muestra diferencias significativas de PICR entre tratamientos ($P= 0,000$) (Fig. 13) y conforme al análisis de subconjuntos homogéneos de Tukey (Tabla 6), se evidencia que el testigo *T. harzianum* tiene diferencias significativas con los tratamientos estudiados; así mismo *P. sanguineus* difiere estadísticamente con los tratamientos: *Schizophyllum commune*, *Xylaria feejeensis*, y *Pleospora spp.*

Resultados

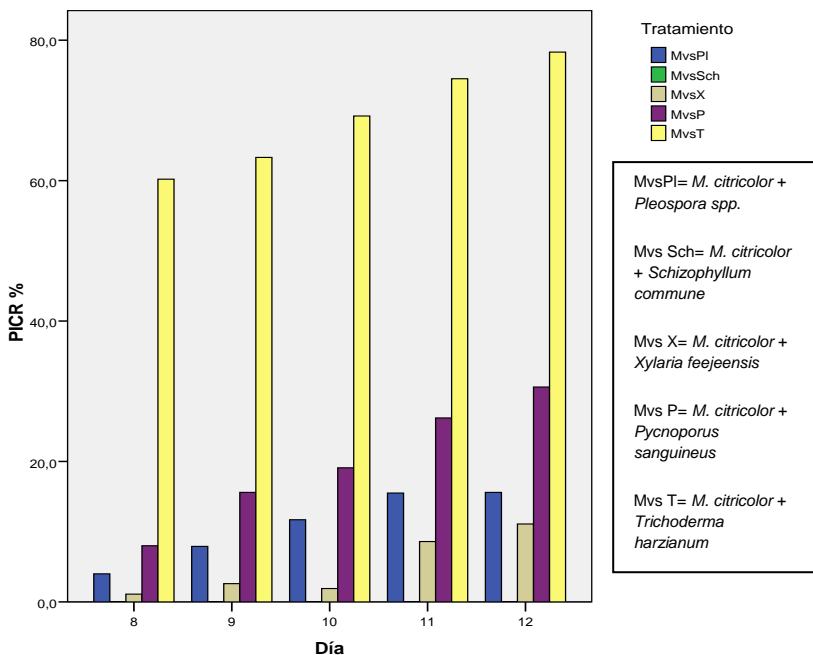


Figura 12. En los tratamientos de *M. citricolor* frente a *Pleospora* spp. (MvsPI), *M. citricolor* con *S. commune* (MvsSch), *M. citricolor* con *X. feejeensis* (MvsX), *M. citricolor* con *P. sanguineus* (MvsP) y *T. harzianum* (MvsT) frente a *M. citricolor* la Inhibición del crecimiento radial (PICR) de *M. citricolor* a partir del octavo día hasta el doceavo día, muestra que *P. sanguineus* (MvsP) y *T. harzianum* (MvsT) son los únicos que inhiben a *M. citricolor*.

Resultados

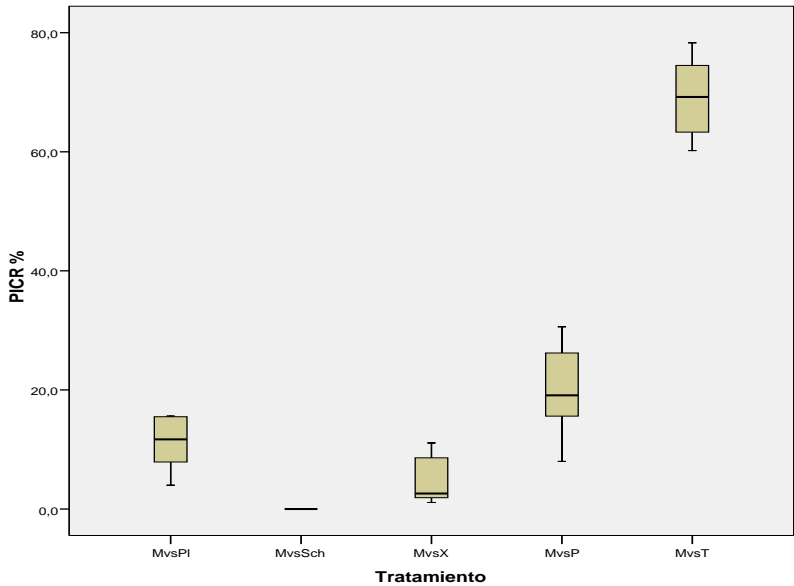


Figura 13. El Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial (PICR) en los distintos tratamientos muestra que existen diferencias significativas entre *M. citricolor* + *T. harzianum* (MvsT) y los demás tratamientos al igual que *M. citricolor* + *P. sanguineus* (MvsP) que difiere de los otros tratamientos.

Tabla 6. Subconjuntos homogéneos de los tratamientos estudiados (HSD Tukey).

HSD de Tukey(a)	Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = .05			
			2	3	4	1
	MvsSch	5	,000			
	MvsX	5	5,060			
	MvsPI	5	10,940	10,940		
	MvsP	5		19,900		
	MvsT	5			69,100	
	Sig.		,063	,169	1,000	

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

5.4. Determinación de micoparasitismo de *P. sanguineus* y *T. harzianum* sobre *M. citricolor*

P. sanguineus parasitó y causó la destrucción o lisis en las hifas de *M. citricolor* (Fig. 14).

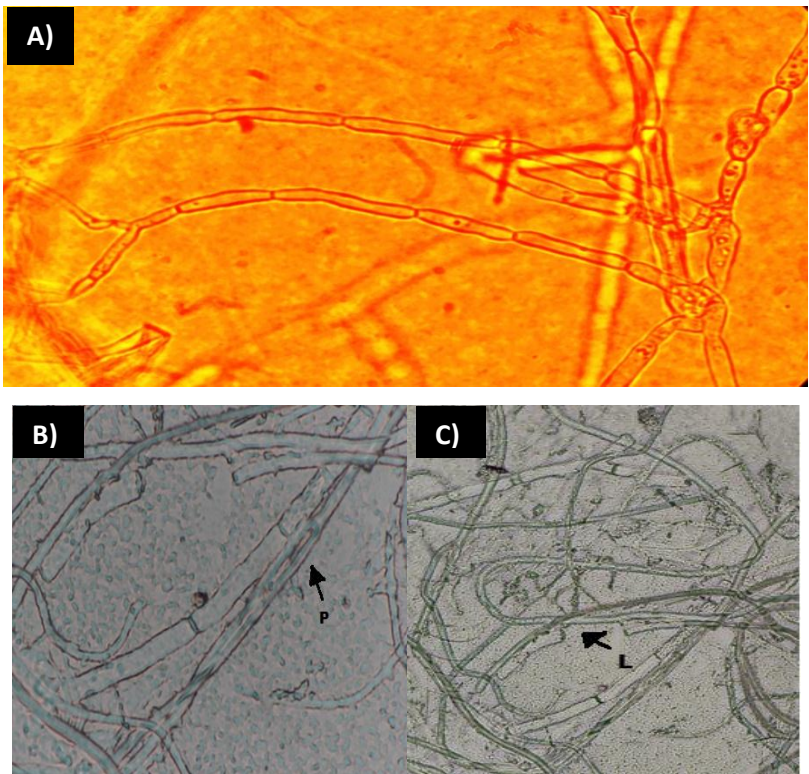
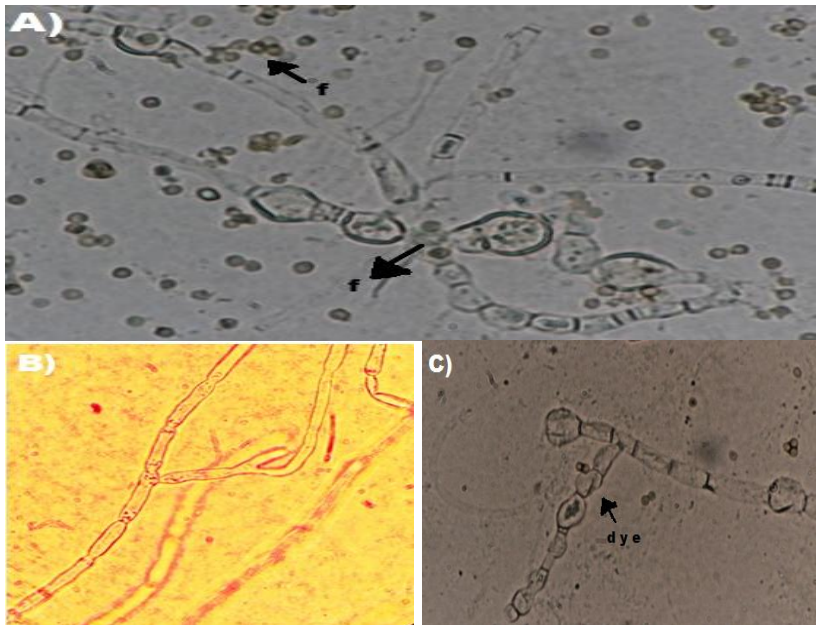


Figura 14. A) Hifas de *M. citricolor*, B) Penetración (P) de *P. sanguineus* en hifas de *M. citricolor*. C) Lisis (L) de las hifas de *M. citricolor* causada por el antagonista *P. sanguineus*.

Por otro lado el parasitismo del testigo *Trichoderma harzianum* se presenta formando conidias sobre las hifas de *M. citricolor* (Fig. 15A), enrollándolo y deformándolo (Fig.15C). Además, *T. harzianum* rodea las conidias de *M. citricolor* causando deformaciones como septos muy marcados y mayor grosor (Fig. 15E).



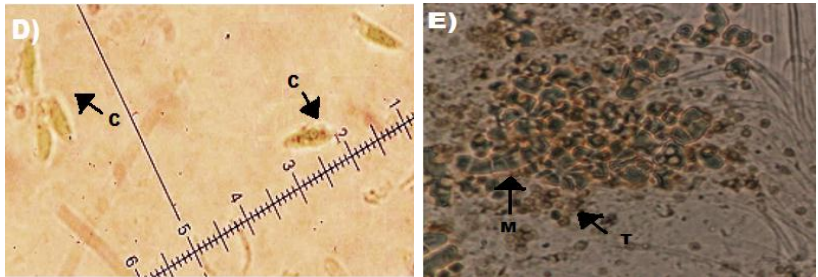


Figura 21.

A) Formación de conidias (f) de *T. harzianum* sobre las hifas de *M. citricolor*. B) Hifas de *M. citricolor* sin la presencia del antagonista. C) Enrollamiento y Deformación (d y e) de las hifas de *M. citricolor* en presencia de *T. harzianum*. D) Conidias (c) de *M. citricolor* sin presencia del antagonista. E) Deformación de conidias de *M. citricolor* (M) en presencia de *T. harzianum* (T).

6. DISCUSIÓN

6.1. Caracterización morfológica

En América latina algunos grupos de hongos Basidiomycota y Ascomycota no han sido investigados. Según un proyecto de biodiversidad micológica del Ecuador de la PUCE *M. citricolor* ha sido reportado para nuestro país, pero es escasa la información científica referente a estudios morfológicos y moleculares de *M. citricolor* que permitan confrontar con los resultados de nuestro estudio. Esta consideración se fundamenta, en los trabajos realizados por Rao *et al.*, (1987) y Avelino *et al.*, (2007) que afirman que la especie se limita al continente americano de donde es originaria.

En la caracterización morfológica de las gemas y conidias del *M. citricolor* que crece en Olmedo y Chaguarpamba, no se encontró diferencias estadísticas significativas. Estos resultados son parecidos al trabajo de López (2001), que exhibe medidas de la longitud de pedicelo de 1.11 y 0.24 mm de diámetro de la gema, medidas parecidas a las de nuestro estudio donde el

largo del estípite o pedicelo tiene un rango de (0,2) 0,9-1,2 (1,9) mm y (0,2) 0,2 (0,3) mm de ancho de la gema.

A pesar de revisar varios estudios de caracterización morfológica del *M. citricolor* (Vargas, 1994; Porras 2000; López, 2001; Rivillas *et al.*, 2011) no se pudo encontrar un estudio a nivel microscópico que hayan medido las conidias; nuestra investigación, con los resultados obtenidos presentan datos inéditos para la especie estudiada, en donde las conidias de *M. citricolor* muestran un rango de (3) 5 - 6 (8) μm de largo y de (1) 1-1,5 (3) μm de ancho y no presentan diferencias estadísticamente significativas en las distintas zonas de vida.

Conforme a los resultados de nuestra investigación y considerando que la colección de muestras para el estudio morfológico consistió en un muestreo de hojas directamente de la planta en estado vivo, *M. citricolor* se propaga en la zona de estudio por reproducción asexual a través de conidias. En 1999, Wang y Avelino quienes citan a Carvajal (1939), manifiestan que la reproducción

sexual (desarrollo de carpóforos) en *M. citricolor* es bastante raro y ocurre principalmente en las hojas muertas al final de la epidemia, lo que parece sugerir que cualquier participación de basidiosporas en el desarrollo de la epidemia es insignificante (Mora *et al.*, 1989; Avelino *et al.*, 2007; Rivillas *et al.*, 2011).

Según Wellman (1950); Bonilla (1980); Borbón (1999) y Avelino *et al.*, (2007) demostraron que para el desarrollo de *M. citricolor* son favorables zonas húmedas (80 a 95%), altitudes entre los 1100 y 1550 m s.n.m. con temperaturas entre 18° y 24° C lo que probablemente contribuye a acortar el período de latencia. Estos autores demostraron que precipitaciones altas y abundante sombra constituyen variables ambientales propicias para facilitar la propagación de la enfermedad. En este contexto, en un estudio realizado por el Programa Forestal (2004) en los cantones Olmedo y Chaguarpamba, demostraron que las precipitaciones oscilan entre los 1000 y 1500 mm y temperaturas 20 a 22 °C lo que significaría que se tendría las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad. A pesar

de que el estudio se realizó en distintas zonas de vida sus condiciones climáticas no difieren de manera relevante, lo que podría ser la causa para que en nuestro estudio no se encuentren morfotipos de esta especie. Estos resultados son parecidos al trabajo de López (2001), que no encontró diferencias significativas entre el largo del pedicelo y ancho de la gema en varias zonas cafetaleras de Costa Rica.

6.2. Pruebas de Antagonismo

Para las pruebas de antagonismo usamos los hongos nativos: *Pleospora spp.*, *Schizophyllum commune*, *Xylaria feejeensis*, *Pycnoporus sanguineus* y *Trichoderma harzianum* puesto que muchos de los intentos de introducción de microorganismos forasteros fracasan por la incapacidad del microorganismo introducido de vencer la competencia por espacios y nutrimentos de los microorganismos locales mejor adaptados, de manera que los introducidos más temprano que tarde son eliminados. Una salida a esta disyuntiva es la selección de microorganismos locales con las características deseadas (Valencia *et al.*, 2001).

Conforme a los estudios realizados por Cook (2000), la capacidad antagónica de algunas cepas de hongos hacia hongos fitopatógenos se puede definir con base en la destrucción total o parcial de las poblaciones de patógenos. Bajo este marco de referencia, podemos decir que *Pycnoporus sanguineus* tiene capacidad antagónica a pesar de controlar parcialmente al *M. citricolor* en condiciones in vitro.

6.2.1. Mecanismos de antagonismo

Los mecanismos de antagonismo fueron denotados con las interacciones hifales en donde *P. sanguineus* tuvo la habilidad de destruir y penetrar las hifas de *M. citricolor*, efectos que pueden estar relacionados con la producción de enzimas, que son un componente importante en el proceso de micoparasitismo. Siqueria *et al.*, (1997) relatan la presencia de tres importantes enzimas hidrolíticas, α -amilasa, β -glicosidasa y xilanasas en micelios de *P. sanguineus*. Smania *et al.*, (1998) y Peiter (2007), observaron la síntesis de metabolitos secundarios y la actividad antimicrobiana contra bacterias de productos alimenticios.

Asimismo Assi (2005) y Viecegli *et al.* (2009, 2010) utilizaron extractos acuosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* para el control de *Calleotrichum lindemuthianum* en ensayos in vitro y en condiciones de campo, en un cultivo de frejol, concluyendo que hubo control del patógeno, tanto por actividad antimicrobiana directa, a través de inhibición de germinación de conidios, como por inducción de resistencia local y sistémica, a través de actividad de peroxidasas (Peiter, 2007). Mientras que obtuvieron resultados semejantes con una reducción de severidad de la mancha angular de frejol, en condiciones de campo, (De Oliveira *et al.*, 2011).

La colonización del área compitiendo por espacio y nutrientes es una manera de ejercer biocontrol, al reducir o detener completamente el desarrollo del micelio (Dennis y Webster, 1971) en Arzate *et al.*, 2006. En estudios de laboratorio Sandoval *et al.*, (2002), informaron un elevado nivel de competencia por el sustrato de la cepa A-34 de *Trichoderma harzianum* Rifai respecto a *R. solani*, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *F. oxysporum* Schl., *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Macrophomina*

phaseoli (Maubl.) y *Phytophthora* sp. (García *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2008).

En nuestro estudio *T. harzianum* enrrolla y deforma las hifas de *M. citricolor*. Bernal *et al.*, (2004) en Reyes *et al.*, (2008) encontraron enrollamiento y penetración de *Trichoderma* en *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense (E.F. Smith) Snyd & Hans. Mientras que estudios realizados in vitro en 1971 por Salas, determinaron que diversos aislamientos de *Trichoderma* fueron capaces de parasitar y provocar lisis del micelio de *M. citricolor* mediante producción de toxinas (Vargas, 1984).

Por otra parte 5-hidroxivertinolide un butenolide diferente de vertinolide fue aislado del hongo *T. longibrachiatum* Rifai aggr. el cual es antagónico para el hongo *Mycena citricolor*, el agente responsable del ojo de gallo (Andrade *et al.*, 1992).

Los hongos *Pleospora* spp., *Xylaria feejeensis* y *Schizophyllum commune* no presentaron actividad antagónica pero mediante revisión bibliográfica se conoce que el género *Xylaria* ha sido reconocido por ser

un eficiente productor de metabolitos secundarios tales como Terpenoides, Xyloketal y Cytochalasin (Gu y Ding, 2008) que inhiben el crecimiento de patógenos de plantas, hongos, bacterias y humanos (Davis. *et al.*, 2003). Así mismo se ha reportado que *Xylaria sp.* (aislado de *Ginkgo biloba* L.), posee un compuesto químico (7-amino-4-metilcumarina) con una amplia actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos como *Aspergillus niger* van Tieghem y *Penicillium expansum* Link (Ramos *et al.*, 2010). Además Sordaricin, un metabolito aislado del hongo *Xylaria sp.* presenta actividad antifúngica moderada contra *Candida albicans* (Liu *et al.*, 2008).

Por otro lado de acuerdo con Tsujiyama y Minami (2005), encontraron actividad fenol-oxidasa la cual fue detectada principalmente en zonas de confrontación entre los hongos y debajo de los micelios durante el combate interespecífico en los que han participado *Schizophyllum commune* en agar y además se estableció la producción de enzimas lignolíticas mangneso peroxidasas y lacasas durante la interacción

de *Schizophyllum commune* con *Trichoderma viride* (Chinomso, 2010).

Xylaria a pesar de mostrar actividad antagónica por antibiosis contra algunos hongos y bacterias, es posible que distintos factores químicos con actividad antagónica sean producidos y dependientes de las interacciones específicas entre especies del género *Xylaria* con diversos microorganismos (Ramos *et al.*, 2010), esta podría ser una razón por las que *Xylaria feejeensis* y *Schizophyllum commune* no mostraron antagonismo para *M. citricolor*.

7. CONCLUSIONES

- Se encontró al *M. citricolor* en su estado asexual, en donde el largo del pedicelo tiene un rango de (0,2) 0,9-1,2 (1,9) mm y el diámetro de la gema un rango de (0,2) 0,2 (0,3) mm medidas que están dentro de los rangos presentadas por otros autores.
- En *M. citricolor* no se pudo encontrar un estudio a nivel microscópico, sin embargo en nuestro estudio las conidias mostraron medidas de (3) 5 - 6 (8) μm de largo y de (1) 1-1,5 (3) μm de ancho.
- En las pruebas de antagonismo *P. sanguineus*, presentó parasitosis y destrucción de las hifas de *M. citricolor*, mientras que *T. harzianum* enrolla y deforma al *M. citricolor* y además rodea las conidias de *M. citricolor* causando deformaciones como septos muy marcados y de mayor grosor como mecanismos de antagonismo.
- *Trichoderma harzianum* sigue siendo el mejor antagonista para *M. citricolor*.

8. RECOMENDACIONES

- Para futuras investigaciones recomendamos primeramente estandarizar los hongos, objeto de estudio, en un mismo medio de cultivo para asegurarnos de que crecerán bajo las mismas condiciones.
- Sería importante elaborar un estudio a nivel genético para determinar si existe variabilidad genética de *M. citricolor* en distintas zonas de vida.
- Además realizar un estudio de metabolitos secundarios que permita conocer los compuestos que son responsables del antagonismo de los hongos estudiados.

9. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Aceves M, Casimiro A, Sánchez O, Solano M, Ariza L, Barrios R, Aristeo M. 2009. Biocontrol in vitro con *Trichoderma spp.* de *Fusarium subglutinans*, agentes causales de la "Escoba de Bruja" del mango (*Mangifera indica* L.). Revista Mexicana de Fitopatología. 27 (1):18-26.
- Agrios G. 2002. Fitopatología. Séptima Reimpresión de la Segunda Edición. México. Editorial Limusa S.A.
- Alomar O, Ramón A. 2005. Control Biológico de Plagas: Biodiversidad Funcional y Gestión del Agroecosistema. Biojournal. 1: 1-10.
- Álvarez T, Peláez D. 2001. Manual de Micología Experimental. Manual No. 007. Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas IIFB.
- Andrade R, Ayer W, Mebe P.1992. The metabolites of *Trichoderma longibrachiatum*. Part 1. Isolation of the metabolites and the structure of trichodimerol. Can J Chem. 70:2526–2535.
- Arzate J, Michel A, Domínguez V, Santos O. 2006. Antagonismo de *Trichoderma spp.* sobre *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka Negra del Plátano (*Musa sp.*) in vitro e invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología. 24 (2): 98-104.
- Assi L. 2005. Controle de *Calletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn.) Scrib na cultura do feijao (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo extracto do cogumelo *Pycnoporus sanguineus* (L.ex Fr.) Merechal

Bibliografía

Candido Rondon. Tesis. Universidade Estadual do Oeste do Paraná-UNIOESTE.

Avelino J, Sandrine C, Barboza B, Barquero M, Alfaro R, Esquivel C, Durand J, Cilas C. 2007. Topography and Crop Management Are Key Factors for the Development of American Leaf Spot Epidemics on Coffee in Costa Rica. *Phytopathology*. 97 (12): 1532-1542.

Bell D, Well H, Markham C. 1982. "In vitro" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*. 72: 379-382.

Bernal A, Andreu C, Moya M. 2004. Utilización de *Trichoderma spp.* como alternativa ecológica para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (E.F. Smith) Snyder & Hans. Disponible en: <http://www.virtualcentr.org>.

Bobadilla E. 2004. Durabilidad natural de la madera de cinco especies aptas para la industria de la construcción. Tesis. Universidad Nacional de Misiones.

Bonilla J. 1980. Estudio de ojo de gallo causado por el hongo *Mycena citricolor*. In Simposio Latinoamericano sobre Caficultura. IICA, PROMECAFE: 177-188.

Borbón O. 1999. Consideraciones sobre la problemática del ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en Costa Rica. En IV Congreso Nacional de Fitopatología.

Bibliografía

Bran M, Isaac O, Flores R, Cáceres R. 2009. Caracterización y producción de cuerpos fructíferos de cepas nativas del hongo comestible Asam (*Schizophyllum commune* Fr.). Programa Universitario de Investigación en Desarrollo Industrial –PUIDI. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Canet B, Ibarra G. 2002. PROMECAFE Implementan Investigación sobre “Ojo de Gallo”. Boletín PROMECAFE (94):2-3.

Cárdenas S. 2007. Caracterización morfológica y agronómica de la colección núcleo de café (*Coffea arabica* L.) del CATIE. Tesis. México. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.

Carvajal B. 1939. Ojo de gallo *Omphalia flavida*. Revista del Instituto de Defensa Café.7: 535-576.

Chávez J, Navarro E, Alvarado E. 2008. Informe de inventario de Macrohongos y Líquenes en Zona Protectora La Carpintera. Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio).

Chinomso V. 2010. The physiological response of the white-rot fungus, *Schizophyllum commune* to *Trichoderma Viride*, during interspecific mycelial combat. Tesis. Londres. University of Westminster.

Cook R. 2000. Advances in plant health management in the twentieth century. Annual Review of Phytopathology. 38: 95:116.

Davis E, Franklin J, Shaw J, Vilgalys R. 2003. Endophytic *Xylaria* (Xylariaceae) among liverworts and angiosperms: Phylogenetics,

Bibliografía

Distribution, and Symbiosis. *American Journal of Botany* 90 (11): 1661-1667.

De Oliveira F, Da Silva R. 2011. Biocontrol of bean angular leaf spot by bacterial antagonists. *Pesq agropec bras.* 46 (12):1603-1608.

Dennis C, Webster J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. Production of no-volatile antibiotics. *Transaction of the British Mycological Society.* 57:25-39.

Domsch K, Gams W, Anderson O. 1993. *Compendium of Soil Fungi: Trichoderma*. IHW-Verlag. 2: 794-809.

Ezziyyani M, Pérez S, Requena M, Rubio L, Candela M. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología.* 26: 69-78.

Ezziyyani M, Requena M, Pérez-Sánchez C, Candela M. 2007. Biological Control of *Phytophthora capsici* Root rot of pepper Using *Trichoderma harzianum*, *Streptomyces rochei* Ziyani In combination J. *Phytopathology.* 155: 342-349.

Fernández O, Vega L. 2001. Microorganismos antagonistas para el control Fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas.* (62): 96-100.

Fernández R, 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

Bibliografía

Zona Bananera Colombiana. Rev Fac Nal Agr Medellín 62(1): 4743-4748.

Fischersworing H, Robkamp R. 2001. Guía para la caficultura ecológica. Tercera edición. 152 p. Disponible en: www.ifoam.org.

García B, Riera R, Zambrano C, Gutiérrez L, 2006. Desarrollo de un fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la Región Andina Venezolana. Fitosanidad. 10 (2): 115-121.

González M. 2003. Cultivo in vitro de Ojo de gallo. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. 67: 91-93.

Gu W, Ding H. 2008. Two new tetralone derivatives from the culture of *Xylaria Hypoxylon* AT-028. Chinese Chemical Letters 19: 1323-1326.

Guédez C, Cañizález C, Castillo C, Olivar R. 2009. Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria spp.*). Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 29:34-38.

Guilcapi E. 2009. Efecto de *Tricocherma harzianum* y *Trichoderma viride*, en la producción de plantas de café (*Coffea arabica*) variedad caturra a nivel de vivero. Tesis. Ecuador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Bibliografía

- Greslebin G, Rajchenberg M. 2001. The genus *Tulasnella* with a new species in the Patagonian Andes forest of Argentina. *Mycol Res* 105:1149-1151.
- Hastrup A, Læssøe T. 2009. *Camillea* (Xylariaceae, Ascomycota), including two new species, along a trans-Andean altitude gradient in Ecuador. *Mycological Progress*. 8 (4):305-316.
- Hidalgo A. 1989. Comparación de dos métodos para la selección de aislamientos de *Trichoderma* para el combate biológico de *Fusarium* y *Rhizoctonia* en clavel. Tesis. Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 89 p.
- Holdridge L. 1967. *Ecología Basada en Zonas de Vida*. 1a. edición. Costa Rica.
- Ibarra J, Del Rincón M, Galindo E, Patiño M, Serrano L, García R, Carrillo J, Pereyra B, Alcázar A, Luna H, Galán L, Pardo L, Muñoz C, Gómez I, Soberón M, Bravo A. 2005. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48 (2):113-120.
- Infante D, Martínez B, González N, Reyes Y. 2009. Mecanismos de Acción de *Trichoderma* frente a hongos Fitopatógenos. *Rev Protección Veg*. 24 (1): 14-21.
- Janisciewicz W, Korsten L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*. 40: 411-441.

Bibliografía

- Liu X, Dong M; Chen X, Jiang M, Liv X, Zhou J. 2008. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp.YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. Appl. Microbiol. Biotechnol 78 (2): 241-247.
- Lodge D, McDowell W, Macy J, Ward S, Leisso R, Campos K, Kühnert K. 2008. Distribution and role of mat-forming saprobic basidiomycetes in a tropical forest. British Mycological Society Symposia Series.28:197-209.
- López A. 2001. Caracterización Molecular y Morfológica de aislamientos del hongo *Mycena citricolor* colectados en diferentes zonas cafetaleras de Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).
- Martínez B, Reyes Y, Infante D, González E, Baños H, Cruz A. 2008. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. Rev. Protección Veg. 23(2): 118-125.
- Medel R, Castillo R, Guzmán G. 2008. Las especies de *Xylaria* (Ascomycota, Xylariaceae) conocidas de Veracruz, México y discusión de nuevos registros. Revista Mexicana de Micología. 28: 101: 118.
- Mier T, Torielo C, Ulloa M. 2002. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de Laboratorio. 1a. edición. México. Universidad Autónoma Metropolitana.

Bibliografía

- Mora F, Ramírez C, Vargas E, Rodríguez T. 1989. Empleo de Bacterias Antagonistas en el Combate de la Enfermedad Ojo de Gallo del Cafeto Causada por *Mycena citricolor* (Berk & Curt) Sacc. Turrialba. 39(3): 329-334.
- Mostacedo B, Fredericksen T. 2000. Manual de Métodos Básicos de Muestreo y Análisis en Ecología Vegetal. Santa Cruz, Bolivia. Editora El País.
- Muller R, Berry D, Avelino J, Bieysse D. 2004. Coffee diseases. En Wintgens, Coffee: growing, processing, sustainable production: a guidebook for growers, processors, traders, and researchers: 491-545.
- MycoBank. 2011. Fungal Databases, Nomenclature and Species Banks. Online Taxonomic Novelties Submission. Mycological Association. Disponible en: www.mycobank.org.
- Peiter C. 2007. Inducao de Fitoalexinas e atividade de Peroxidases em Sorgo e Soja tratados com extractos de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. Tesis. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
- Porras A. 2000. Evaluación de la actividad in vitro del genero *Hypocrea* contra 2 hongos fitopatógenos de importancia agrícola (*Fusarium sp* y *Mycena citricolor*). Costa Rica. Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio).

Bibliografía

PUCE Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 2008. Géneros, especies y localidades de Ascomycetes y Basidiomycetes representados en la colección de hongos del fungario QCA (M). Proyecto: Biodiversidad micológica del Ecuador.

Quiroz V, Ferrera R, Alarcón A, Lara M. 2008. Antagonismo in vitro de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. Revista Mexicana de Micología. 26: 27-34.

Ramaley A. 1997. *Barrina*, a new genus with polysporous asci. Mycological Society of America. Mycologia. 89 (6):962-966.

Ramos R, Gutiérrez J. 2010. Antagonismo de dos Ascomycetos contra *Phytophthora capsici* Leonian, cuasante de la Marchitez del Chile (*Caspicum annuum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología. 28 (2): 75-86.

Rao D, Tewari J. 1987. Production of Oxalic Acid by *Mycena citricolor*, causal agent of the American Leaf Spot of Coffee. Phytopathology. 77 (6):780-785.

Reyes Y, Martínez B, Infante D. 2008. Evaluación de la actividad antagónica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. Rev. Protección Veg. 23 (2): 112-117.

Rivillas C, Castro A. 2011. Ojo de Gallo o Gotera del Cafeto *Omphalia flavida*. Boletín Técnico del Cenicafé No. 47. Espacio Gráfico Comunicaciones S.A. 3.500 ejemplares.

Bibliografía

Salas J. 1971. Studies on the production of the perfect stage of *Mycena citricolor* (Bert & Curt) Sacc. Ph. D. Tesis. Universidad of California, Berkeley. 107 p.

Sandoval I, López M. 2002. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* A-34 hacia *Macrophomina phaseoli* y otros patógenos fúngicos del frijol. Fitosanidad. 4(3-4):69-72.

Sequeira L, Steeves T. 1954. Auxin inactivation and its relation to leaf drop caused by the fungus *Omphalia flavida*. Plant Physiol. 29: 11-16.

Siqueria E, Mizuta, K. y Giglio J. 1997. *Pycnopus sanguineus*: a novel source of (alpha)-amylase. Mycological Research, 101: 119-190.

Smania E, Smania A, Louguercio-Leite C, Gil M. 1998. Cinnabarin synthesis by *Pycnopus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. Revista de Microbiología. 29(4).

Valencia E, Peña J. 2001. El suelo y sus habitantes microbianos: consideraciones ecológicas. Avance y Perspectiva 20: 401-406.

Valenzuela R. 2000. Las Familias Polyporaceae sensu stricto y Albatrellaceae en México. Clave H201. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

Bibliografía

Vargas E. 1984. Interacción del tratamiento biológico y químico en el combate de ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en cafeto. *Agronomía Costarricense*. 8(2): 91-97.

Viecelli C, Stangarlin J, Kuhn O, Schwan-Estrada K. 2009. Indução de resistência em feijoeiro por filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*. *Tropical Plant Pathology*.34: 087-096.

Viecelli C, Stangarlin J, Kuhn O, Schwan-Estrada K. 2010. Indução de resistência em feijoeiro à mancha angular por extratos de micélio de *Pycnoporus sanguineus*. *Summa Phytopathologica*. 36:73-80.

Wafaa M, Abdel-Latif M. 2007. "Biotechnological Aspects of Microorganisms Used in Plant Biological Control", *Am.-Eurasian J Sustain Agric*. 1(1): 7-12.

Wang A, Avelino J. 1999. El ojo de gallo del cafeto *Mycena citricolor*. *Desafíos de la Caficultura en Centroamérica*: 243-260.

Wellman F. 1950. Dissemination of *Omphalia* leaf spot of coffee. *Turrialba* 1: 12-27.

10. ANEXOS

Anexo 1

Mediciones de Largo y Ancho de conidias de *M. citricolor* en los diferentes sitios de muestreo.

Sitios de Muestreo						
#	P1*		P2*		P3*	
	Largo (µm)	Ancho (µm)	Largo (µm)	Ancho (µm)	Largo (µm)	Ancho (µm)
1	6	2	6	1	8	1
2	5	2	5	1	5	1
3	5	1	5	1	5	1
4	6	1	6	1	6	1
5	5	1	7	1	6	1
6	6	1	5	1	7	1
7	5	1	7	2	6	1
8	7	1	6	2	6	1
9	6	1	7	1	5	1
10	7	1	6	1	4	1
11	6	1	5	1	4	1
12	6	1	7	1	5	1
13	4	1	3	1	5	1
14	5	1	5	1	4	1
15	4	2	5	1	5	1
16	4	1	6	1	6	1
17	5	1	5	1	6	1
18	5	1	5	1	4	2
19	5	1	6	1	5	1
20	5	1	5	1	3	1
21	7	2	4	1	4	1
22	6	1	7	1	5	1
23	6	1	5	1	3	1
24	6	1	4	2	4	1

Anexos

25	6	1	6	1	7	2
26	7	1	5	1	5	1
27	5	1	5	1	4	1
28	7	2	4	1	4	1
29	5	1	5	1	6	1
30	6	1	5	1	4	1
31	7	1	6	2	3	1
32	7	1	5	1	4	1
33	6	2	6	2	4	1
34	4	1	5	1	5	1
35	6	1	6	1	4	2
36	5	1	6	1	4	1
37	5	1	4	1	4	1
38	4	1	5	1	4	1
39	5	1	5	1	5	1
40	5	2	4	1	6	1
41	4	1	4	1	7	1
42	5	1	5	1	6	1
43	5	2	5	1	7	1
44	6	1	6	1	7	1
45	4	1	5	3	6	2
46	7	1	4	1	7	1
47	6	1	4	1	6	1
48	6	1	4	1	7	1
49	5	1	6	1	6	1
50	6	1	5	1	6	2

* Sitio 1: Bosque seco pre Montano (bs-PM) Sitio 2: Bosque seco Montano Bajo (bs-MB) y Sitio 3: Bosque muy seco Tropical (bms-T).

Anexo 2

Mediciones de largo del estípite, diámetro de la cabeza y total del cuerpo fructífero de *M. citricolor*.

Sitio*	Estípite (mm)	Cabeza (mm)	Total (mm)	Sitio	Estípite (mm)	Cabeza (mm)	Total (mm)	Sitio	Estípite (mm)	Cabeza (mm)	Total (mm)
P1	1,09	0,17	1,26	P2	1,58	0,29	1,87	P3	1,25	0,16	1,41
P1	0,53	0,09	0,62	P2	0,91	0,20	1,11	P3	1,15	0,18	1,33
P1	1,27	0,19	1,46	P2	0,97	0,17	1,14	P3	1,23	0,14	1,37
P1	1,26	0,27	1,53	P2	1,41	0,21	1,60	P3	1,53	0,17	1,70
P1	0,97	0,15	1,12	P2	1,50	0,23	1,73	P3	1,88	0,20	2,08
P1	1,4	0,27	1,67	P2	1,30	0,21	1,51	P3	0,68	0,17	0,85
P1	1,07	0,25	1,32	P2	1,30	0,23	1,53	P3	1,28	0,17	1,45
P1	0,40	0,19	0,59	P2	1,33	0,28	1,61	P3	0,35	0,15	0,50
P1	0,60	0,19	0,79	P2	1,03	0,22	1,25	P3	0,84	0,13	0,97
P1	0,76	0,24	1	P2	1,53	0,27	1,80	P3	0,24	0,12	0,36
P1	1	0,24	1,24	P2	1,18	0,17	1,35	P3	0,67	0,16	0,83
P1	1,63	0,25	1,88	P2	1,02	0,21	1,23	P3	1,26	0,19	1,45
P1	1,20	0,24	1,44	P2	0,74	0,18	0,92	P3	0,77	0,15	0,92
P1	1,21	0,19	1,39	P2	0,78	0,26	1,04	P3	0,36	0,15	0,51
P1	1,14	0,25	1,39	P2	0,91	0,21	1,12	P3	0,27	0,12	0,39
P1	0,82	0,19	1,01	P2	0,47	0,19	0,66	P3	0,57	0,13	0,70
P1	0,61	0,19	0,80	P2	0,70	0,28	0,98	P3	1,63	0,20	1,83
P1	0,56	0,18	0,74	P2	0,65	0,20	0,85	P3	0,58	0,23	0,81
P1	0,61	0,27	0,88	P2	0,63	0,23	0,86	P3	0,54	0,21	0,75
P1	1,12	0,19	1,31	P2	0,33	0,12	0,45	P3	1,32	0,18	1,5

* Sitio 1: Bosque seco pre Montano (bs-PM) Sitio 2: Bosque seco Montano Bajo (bs-MB) y Sitio 3: Bosque muy seco Tropical (bms-T).

Anexo 3

Radio de crecimiento de los hongos estudiados en el ensayo de antagonismo.

Tratamiento	Radio Crecimiento del <i>M. citricolor</i> (RCP)	Radio Crecimiento del antagonista (RCA)
<i>M. citricolor</i> vs <i>Barrina</i> sp.	3,9	2,5
	3,9	2,1
	3,9	2,9
	3,5	1,7
PROMEDIO	3,8	2,3
<i>M. citricolor</i> vs <i>Schizophyllum commune</i> .	4,5	1,2
	4,5	1,4
	0	0
	4,5	1,4
<i>M.citricolor</i> vs <i>Xylaria feejeensis</i>	4,2	2,2
	4,6	1,8
	4	2,5
	3,2	0
PROMEDIO	4	1,63
<i>M. citricolor</i> vs <i>Pycnoporus sanguineus</i>	3,5	3,4
	2,8	3,9
	3,3	3,4
	3	3,7
PROMEDIO	3,15	3,6
<i>M. citricolor</i> vs <i>Trichoderma harzianum</i>	1,4	4,7
	1,4	4,6
	0,8	4,9
	0,9	4,6
PROMEDIO	1,13	4,7

Anexo 4

Comparaciones múltiples de Tukey en los distintos tratamientos contra *M. citricolor*.

Variable dependiente	(I) Trat.	(J) Trat.	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite Inferior	Límite superior
Radio de Crecimiento del Antagonista	MvsPI	MvsSch	1,30	0,45	0,075	-0,10	2,70
		MvsX	0,67	0,45	0,584	-0,72	2,07
		MvsP	-1,30	0,45	0,075	-2,70	0,10
		MvsT	-2,40(*)	0,45	0,001	-3,80	-1,00
	MvsSch	MvsPI	-1,30	0,45	0,075	-2,70	0,10
		MvsX	-0,62	0,45	0,650	-2,02	0,77
		MvsP	-2,60(*)	0,45	0	-4,00	-1,20
		MvsT	-3,70(*)	0,45	0	-5,10	-2,30
	MvsX	MvsPI	-0,67	0,45	0,584	-2,07	0,72
		MvsSch	0,62	0,45	0,650	-0,77	2,02
		MvsP	-1,97(*)	0,45	0,004	-3,37	-0,57
		MvsT	-3,07(*)	0,45	0	-4,47	-1,67
	MvsP	MvsPI	1,30	0,45	0,075	-0,10	2,70
		MvsSch	2,60(*)	0,45	0	1,20	4,00
		MvsX	1,97(*)	0,45	0,004	0,575	3,37
		MvsT	-1,10	0,45	0,162	-2,50	0,30
	MvsT	MvsPI	2,40(*)	0,45	0,001	1,00	3,80
		MvsSch	3,70(*)	0,45	0	2,30	5,10
		MvsX	3,07(*)	0,45	0	1,675	4,47
		MvsP	1,10	0,45	0,162	-0,30	2,50

* La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Anexo 5

Comparación de Tukey de PICR en los diferentes tratamientos.

	(I) Trat.	(J) Trat.	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD de Tukey	MvsB	MvsSch	10,94	3,80	0,063	-0,437	22,31
		MvsX	5,88	3,80	0,546	- 5,49	17,25
		MvsP	-8,96	3,80	0,169	-20,33	2,41
		MvsT	-58,16(*)	3,80	0,000	-69,53	-46,78
	MvsSch	MvsB	-10,94	3,80	0,063	-22,31	0,43
		MvsX	-5,06	3,80	0,676	-16,43	6,31
		MvsP	-19,90(*)	3,80	0,000	-31,27	- 8,52
		MvsT	-69,10(*)	3,80	0,000	-80,47	-57,72
	MvsX	MvsB	-5,88	3,80	0,546	-17,25	5,49
		MvsSch	5,06	3,80	0,676	- 6,31	16,43
		MvsP	-14,84(*)	3,80	0,007	-26,21	- 3,46
		MvsT	-64,04(*)	3,80	0,000	-75,41	-52,66
	MvsP	MvsB	8,96	3,80	0,169	- 2,41	20,33
		MvsSch	19,90(*)	3,80	0,000	8,52	31,27
		MvsX	14,84(*)	3,80	0,007	3,46	26,21
		MvsT	-49,20(*)	3,80	0,000	-60,57	-37,82
	MvsT	MvsB	58,16(*)	3,80	0,000	46,78	69,53
		MvsSch	69,10(*)	3,80	0,000	57,72	80,47
		MvsX	64,04(*)	3,80	0,000	52,66	75,41
		MvsP	49,20(*)	3,80	0,000	37,82	60,57

* La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.