

Capítulo II. Identificación molecular y caracterización de cepas de hongos hiperparásitos de *Hemileia vastatrix* Berkeley y Broome

Resumen

La roya (*Hemileia vastatrix*) es una de las enfermedades de mayor importancia económica en el cultivo de café, llegando a ocasionar pérdidas en producción de hasta un 50%. Además del control químico convencional de esta enfermedad, existen enemigos naturales que regulan su incidencia y severidad, tal es el caso de hongos micoparásitos. En la presente investigación se estudiaron siete cepas de hongos asociadas al control natural de *H. vastatrix*; cinco de ellas fueron aisladas de la zona cafetalera de Turrialba, Cartago, Costa Rica. También se incluyó una cepa artesanal (INA) y una comercial (C1) para ser utilizadas como control en pruebas de eficacia posteriores. Se realizó una identificación molecular y una caracterización cultural y fisiológica. La secuenciación de las cinco cepas locales de hongos asociadas al control biológico natural (CBN) de *H. vastatrix* mostró una coincidencia del 99% de identidad con el género *Simplicillium* para las cepas provenientes de Aquiares (AQ), Santa Rosa (SR), San Juan Norte (JN) y Jabillos (JV) y del 98% para la cepa EC de CATIE. La cepa artesanal INA coincidió en un 99% con el género *Simplicillium*, mientras que el aislamiento de la cepa comercial C1 fue identificada como *Lecanicillium attenuatum*. En general, las características macroscópicas fueron similares entre las cepas aisladas; la diferencia más notable fue la coloración del medio de cultivo vista por la parte inferior de la caja Petri. Las cepas que tuvieron un cambio de coloración de blanco a marrón tuvieron un menor crecimiento radial.

Se encontraron diferencias estadísticas significativas en cuanto al tamaño y producción de conidios ($p < 0.0001$). Las cepas que registraron los valores más bajos de producción de conidios fueron aquellas que tuvieron conidios de mayor tamaño.

Los resultados obtenidos en la identificación de aislamientos locales de hongos antagonistas son el primer reporte que evidencia al género *Simplicillium* como controlador natural de *H. vastatrix* en Costa Rica.

Palabras clave: Caracterización cultural, caracterización fisiológica, cepas locales, aislamientos.

1. Introducción

Dentro del complejo de enfermedades que atacan al cultivo de café, la roya (*Hemileia vastatrix*) es de las de mayor importancia económica en todas las regiones de producción (Arneson 2000; Avelino *et al.* 2015) ya que puede ocasionar pérdidas superiores al 50% de la cosecha (Haddad *et al.* 2009). El brote más perjudicial de roya en Centroamérica ocurrió en el ciclo 2012 – 2013, donde las pérdidas estimadas fueron superiores a US\$499 millones, razón por la cual varios países consideraron el hecho como una emergencia nacional (Promecafe e IICA 2013).

Las técnicas de control para este patógeno están enfocadas en el uso unilateral de fungicidas convencionales o con aplicaciones de cobre. Los efectos indeseables de estas acciones de manejo

son bien conocidos. Como contraparte, existen enemigos naturales de *H. vastatrix* que regulan su incidencia y severidad; tal es el caso del hongo *Lecanicillium lecanii* (Guharay *et al.* 2001), con el cual se pueden implementar técnicas de manejo sostenibles, y el cual es citado constantemente como controlador biológico de *H. vastatrix* (Monzón 1992; Canjura *et al.* 2002; Vandermeer *et al.* 2009; Rivillas 2015; Pérez 2015). Incluso, al momento de aislar hongos parásitos de roya se llega a asumir que el hongo aislado es *Lecanicillium* (= *Verticillium*), sin pruebas que avalen su identificación, lo cual resulta riesgoso ya que bajo esta asunción se inician trabajos de investigación.

Por lo anterior, la inclusión de nuevos aislamientos de hongos asociados al control natural de plagas o enfermedades requiere una identificación correcta previamente a establecer los experimentos posteriores (Safavi 2010) enfocados a un programa de control biológico. Este aspecto también es considerado fundamental para el control de la calidad en la producción de bioplaguicidas, para lo cual es necesario recurrir a taxónomos especialistas y al uso de marcadores moleculares que es una técnica adecuada para tales fines usada actualmente (Jenkins y Grzywacz 2003). La combinación de técnicas moleculares y la taxonomía basada en características morfológicas es fundamental en la diferenciación de especies y variedades de hongos (Gherbawy y Voigt 2010). Al respecto, James *et al.* (2016), mediante análisis moleculares, encontraron una alta diversidad de hongos en discos de hoja de café infectados con roya. Los autores suponen con base en comparaciones de discos de hoja sin presencia de roya que existen 15 hongos micoparásitos posibles. Desafortunadamente el estudio no culminó con pruebas de efectividad que demostraran si realmente estos hongos poseían algún grado de control sobre *H. vastatrix*. En un estudio reciente realizado en zonas cafetaleras de Veracruz, México, Gómez *et al.* (2017) aislaron y evaluaron hongos micoparásitos sobre pústulas de roya y encontraron niveles superiores de control con un hongo del género *Simplicillium*.

Las principales características morfológicas que se deben observar para nuevos aislamientos son la forma y tamaño y velocidad de germinación de conidios, así como la apariencia (forma, elevación, aspecto de la superficie y color) de la colonia (Diaz y Lecuona 1995; Hajek y Leger 1994). Dichas características, si bien no son útiles para diferenciar aislamientos, pueden estar relacionadas con aspectos fisiológicos y el grado de patogenicidad (Jackson *et al.* 1985), aspecto que debe corroborarse pues puede variar dependiendo de la especie a estudiar; por ejemplo, Diaz y Lecuona (1995) al evaluar características culturales y fisiológicas de cepas de *Beauveria bassiana* Bals. (Vuillemin), no encontraron relación alguna con su patogenicidad contra *Diatraea saccharalis* Fabricius. Caso contrario, estudios realizados con *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sorok por Samuels *et al.* (1989), demostraron que existe correlación entre la velocidad de germinación, crecimiento y producción de conidios con el grado de virulencia para *Nilaparvata lugens* Stal.

El presente estudio tuvo por objetivo hacer una identificación molecular, así como una caracterización cultural y fisiológica de cepas de hongos locales asociadas al control natural de *H. vastatrix*. También, se incluyó una cepa artesanal (INA) y una comercial (C1) usadas para el manejo de roya en cafetales de Costa Rica.

2. Materiales y métodos

2.1. Aislamiento de cepas

Los aislamientos se realizaron durante los meses de octubre y noviembre de 2015. Para ello se colectaron hojas de plantas de café con lesiones de roya en estado avanzado y con presencia de hongos parásitos sobre la misma. El estudio incluyó siete cepas de hongos; cinco fueron aisladas de la zona cafetalera de Turrialba, Cartago, Costa Rica en las localidades de San Juan Norte (SJ), Jabillos (JV), Aquiares (AQ), Santa Rosa (SR) y CATIE (EC). Las parcelas donde se hicieron las colectas se encuentran entre los 600 y 950 msnm. Las dos cepas restantes (INA y OB), a las que únicamente se les hizo la identificación molecular, son recomendadas para combatir la roya en cafetales de Costa Rica. A éstas dos últimas cepas únicamente se hizo la identificación molecular.

Inicialmente se hicieron aislamientos directos haciendo un ligero toque continuo con una aguja entre las pústulas de roya parasitadas y cajas Petri que contenían el medio de cultivo general Papa Dextrosa Agar (PDA). Una vez que hubo crecimiento del hongo, se seleccionaron cultivos puros libres de contaminantes. Después de 10 días de crecimiento, se hicieron aislamientos monospóricos mediante diluciones seriadas. Primero, se hizo una dilución inicial de inóculo en agua destilada estéril más Tween 80 a una concentración de 0.1%; seguido de diluciones hasta 10^{-6} . De las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} se tomó 0.1mL y fueron sembrados en PDA e incubados a 25–28°C. Los medios fueron examinados 24 horas después de la siembra, luego dos veces diarias hasta detectar las primeras colonias. Posteriormente se seleccionaron colonias individuales, las cuales se consideraron provenientes de una sola espora; seguidamente, se re-aislaron en cajas Petri con PDA.

2.2. Identificación molecular

Las cepas monospóricas de los diferentes materiales colectados fueron enviadas al Laboratorio de Biología Molecular de la Corporación Bananera Nacional de Costa Rica (Corbana). Para la secuenciación de las muestras se realizó la extracción del material genético según el protocolo descrito por Kuske *et al.* (1998) con modificaciones hechas por Corbana, seguido de una amplificación de la región ITS del gen 18 S. Los iniciadores utilizados para dicha amplificación fueron ITS1 e ITS4; la corroboración de la amplificación se hizo en un gel al 1% de agarosa. El producto de la amplificación se envió a la empresa Macrogen Inc. para su purificación y secuenciación. Una vez generadas las secuencias se editaron con el programa BioEdit y se compararon en la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information) y su herramienta de Blast, así como en la base de datos de RDP y su herramienta Classifier (Center for Microbial Ecology, Michigan State University).

2.3. Caracterización cultural

2.3.1. Macroscópica

Las características macroscópicas de las cepas evaluadas a nivel de colonias fueron: color, forma, elevación y formación de estrías. Para esto se hicieron observaciones en 10 colonias aisladas en cajas Petri sobre el medio de cultivo PDA, de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 2.1. Las observaciones fueron hechas cuando las cepas tenían 15 días en incubación a 25–28 °C.

2.3.2. Microscópica

Primeramente se determinó el tamaño de muestra para la medición de conidios, lo cual se hizo midiendo diferentes tamaños de muestra y calculando la desviación estándar (DS) en cada uno para observar el número de muestras al cual la DS se estabilizaba (Kranz 1988; Cortez *et al.* 2003). En base a los resultados obtenidos (Figura 1), se hicieron mediciones de conidios en cinco repeticiones (colonias monospóricas de cada cepa). En cada repetición se midieron cuatro grupos de conidios y en cada grupo se observaron 35 conidios. Las mediciones fueron hechas con una cámara OMAX ToupView© x86, montada a un microscopio compuesto y previamente calibrada.

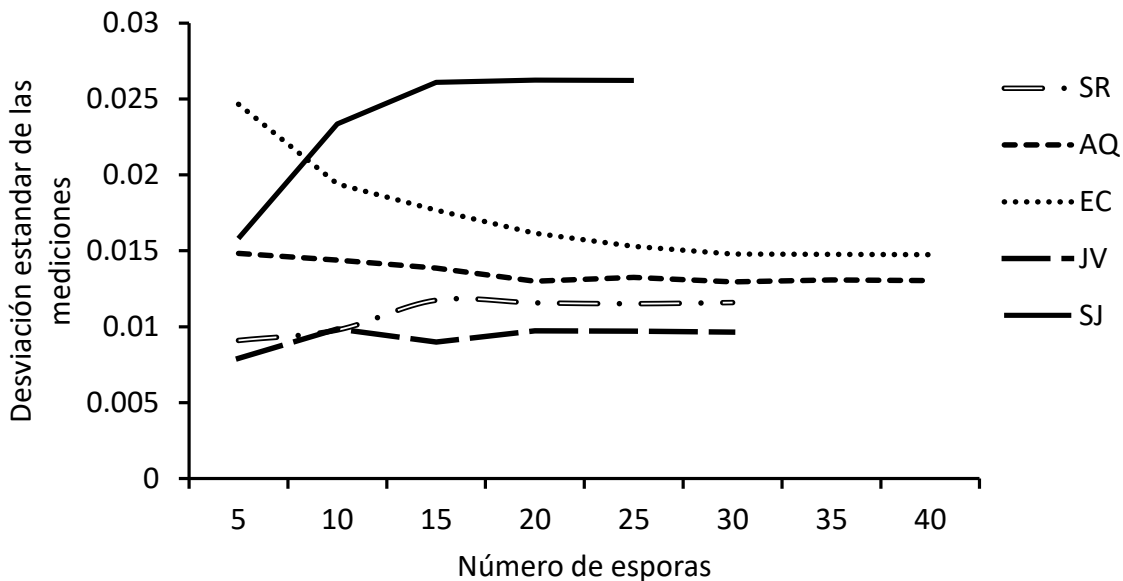


Figura 1. Desviación estándar de diferentes tamaños de muestra para tamaño de conidios de cepas locales de hongos hiperparásitos asociados a *H. vastatrix*

(SR: Cepa proveniente de Santa Rosa, AQ: Aquiares, EC: CATIE, JV: Jabillos, SJ: San Juan Norte)

2.4. Caracterización fisiológica

2.4.1. Crecimiento radial y producción de conidios

Mediante la técnica de diluciones seriadas, cada cepa monospórica fue re-aislada y colocada en el centro de una caja Petri que contenía PDA. Después de 10 días de incubación a 25–28°C y con la ayuda de un vernier digital se promedió el diámetro mayor y menor para obtener el crecimiento radial.

Para estimar la producción de conidios se tomó un cm² de cada cepa monospórica y se diluyó en 10 mL de ADE más Tween 80 al 0.1%. Después se colocó en baño con ultrasonido por tres minutos y luego se agitó en un vortex durante un minuto. Finalmente se hizo el conteo de conidios con la ayuda de una cámara Neubauer. Tanto el crecimiento radial como el conteo de conidios se hicieron para un total de 10 colonias por cepa.

Las cepas INA y C1 no fueron incluidas en la caracterización cultural ni en la fisiológica; únicamente se incluyeron en la identificación molecular con la finalidad de reforzar la identificación taxonómica.

2.5. Análisis estadístico

El experimento se llevó a cabo con un Diseño Completamente al Azar, con 10 repeticiones de una colonia para evaluar el crecimiento radial y cinco para evaluar el tamaño de conidios. El análisis fue hecho mediante Modelos Lineales Generales y Mixtos con el paquete estadístico infostat (Di Rienzo *et al.* 2016).

3. Resultados

3.1. Identificación molecular

La identificación de las cinco cepas locales de hongos asociadas al control biológico natural (CBN) de *H. vastatrix* en la región cafetalera de Turrialba, Cartago, Costa Rica, mostró un 99% de coincidencia con el género *Simplicillium*, a excepción de la cepa EC que mostró un 98% de identidad con este género. La cepa INA coincidió en un 99% con el género *Simplicillium*, mientras que C1 fue identificada como *Lecanicillium attenuatum* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Identificación molecular de cepas locales y comerciales de hongos hiperparásitos asociados a *H. Vastatrix*

Cepa	Organismos coincidentes RDP/UNITE	Confirmación (%)	Organismos coincidentes NCBI	Coincidencia (%)
EC	<i>Simplicillium</i> spp.	95	<i>Simplicillium</i> spp.	98
AQ	<i>Simplicillium</i> spp.	95	<i>Simplicillium</i> spp.	99
SR	<i>Simplicillium</i> spp.	95	<i>Simplicillium</i> spp.	99
SJ	<i>Simplicillium</i> spp.	95	<i>Simplicillium</i> spp.	99
JV	<i>Simplicillium</i> spp.	95	<i>Simplicillium</i> spp.	99
INA	<i>Simplicillium</i> spp.	95	<i>Simplicillium</i> spp.	99
C1	<i>Lecanicillium</i> spp.	95	<i>Lecanicillium attenuatum</i>	99

3.2. Caracterización cultural

3.2.1. Macroscópica

Las diferencias más notables entre las cepas estudiadas se observaron en el cambio de color que se produjo en el medio de cultivo, observado por la parte inferior de la caja Petri. Las cepas JV y SR presentaron color amarillo oliva, mientras que EC, AQ y SJ presentaron colores amarillo, blanco y amarillo pálido, respectivamente. El color blanco del micelio fue una constante para todas las cepas, así como también la forma (circular) y el borde (elevado) no varió entre cepas. Solo AQ presentó abundante formación de estrías en el medio de cultivo durante el crecimiento (Cuadro 4); incluso, estas en ocasiones podían notarse por la parte superior de la colonia (Figura 2).

Cuadro 4. Morfología de cepas de *Simplicillium* spp. aisladas de pústulas de *H. vastatrix*

Cepa	Color arriba/abajo*	Notación Munsell*	Forma	Borde	Relieve	Formación de estrías
EC	Blanco/amarillo	2.5Y 7/8	Circular	Completo	Elevada	Baja
AQ	Blanco/blanco	5Y 8/2	Circular	Completo	Elevada	Abundante
JV	Blanco/amarillo oliva	2.5Y 6/6	Circular	Completo	Elevada	Baja
SR	Blanco/amarillo oliva	2.5Y 6/6	Circular	Completo	Elevada	Baja
SJ	Blanco/amarillo pálido	2.5Y 8/4	Circular	Completo	Elevada	Baja

*La anotación del color de las colonias visto en la parte inferior de la caja Petri fue en base a la escala Munsell (Munsell Color Company 1988).

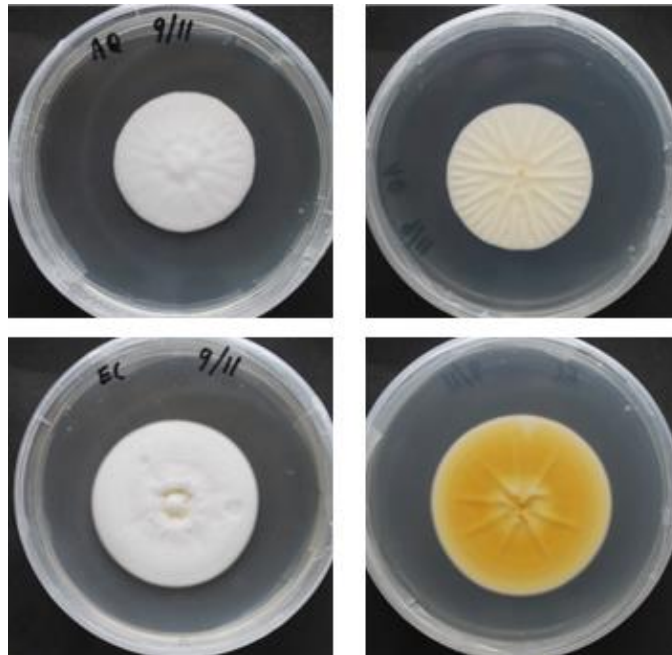


Figura 2. Colonias monospóricas de las cepas AQ (arriba) y EC (abajo), vistas por la parte superior e inferior

3.2.2. Microscópica

3.2.2.1. Tamaño de conidios

Los resultados obtenidos demuestran que existe una diferencia significativa entre cepas ($p < 0.003$) para el tamaño de conidios. Las cepas EC, AQ y JV no difirieron estadísticamente entre sí con tamaños de 1.97, 1.94 y 1.88 μm (DGC = 0.05). Estas cepas registraron valores superiores a las cepas SR (1.75 μm) y SJ (1.73 μm) (Figura 3).

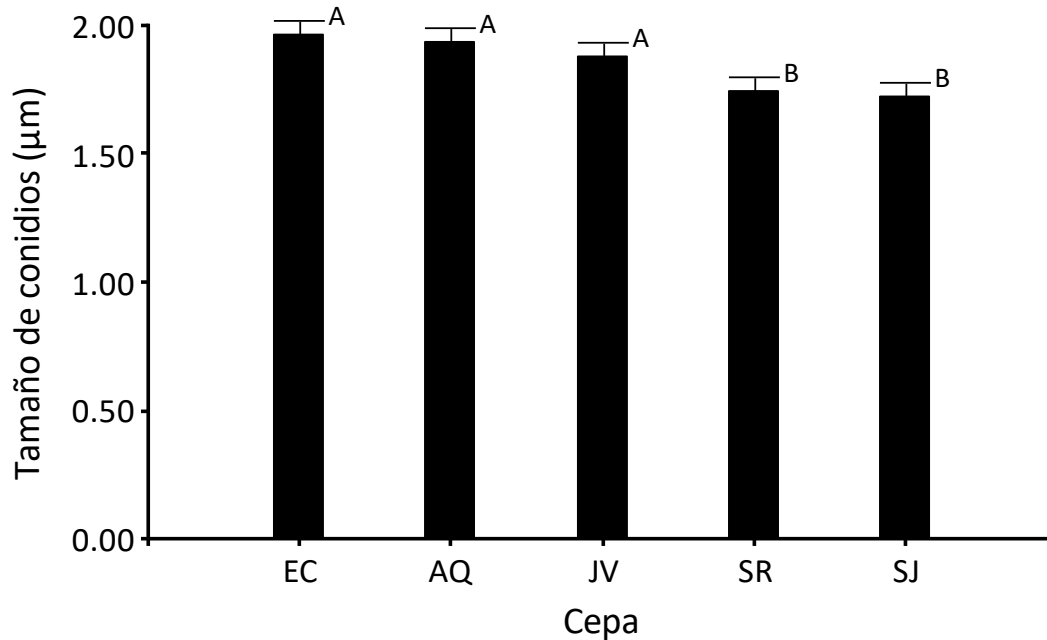


Figura 3. Tamaño de conidios (μm) de cepas locales de *Simplicillium* spp. asociadas al control natural de *H. vastatrix*. Medias con misma letra son estadísticamente iguales (DGC=0.05)

(EC: Cepa proveniente de CATIE; AQ: AQUIARES; JV: Jabillos SR: Santa Rosa; SJ: San Juan Norte)

3.2.2.2. Morfología y disposición de fiálides de *Simplicillium*

La división del género *Verticillium* hecha por Zare y Gams (2001; 2004) basada en estudios sistemáticos, separa los taxones formados por fiálides solitarias del género *Lecanicillium* y los coloca dentro del género denominado *Simplicillium*. Al respecto, las características microscópicas observadas en este estudio, conidios elipsoidales (1.7 a $1.97\mu\text{m}$) contenidas en cabezas globosas suspendidas de fiálides solitarias y en ocasiones postradas (Figura 4), coinciden con lo mencionado por los autores arriba mencionados, quienes también señalan que algunas especies de *Simplicillium* (ej. *lanosoniveum*) se asemejan a *L. lecanii* y *L. muscarium* pero puede ser diferenciada por el tamaño de conidios y la ausencia de fiálides ramificadas en *Simplicillium*. Cortez *et al.* (2003) registraron una variabilidad amplia del tamaño de conidios de diferentes aislamientos de *L. lecanii* ($1.2 - 10.8 \mu\text{m}$). En este estudio la diferencia máxima fue de $0.27 \mu\text{m}$. Por su parte, Gómez *et al.* (2017) registraron tamaño de conidios de 1 a $3 \mu\text{m}$ para una cepa del género *Simplicillium* aislada de pústulas de roya en México.

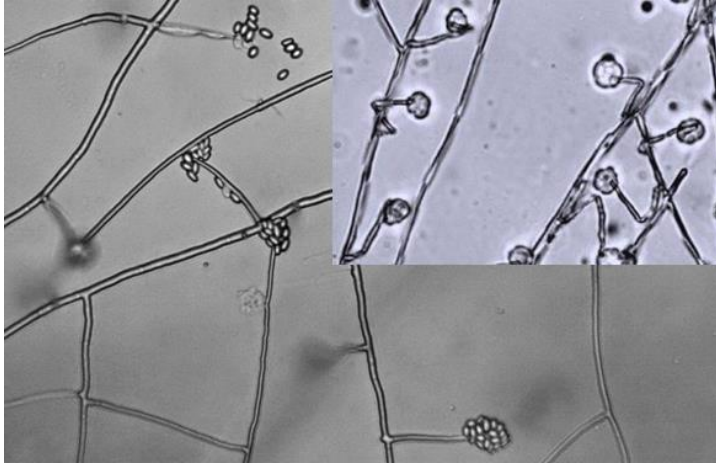


Figura 4. Fiálides solitarias y conidios de *Simplicillium* sp. (cepa EC)

3.3. Caracterización fisiológica

3.3.1. Crecimiento radial

Se registró una diferencia estadísticamente significativa entre cepas en cuanto al crecimiento radial a los cinco y diez días de crecimiento en PDA ($p < 0.0001$). Las cepas que presentaron el mayor crecimiento a los cinco días fueron SJ y EC con 18.9 y 18.39 mm, superiores a SR, AQ y JV con 16.44, 15.67 y 15.65 mm respectivamente, las cuales no difirieron estadísticamente. Después de 10 días de crecimiento, los valores más altos registrados fueron para las cepas SJ (36.1 mm) y EC (33.5 mm), seguidas de AQ (28.8 mm). Las cepas con menor crecimiento fueron SR y JV con 26.8 y 25.7 mm, respectivamente. Lo anterior demuestra una amplia variabilidad dentro de este género (Figura 5).

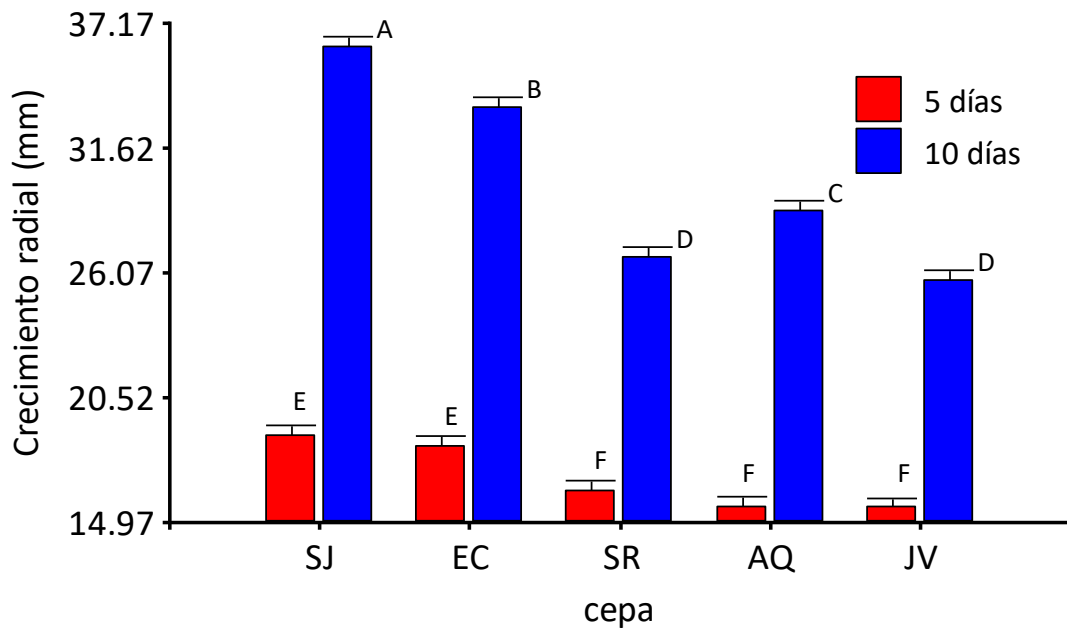


Figura 5. Crecimiento radial (mm) de cepas locales de *Simplicillium* sp. asociadas al control natural de *H. vastatrix*. Medias con la misma letra no difieren estadísticamente (LSD=0.05)

(**SJ**: Cepa proveniente de San Juan Norte; **EC**: CATIE; **SR**: Santa Rosa; **AQ**: Aquíáres; **JV**: Jabillos)

3.3.2. Producción de conidios

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la producción de conidios entre las cepas estudiadas ($p < 0.0001$). Las cepas SJ, JV y SR presentaron una mayor producción de conidios con valores de 1.4×10^7 , 1.3×10^7 y 1.2×10^7 , respectivamente. Las cepas SR y SJ fueron las que registraron un menor tamaño de conidios (1.75 y $1.73 \mu\text{m}$). Por el contrario, las cepas EC y AQ cuyos tamaños de conidios fueron superiores (1.97 y $1.94 \mu\text{m}$), tuvo una producción de conidios significativamente inferior: EC produjo 6.8×10^6 conidios/cm² y AQ registró 4.4×10^6 conidios/cm²; dichos valores no difieren estadísticamente (Figura 6).

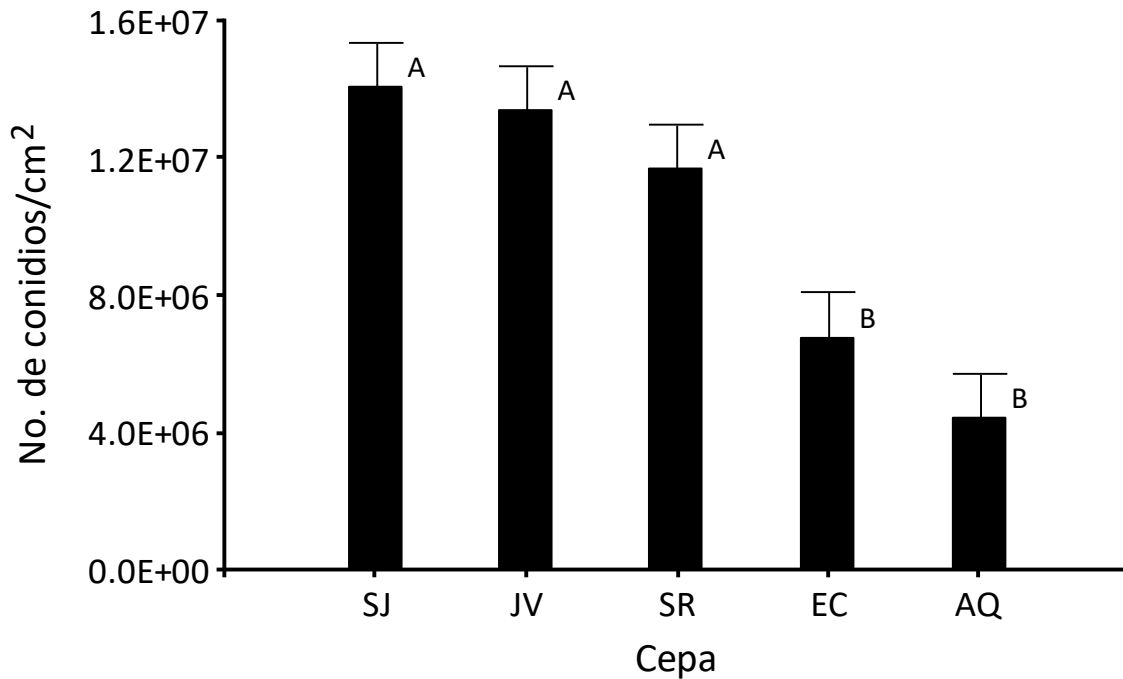


Figura 6. Producción de conidios de cepas locales de *Simplicillium* sp. asociadas al control natural de *H. vastatrix*. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (DGC=0.05)

(**SJ**: Cepa proveniente de San Juan Norte; **JV**: Jabillos; **SR**: Santa Rosa; **EC**: CATIE; **AQ**: Aquíáres)

4. Discusión

Los resultados de este estudio difieren con las publicaciones que involucran el CBN de *H. vastatrix* en Costa Rica, en donde constantemente se menciona al hongo *L. lecanii* como al principal

enemigo natural de la roya del cafeto (Virginio Filho y Astorga 2015; Pico Rosado 2014; Canjura et al. 2002), publicaciones hechas en base a datos obtenidos en la misma región que abarca el presente estudio. Las posibles causas de la determinación incorrecta del controlador natural de *H. vastatrix* puede ser debida a la semejanza en apariencia del hongo al hiperparasitar a la roya, debido a que tanto *Simplicillium* como *Lecanicillium* forman una capa blanca algodonosa. Aunado a lo anterior, estos géneros comparten características morfológicas lo cual conduce frecuentemente a una incorrecta clasificación (Lim et al. 2014).

Los resultados obtenidos son el primer reporte que evidencia al género *Simplicillium* como controlador natural de *H. vastatrix* en Costa Rica. Lo anterior implica que para futuras investigaciones relacionadas al CBN de *H. vastatrix* con el uso de hongos micoparásitos no se debe asumir que los micoparásitos encontrados que crecen sobre *H. vastatrix* son, por defecto, *L. lecanii* como se ha hecho hasta el momento. De igual manera, no es recomendable que el control biológico inducido de *H. vastatrix* sea con base en cepas introducidas del género *Lecanicillium*. Es importante mencionar que la cepa INA proveniente de un centro de capacitación y transferencia de tecnología de Costa Rica es distribuida como *Lecanicillium* cuando en el presente estudio se determinó que pertenece al género *Simplicillium*, por lo que posiblemente este género predomina como controlador natural de *H. vastatrix* en Costa Rica.

En un estudio realizado por James et al. (2016), el cual comprendió el análisis molecular de discos de hoja con pústulas de roya provenientes de México y Puerto Rico, se enlista a *Simplicillium* dentro del complejo de posibles micoparásitos de la roya en Puerto Rico, no así en México. También mencionan que además de la alta diversidad de hongos presentes en una pequeña superficie de hoja (28 mm²), las condiciones propias de cada región propician comunidades diferentes de hongos; por ejemplo, en México no se detectó *Simplicillium* como micoparásito de *H. vastatrix*.

Como contraparte, Gómez et al. (2017) después de aislar y evaluar el efecto del control de diferentes cepas de hongos micoparásitos en pústulas de roya, determinaron que el hongo *Simplicillium* fue el que presentó los mejores niveles de parasitismo. Por lo tanto, la correcta identificación de micoparásitos asociados al CBN de *H. vastatrix* debería ser el punto de partida para futuras investigaciones y referencia a la hora de seleccionar métodos de producción masiva de dichas cepas, que si bien pueden adaptarse a los métodos utilizados para *Lecanicillium*, podrían requerir de ajustes en los procesos de producción como las especies identificadas en este estudio.

La característica cultural con mayor variación entre cepas fue el color de las colonias visto por la parte inferior de la caja Petri. Una explicación para esto podría ser la formación de estructuras de resistencia sumergidas en el medio de cultivo, aspecto visto por Inderbitzin et al. (2011) en especies de *Verticillium*. Las observaciones realizadas de esta característica a los 15 días de crecimiento sugieren que las cepas JV y SR tienden a formar estructuras de resistencia en menor tiempo ya que el cambio de coloración del micelio sumergido presentó un cambio de blanco a amarillo oliva en el periodo de incubación. Observaciones similares fueron hechas por Cortez et al. (2003) en aislamientos de *Lecanicillium* (género relacionado con *Simplicillium*).

La tendencia de cepas que tienden a crear estructuras de resistencia en menor tiempo puede ser la respuesta de un menor crecimiento radial de las mismas, tal y como se observa en los resultados aquí obtenidos, donde las cepas JV y SR presentaron los valores más bajos de crecimiento (Figura 5). También, los cambios de color en el medio de cultivo pueden ser debidos a la capacidad de producción de metabolitos secundarios (VanderMolen *et al.* 2013). Respecto a la capacidad de producción de conidios de *Simplicillium*, la información es muy limitada por lo que las comparaciones de momento deben ser hechas con taxones relacionados como *Verticillium* o *Lecanicillium*.

5. Literatura citada

- Arneson, P. A. 2000. Coffee rust. The Plant Health Instructor. Coffee rust. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0718-02. The American Phytopathological Society.
- Avelino, J; Cristancho M; Gergiou S; Imbach P; Aguilar L; Bornemann G; Laderach P; Anzueto F; Hruska A. J; Carmen M. 2015. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008 – 2013): impacts and plausible causes and proposed solutions. Food Security. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0446-9>. (7 (2):303 – 321.
- Canjura, S. E. M; Sánchez G. V; Krauss U; Somarriba E. 2002. Reproducción masiva de *Verticillium* sp., hiperparásito de la roya del café, *Hemileia vastatrix*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología . (66):13-19.
- Córtex, M. H; Alatorre R. R; Mora A. G; Bravo M. H; Ortiz C. F; Aceves N. L A. 2003. Characterization of multisporic and monosporic isolates of *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* for the management of *Toxoptera aurantii* in cocoa. BioControl 48 (3):312-334.
- Díaz, B.M; E. Lecuona R. 1996. Evaluación de cepas nativas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* Bals. (Vuill.) (Deuteromicotina) como base para la selección de bioinsecticidas contra el barrenador *Diatraea saccharalis* (F.). Agriscientia 12: 33-38.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2016. Córdoba, Argentina, Universidad Nacional de Córdoba. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>
- Gherbawy, Y; Voigt, K. 2010. Molecular Identification of Fungi. Springer. ISBN: 978-3-642-05041-1.
- Gómez, D. C. I; Pérez P. E; Escamilla P. E; Martínez B. M; Carrion V. G. L. L; Hernández L. T. I. 2017. Selección *in vitro* de micoparásitos con potencial de control biológico sobre roya del café (*Hemileia vastatrix*). Revista Mexicana de Fitopatología 36 (1):172 – 183.
- Guharay, F; Monterroso D; Staver C. 2001 El diseño y manejo de la sombra para la supresión de plagas en cafetales de América Central. Agroforestería en las Américas 8(29):22-29.

- Haddad, F; Maffia L. A; Mizubuti E. S. G; Teixeira H. 2009. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. *Biol. Control* 49 (2):114-119.
- Hajek, A.E; Leger R.J. 1994. Interactions between fungal pathogenesis and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39:293–322.
- Inderbitzin, P; Bostock R. M; Davis R. M; Usami T; Platt H. W; Subbarao K. V. 2011. Phylogenetics and Taxonomy of the Fungal Vascular Wilt Pathogen *Verticillium*, with the Descriptions of Five New Species. *PLoS ONE* 6(12): e28341.
- Jackson, C. W; Heale J. B; Hall R.A. 1985. Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. *Ann. Appl. Biol* 106(1):39–48.
- James, T. Y; Marino J. A; Perfecto I; Vandermeer J. 2016. Identification of putative coffee rust mycoparasites via single-molecule DNA sequencing of infected pustules. *Appl. Environ. Microbiol* 82(2):631-639.
- Jenkins, N. E; Grzywacz, D. 2003. Towards the standardization of quality control of fungal and viral biocontrol agents. *In* Van Lenteren J. C (ed.) *Quality Control and Production of Biological Control Agents. Theory and Testing Procedures.* CAB International. P. 247 – 264.
- Kranz, J. 1988. Measuring Plant Disease. *In* Kranz J; Rotem, J (eds.). *Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology.* Springer, Verlag, Berlin. P. 35-50.
- Kuske, C. R; Banton K. L; Adorada D. L; Stark P. C; Gil K. K; Jackson J. P; 1998. Small – scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 64(7): 2463–2472.
- Lim, S. Y; Lee S; Kong H. G; Lee J. 2014. Entomopathogenicity of *Simplicillium lanosoniveum* isolated in Korea. *Mycobiology* 42(4):317:321.
- Monzón, JA. 1992. Distribución de *Verticillium* sp. en tres zonas cafetaleras de Nicaragua y evaluación de dos aislamientos del hongo como agente de control biológico de la roya (*Hemileia vastatrix*) del café (*Coffea arabica* L.). Thesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 66 p.
- Morales, A. 2008. A simple way to preserve fungal cultures. Cornell University. Disponible en <https://blog.mycology.cornell.edu/2008/01/10/a-simple-way-to-preserve-fungal-cultures/>
- Munsell Color Company. 1988. *Munsell Soil Color Charts.* Baltimore, Maryland, USA.
- Pérez, V. L. 2015. La roya del café (*Hemileia Vastatrix*) en Cuba: Evolución al manejo alternativo de la enfermedad. *In* Memorias del Seminario Científico Internacional “Manejo Agroecológico de la Roya del Café”. Panamá, Panamá. FAO. P. 17-19.
- Pico Rosado, J. T. 2014. Efecto de la sombra del café y el manejo sobre la incidencia, severidad, cantidad de inóculo y dispersión de *Hemileia vastatrix* en Turrialba, Costa Rica. Thesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 65 p.

- Promecafé (Programa Cooperativo Regional para el Desarrollo Tecnológico y la Modernización de la Caficultura); IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). 2013. La crisis del café en Mesoamérica, causas y respuestas apropiadas. Boletín Promecafé no. 135:10-15.
- Rivillas, O. C. A. 2015. Acciones emprendidas por Colombia en el manejo de la roya del cafeto. *In* Memorias del Seminario Científico Internacional “Manejo Agroecológico de la Roya del Café”. FAO. Cd. de Panamá. P. 11-16.
- Safavi, S. A. 2010. Isolation, identification and pathogenicity assessment of a new isolate of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in Iran. *J. of plant protection* 50(2):158-162.
- Samuels, K.D.Z; Heale J. B; Llewellyn M. 1989. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliaea* toward *Nilaparvata lugens*. *J. Invertebr. Pathol* 53(1):25-31.
- VanderMolen, M. K; Raja A. H; El-Elimat T; Oberlies H. N. 2013. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening programs. *AMB Express* 3:71.
- Vandermeer, J; Perfecto I; Liere H. 2009. Evidence for hyperparasitism of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) by entomogenous fungus, *Lecanicillium lecanii*, through a complex ecological web. *Plant Pathol.* (58): 636 – 641.
- Virginio Filho, E de M. y Astorga. 2015. Prevención y control de la roya del café. Manual de buenas prácticas para técnicos y facilitadores. Turrialba, Costa Rica, CATIE. (Serie técnica. Manual técnico no. 131).
- Zare, R; Gams W. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. *Nova Hedwigia* 73:1-50.
- Zare, R; Gams W. 2004. A monograph of *Verticillium* section *Prostrata*. *Rostaniha* 3, Supplement: 1-188.