

ACADEMIA JOURNALS



OPUS PRO SCIENTIA ET STUDIUM

Humanidades, Ciencia, Tecnología e Innovación en Puebla

ISSN 2644-0903 online

Vol. 5. No. 1, 2023

www.academiajournals.com

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN AUSPICIADO POR EL
CONVENIO CONCYTEP-ACADEMIA JOURNALS



Gobierno de Puebla

Hacer historia. Hacer futuro.



Secretaría
de Educación
Gobierno de Puebla

CONCYTEP
Consejo de Ciencia
y Tecnología del Estado
de Puebla

Leticia Reyes Márquez

Identificación de *Mycena citricolor* en Hospedantes Alternos en la Sierra Norte de Puebla, México

Universidad Autónoma Chapingo

Presidente: Dra. María de Jesús Yáñez Morales

Secretario: Dr. Roney Solano Vidal

Vocal: Dr. Eduardo Valdez Velarde

Suplente: Dr. Gustavo Almaguer Vargas

Suplente: Dr. Juan Ayala Arreola



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**IDENTIFICACIÓN DE *Mycena citricolor* EN HOSPEDANTES
ALTERNOS EN LA SIERRA NORTE DE PUEBLA, MÉXICO**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO ESPECIALISTA EN FITOTECNIA

Presenta:

Leticia Reyes Márquez

BAJO LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ ASESOR:

Presidente: Dra. María de Jesús Yáñez Morales

Secretario: Dr. Roney Solano Vidal

Vocal: Dr. Eduardo Valdez Velarde

Suplente: Dr. Gustavo Almaguer Vargas

Suplente: Dr. Juan Ayala Arreola

Chapingo, Texcoco, Estado de México, 29 de noviembre de 2016



Identificación de *Mycena citricolor* en hospedantes alternos en la Sierra Norte de Puebla, México

Resumen

Los objetivos planteados en el presente trabajo fueron: Identificar la presencia de *M. citricolor* en una especie vegetal cultivada y otra silvestre de la Sierra Norte del estado de Puebla, por la utilización de claves taxonómicas y el uso de técnicas de biología molecular, para aportar información sobre hospedantes alternos que pudieran influir en el proceso de diseminación de la enfermedad y proponer estrategias de manejo con base a los conocimientos agronómicos y fitosanitarios por revisión de literatura, con la finalidad de dar un enfoque holístico al problema. Se hicieron tres colectas durante el periodo primavera-verano del año 2016 en la Sierra Norte del estado de Puebla, con la finalidad de coleccionar hojas de café, gardenia y un árbol silvestre.

De los síntomas coleccionados se realizaron aislamientos para obtener cepas del hongo de interés, de estos se escogieron las cepas representativas y se mandaron a secuenciar para realizar la identificación molecular, asimismo se realizó una identificación morfológica del hongo para corroborar la especie. Se realizaron pruebas de patogenicidad para corroborar el agente causal.

Se obtuvieron 15 aislamientos, dos de los cuales corresponden a café, los demás a gardenia. Morfológicamente los aislamientos obtenidos corresponden a *M. citricolor*. Molecularmente los aislamientos de café y gardenia coinciden, por lo que gardenia es un hospedante alternativo de *M. citricolor*, obteniendo así las primeras secuencias de esta especie. El hongo aislado de síntomas de café y gardenia resultó patogénico en plantas de café y gardenia.

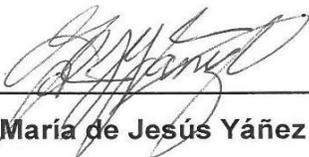
Palabras clave adicionales: ojo de gallo, *G. jasminoides*, manejo, SNPs

Autor: Leticia Reyes Márquez

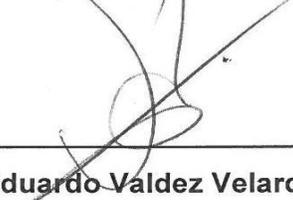
Directora de Tesis: Dra. María de Jesús Yañez Morales

La presente tesis, titulada: **Identificación de *Mycena citricolor* en hospedantes alternos en la Sierra Norte de Puebla, México**, realizada por la alumna: **Leticia Reyes Márquez**, bajo la dirección del Jurado Examinador Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

INGENIERO AGRÓNOMO ESPECIALISTA EN FITOTECNIA

Presidente: 
Dra. María de Jesús Yáñez Morales

Secretario: 
Dr. Roney Solano Vidal

Vocal: 
Dr. Eduardo Valdez Velarde

Suplente: 
Dr. Juan Ayala Arreola

Suplente: 
Dr. Gustavo Almaguer Vargas

Chapingo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2016

DEDICATORIA

A mis padres, que son mi ejemplo de lucha en esta vida; su amor, dedicación, apoyo y confianza son el pilar que me sostiene. Porque este logro también es esfuerzo de ustedes; sinceramente las palabras no alcanzan para poder expresar lo que siento, los amo.

A mis hermanos, Estefanía, Efraín y Noé quienes, aunque desde lejos, siempre están conmigo cuando los necesito y porque cuando estamos juntos sucede lo mejor. Nunca los olvido.

A Aurora, que no has dudado en apoyarme cuando lo necesito, y, aunque no de sangre, eres una hermana para nosotros, además de ser una gran amiga para mí con quien crecí y compartí los mejores momentos.

A mis abuelos, porque, aunque a su manera me han dado cariño y apoyo. Gracias.

A mis amigos, quienes hicieron darme cuenta que la familia no solo está construida a base de lazos de sangre y que la vida se hace más amena con su compañía.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de vivir este momento y culminar una etapa más de esta fugaz vida.

A la Universidad Autónoma Chapingo, por darme la oportunidad de realizar y culminar mis estudios de licenciatura formándome profesional y personalmente.

Al pueblo mexicano, que con sus impuestos permiten aun el acceso a la educación.

Al Colegio de Posgraduados, por otorgar las facilidades para realizar este trabajo de investigación.

Al comité asesor de este trabajo, quienes con sus sabios consejos y correcciones me ayudaron a culminar esta etapa.

A la Dra. María de Jesús Yáñez Morales, por compartir sus conocimientos contribuyendo a mi formación, por su gran paciencia, y excelente dirección de este trabajo.

Al Dr. Roney Solano Vidal, por sus sabios consejos, apoyo y palabras de aliento para la culminación de este trabajo.

Al Dr. Eduardo Valdez Velarde por sus excelentes consejos para la redacción final de este trabajo y apoyo total en este proceso.

A Gaby y Luisa por el apoyo, consejos y amistad brindada durante la estancia en el Colegio de Posgraduados.

A mis compañeros que conocí en mi estancia dentro de la UACH, por todas las experiencias impartidas.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS.....	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. HIPÓTESIS.....	4
3. OBJETIVO.....	4
4. ANTECEDENTES	4
4.1. Clasificación taxonómica de la planta de café.....	4
4.2. Clasificación taxonomía de la planta de gardenia	5
4.3. Importancia del cultivo del café.....	5
4.3.1. Mundial	5
4.3.2. México	6
4.4. Enfermedades en el cultivo de café.....	7
4.5. <i>Mycena citricolor</i> (Berk. & M.A. Curtis) Sacc.	8
4.5.1. Nombre común	8
4.5.3. Sinonimia	9
4.5.4. Distribución geográfica.....	10
4.5.5. Hospedantes alternos.	10
4.5.6. Importancia económica.....	11
4.5.7. Síntomas.	11
4.5.8. Morfología	13
4.5.9. Epidemiología.	16
4.5.10. Bioluminiscencia de <i>M. citricolor</i>	17
4.5.11. Crecimiento de <i>M. citricolor</i> en medio de cultivo artificial	19
4.5.12. Manejo de la enfermedad.....	20
4.6. Importancia de los hospedantes alternos.....	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS	22

5.1.	Localización	22
5.2.	Colectas de material vegetal	22
5.3.	Identificación de especies colectadas.....	23
5.4.	Trabajo de laboratorio	23
5.4.1.	Descripción de síntomas: manchas foliares	23
5.4.2.	Búsqueda de signos:.....	24
5.4.3.	Proceso de las muestras:	24
5.4.4.	Aislamiento de las manchas en medio de cultivo agar:	24
5.4.5.	Aislamiento de los signos en medio de cultivo agar.	27
5.4.6.	Identificación de la especie.....	27
5.4.7.	Observación de la luminiscencia del hongo.....	28
5.5.	Pruebas de patogenicidad.....	28
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
6.1.	Descripción de síntomas: manchas foliares.....	30
6.2.	Aislamientos obtenidos.....	34
6.3.	Caracterización morfológica	35
6.3.1.	Características de la colonia.....	36
6.3.2.	Características de estructuras asexuales.....	39
6.3.3.	Características de estructuras sexuales (basidiocarpos)	44
6.4.	Identificación molecular	45
6.5.	Bioluminiscencia del hongo.....	47
6.6.	Pruebas de patogenicidad.....	48
7.	CONCLUSIONES	50
8.	LITERATURA CITADA.....	52
	ANEXO 1. PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO PDA CON PAPA NATURAL ...	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de los 5 principales países productores de café verde. Promedio 1993 – 2014.	8
Figura 2. Distribución geográfica de <i>Mycena citricolor</i>	11
Figura 3. Estructuras asexuales en manchas causadas por <i>M. citricolor</i>	13
Figura 4. Fases de desarrollo de <i>M. citricolor</i> (Buller, 1934)	15
Figura 5. Propágulo de <i>Mycena citricolor</i> (Buller, 1934).....	16
Figura 6. Bioluminiscencia en hongos (Oliveira <i>et al.</i> , 2013).	19
Figura 7. Especies luminiscentes de <i>Mycena</i> (Desjardin <i>et al.</i> 2007)	20
Figura 8. Síntomas sospechosos de <i>M. citricolor</i> . (A1-A3) Síntomas en hojas de café. (B1-B3) Síntomas en hojas de gardenia. (C1-C3) Manchas en hojas de níspero. (D1-D3) Síntomas en hojas de árbol.	34
Figura 9. Fíbulas presentes en micelio de <i>M. citricolor</i> creciendo sobre medio de cultivo PDA, barra=5 µm.	39
Figura 10. Crecimiento micelial a los 20 días: (A) Comparación entre los tratamientos 628, 632, 630 y 635, (B) Tratamiento 635, (C) Tratamiento 632, (D) Tratamiento 630, (E) Tratamiento 628. Crecimiento micelial a los 30 días (F) Tratamiento 635, (G) Tratamiento 632, (H) Tratamiento 630, (I) Tratamiento 628.	40
Figura 11. Estructuras asexuales en crecimiento <i>in vitro</i> sobre medio de cultivo PDA a los 20 días. (A) Tratamiento 635. (B) Tratamiento 632 (Solo micelio en agregaciones de hifas flojas). (C) Tratamiento 630. (D) Tratamiento 628 (Primordios de estructuras asexuales). (E-F) Estructura asexual madura, barra=500 µm. (G) Estructura asexual no madura proveniente de mancha, barra=40 µm. (H-I) Vista de hifas infectivas en periferia del propágulo en posición superficial apical, barra=50 µm.	44
Figura 12. Estructura sexual correspondiente a un basidiocarpo (pileo cerrado) de color amarillo claro a blanco al madurar, todavía inmaduro, observado sobre una mancha sembrada en medio de cultivo PDA.	45
Figura 13. (A) Bioluminiscencia de <i>M. citricolor</i> en medio de cultivo PDA. (B) Bioluminiscencia de <i>M. citricolor</i> y aislamientos de níspero, las tres primeras cajas de izquierda a derecha corresponden a <i>M. citricolor</i> , las demás a níspero. (C-D) Bioluminiscencia de aislamientos de <i>M. citricolor</i> en medio de cultivo PA comparado con un aislamiento testigo, de izquierda a derecha la primer caja señalada con una flecha corresponde al tratamiento testigo.	49
Figura 14. (A-C) Manchas en hojas con herida de <i>G. jasminoides</i> a los 22 días después de la primera inoculación. (D) Hoja de <i>G. jasminoides</i> inoculada sin herida a los 22 días después de la primera inoculación. (E-F) Manchas en hoja de gardenia a los 38 días después de la segunda inoculación. (G-H) Manchas en hojas con herida de <i>C. arabica</i> a los 38 días después de la inoculación.	51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Aislamientos obtenidos de las colectas realizadas el 14 de mayo de 2016 en la Sierra Norte del estado de Puebla.....	35
Cuadro 2. Agrupación de aislamientos obtenidos de <i>M. citricolor</i>	36
Cuadro 3. Medida de las estructuras asexuales de <i>M. citricolor</i> maduras y no maduras.	43
Cuadro 4. Datos de secuencias analizadas con DNASTAR (2001) versión 3.0 y comparadas en el BLAST del GenBank NCBI.	56

1. INTRODUCCIÓN

Para el año 2015 la producción mundial de los países exportadores de café fue de 144 752 miles de quintales (ICO, 2016b).

La cafecultura es una actividad de gran importancia económica, social, cultural y ambiental en México. Entre los beneficios más relevantes del cafeto están la generación de divisas y empleos, el desarrollo de diversas zonas productoras distribuidas en la región centro sur de México, y los servicios ambientales asociados al cultivo que es bajo sombra (ZamarripaColmenero y Escamilla-Prado, 2002).

En México el cultivo de café se ubica en sexto lugar en cuanto a superficie sembrada, según datos del 2014, con 737,376.45 ha. Aunque el cafeto se cultiva en quince estados de México, el 91.4% de la producción nacional se obtiene solo de cuatro entidades: Chiapas, Veracruz, Puebla y Oaxaca (SIAP, 2016).

En México, y a nivel internacional, *Coffea arabica* y *Coffea canephora* son las de mayor importancia. *C. arabica* es la de mayor importancia en extensión cultivada, aporta el 99% de la producción y, *C. canephora* se produce principalmente en regiones de clima cálido como Chiapas, Oaxaca y Veracruz (Escamilla, 1993).

En México la producción de café arábigo se obtiene de las variedades comerciales: Bourbon, Catuaí, Caturra Rojo, Garnica, Maragogipe, Mundo Novo, Pluma Hidalgo y Típica (Zamarripa *et al.*, 2002).

La producción de café se ve afectada en gran medida por las enfermedades, puesto que constituyen uno de los factores que reducen la producción cafetalera y su intensidad está en función de las condiciones ecológicas en que se localizan las plantaciones. Los patógenos más importantes por su frecuencia y abundancia son los hongos y nemátodos (Regalado y Villanueva, 1990).

Algunas enfermedades causadas por hongos presentes en el cultivo del cafeto son: ojo de gallo (*Mycena citricolor*), requemo (*Phoma costarricensis*), mal de hilachas (*Corticium koleroga*), mal rosado (*Corticium salmonicolor*), nematodos (*Meloidogyne* spp.), mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*), antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*) y otros (Kranz *et al.*, 1977).

El ojo de gallo del cafeto fue descubierto en Colombia por Michelsen en 1980 (Ernst, 1880; citado por Wang y Avelino, 1999). Luego de estos primeros informes, la enfermedad fue encontrada en todas las áreas cafetaleras del Continente Americano (Wang y Avelino, 1999).

Toda planta de café severamente atacada por el ojo de gallo, sufre trastornos fisiológicos de suma consideración. En varios países de Centro América se han estimado pérdidas entre 20% y 30% (Waller *et al.*, 2007).

En México el ojo de gallo se considera una enfermedad de importancia económica. Desde febrero de 2014, se encuentra bajo monitoreo dentro del Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria en los estados de Chiapas, Veracruz y Puebla, a través de la implementación de parcelas fijas y móviles para la detección oportuna de síntomas o daños (SENASICA, 2014). Este patógeno posee un amplio rango de hospedantes, sin embargo, se considera que el cafeto es la única especie de importancia comercial (Wang y Avelino, 1999).

En la zona cafetalera de la Sierra Norte de Puebla hay un desconocimiento de las especies vegetales, ya sea cultivadas o silvestres, que pudieran ser hospedantes de *M. citricolor*. La importancia del conocimiento de los hospederos reside en que se pueden aplicar estrategias de control dirigidas a estos de tal manera que se evite la diseminación hacia la especie de interés económico.

Observaciones de campo indican que el hongo *M. citricolor* está ampliamente distribuido en las zonas cafetaleras de la zona norte de Puebla. Los síntomas característicos de esta enfermedad en café también se han encontrado en dos especies vegetales, una cultivada y otra silvestre, en los municipios de Tenango de las Flores y Tlaxcalantongo, pertenecientes al estado de Puebla respectivamente. Estudios preliminares de laboratorio han permitido obtener el crecimiento de un hongo en estas dos especies mencionadas anteriormente mediante el

procedimiento de cámara húmeda, muy similares a *Mycena* en café. Es importante profundizar en la identificación morfológica y molecular del crecimiento obtenido para verificar si es el mismo hongo que ataca al cultivo del café ya que no existe registro de estudios de hospedantes alternos en esta y otras regiones de México.

2. HIPÓTESIS

Los síntomas presentados en las especies a trabajar son causados por la especie *Mycena citricolor*, agente causal del ojo de gallo en café, por lo que estas especies son hospedantes alternos.

3. OBJETIVO

Identificar la presencia de *Mycena citricolor* en cafeto, gardenia y otra planta silvestre de la Sierra Norte del estado de Puebla, por la utilización de claves taxonómicas y el uso de técnicas de biología molecular, para aportar información sobre hospedantes alternos que pudieran influir en el proceso de diseminación de la enfermedad causada por esta especie.

4. ANTECEDENTES

4.1. Clasificación taxonómica de la planta de café

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Rubiales

Familia: Rubiaceae

Género: Coffea L.

Especie: Coffea arabica L.

(USDA/NCRS, 2015a)

4.2. Clasificación taxonomía de la planta de gardenia

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Rubiales

Familia: Rubiaceae

Género: Gardenia Ellis

Especie: Gardenia jasminoides Ellis

(USDA/NCRS, 2015b)

4.3. Importancia del cultivo del café.

4.3.1. Mundial

El grano del cultivo de cafeto es usado para preparar bebidas y es un producto de exportación importante en muchos países de África, América Latina y Asia. Además de que proporciona un medio de vida para más de 120 millones de personas en todo el mundo (Osorio, 2002).

La especie *Coffea arabica* L., aporta aproximadamente el 63% de la producción mundial total de grano de café, el resto de la producción es por *Coffea. canephora* Pierre ex Froehner (sin. *C. robusta*) (Gichuru *et al.*, 2008).

El cultivo, procesamiento, comercio, transporte y comercialización del café proporciona empleo a millones de personas en todo el mundo. El café tiene una importancia crucial para la economía y la política de muchos países en desarrollo. Para muchos de los países menos adelantados del mundo, las exportaciones de café representan una parte sustancial de sus ingresos en divisas, en algunos casos más del 80%. El café es un producto básico que se

comercia en los principales mercados de materias primas y de futuros, muy en especial en Londres y en Nueva York (ICO, 2016a).

La ICO (2016b) reporta que para el año 2015 la producción mundial de los países exportadores de café fue de 14 475 200 toneladas métricas creciendo esta cifra en 1.6% en relación con el año 2014.

Cabe mencionar que los últimos datos generados por la FAOSTAT (2016), indican que el café verde ocupa el cuarto lugar de importancia, a nivel de valor, respecto a los principales productos importados en el 2013, con 7 991 578.00 miles de dólares, siendo la Unión Europea a quien se le atribuye este valor en la importación de este producto. Asimismo, en el año 2013, en valor de producción, el café verde ocupó el lugar número 50 en cuanto al rubro de producción de productos alimentarios y agrícolas a nivel mundial.

4.3.2. México

El cafeto llegó a México a finales del siglo XVIII, se expandió y desarrolló durante el siglo XIX como cultivo de plantación. La cafecultura es una actividad de gran importancia económica, social, cultural y ambiental en México. Entre los beneficios más relevantes del cafeto están la generación de divisas y empleos, el desarrollo de diversas zonas productoras distribuidas en la región centro sur de México, y los servicios ambientales asociados al cultivo que es bajo sombra (Zamarripa-Colmenaro y Escamilla-Prado, 2002)

A nivel mundial México se posiciona en el quinto lugar en cuanto a producción, esto según datos de la FAOSTAT (2016), con un promedio de 295790.5238 t anuales desde el año 1993 hasta el 2014, siendo superado en orden ascendente por Indonesia, Colombia, Vietnam y Brasil (Ver gráfica 1). Tomando en cuenta la cantidad, este producto se ubica en el lugar número 30 de los principales alimentos exportados de México al mundo, pero en el lugar número 13 en cuanto al valor generado de las exportaciones con 466 247 miles de dólares en el año 2013.

Los últimos datos del SIAP (2016) muestran que en México durante el año 2014 se sembraron 737,376.45 ha de café, ubicándose como el sexto cultivo con mayor superficie cultivada y

generando un valor total de producción de 5, 593,948.47 de pesos, y que representa el 1.34% del total del valor de la producción agrícola nacional.

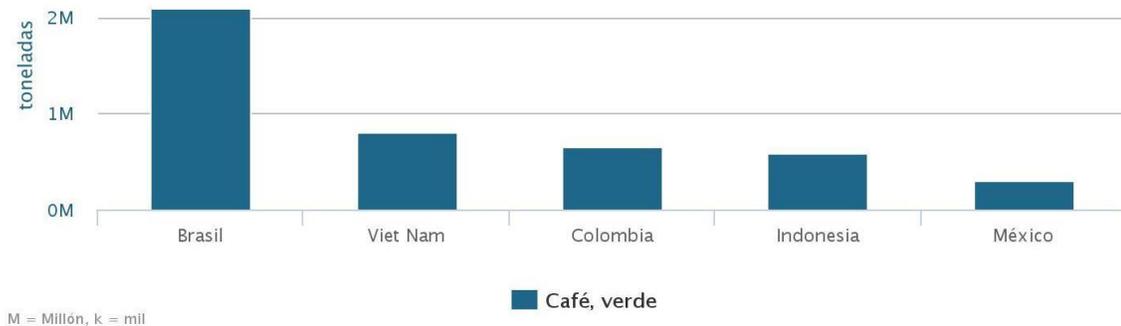


Figura 1. Producción de los 5 principales países productores de café verde. Promedio 1993 – 2014.

4.4. Enfermedades en el cultivo de café

La producción de café se ve afectada en gran medida por las enfermedades, puesto que constituyen uno de los factores que reducen la producción cafetalera y su intensidad está en función de las condiciones ecológicas en que se localizan las plantaciones. Los patógenos más importantes por su frecuencia y abundancia son los hongos y nemátodos (Regalado y Villanueva, 1990).

Algunas enfermedades causadas por hongos presentes en el cultivo del cafeto son: ojo de gallo (*Mycena citricolor*), requemo (*Phoma costarricensis*), mal de hilachas (*Corticium koleroga*), mal rosado (*Corticium salmonicolor*), nemátodos (*Meloidogyne* spp.), mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*), antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*) y otros (Kranz *et al.*, 1977).

En México se prevé, según un estudio hecho por Granados *et al.* (2014) sobre la variación climática, que las condiciones húmedas escenificadas a futuro propiciarán la aparición de plagas, hongos y enfermedades en las regiones cafetaleras del golfo de México.

El ojo de gallo del cafeto fue descubierto en Colombia por Michelsen en 1880 (Ernst, 1880; citado por Wang y Avelino, 1999). Luego de estos primeros informes, la enfermedad fue encontrada en todas las áreas cafetaleras del Continente Americano (Wang y Avelino, 1999).

Toda planta de café severamente atacada por el ojo de gallo, sufre trastornos fisiológicos de suma consideración. En varios países de Centro América se han estimado pérdidas entre 20 y 30% (Waller *et al.*, 2007).

En México el ojo de gallo se considera una enfermedad de importancia económica. Desde febrero de 2014, se encuentra bajo monitoreo dentro del Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria en los estados de Chiapas, Veracruz y Puebla, a través de la implementación de parcelas fijas y móviles para la detección oportuna de síntomas o daños (SENASICA, 2014). Este patógeno posee un amplio rango de hospedantes, sin embargo, se considera que el cafeto es la única especie de importancia comercial (Wang y Avelino, 1999).

4.5. *Mycena citricolor* (Berk. & M.A. Curtis) Sacc.

El género *Mycena* se caracteriza porque las especies son pequeñas a medianas, a veces frágiles, principalmente con el pileo o capa en forma de campana a cónica. En especies jóvenes el margen del pileo se encuentra usualmente presionado contra el tallo que es muy delgado y frágil (McKnight y McKnight, 1987).

Alexander Smith's (1947) citado por Miller (1984) sobre las especies de *Mycena* en Norte América, incluye más de 230 especies, y no hay duda de que pueden encontrarse más especies en este continente. Las especies de *Mycena* crecen de manera individual o en masas espesas sobre la madera o en grupos sobre acículas, hojas, y humus (Miller, 1984).

Algunos representantes de este género sobresalen por ser atractivos, tal es el caso de *M. pura* que como menciona Miller (1984), los atractivos y variables colores de este pequeño hongo son muy distintivos.

M. citricolor atrae la atención en primer lugar por el hecho de que, bajo condiciones climáticas muy húmedas, éste causa una seria enfermedad en las hojas de la planta de café (Buller, 1934).

4.5.1. Nombre común

Según CABI (2016) los nombres comunes son los siguientes:

1. Inglés americano: coffee leaf disease, American coffee leaf spot, cock's eye spot, eye spot coffee, iron spot of coffee, leaf spot coffee.
2. Español: mancha americana de la hoja del cafeto, mancha americana del cafeto, ojo de gallo, ojo de gallo del cafeto.
3. Francés: feuilles noires du cafeier, maladie americaine du cafeier, maladie des feuilles noires du cafeier, stilbose du caféier, taches foliaires américaines.
4. Alemán: Amerikanische Kaffee Blattkrankheiten, Schwarzblaettrigkeit Kaffee 5. Código EPPO: MYCECI (*Mycena citricolor*)

4.5.2. Taxonomía

En el pasado, el estado asexual desarrollado de la especie fue clasificado en el género *Stilbum* o *Stilbella*. Sin embargo, estos nombres no eran adecuados, porque *Stilbum* spp. son hongos sexuales con basidios pertenecientes a los Agaricostibales (Basidiomycota) y *Stilbella* spp. son estados asexuales de los Hypocreales (Ascomycota) (Piepenbring, 2015). De acuerdo al MYCOBANK (2016), la taxonomía de la especie es la siguiente:

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota,

Subphylum: Agaricomycotina,

Clase: Agaricomycetes,

Subclase: Agaricomycetidae,

Orden: Agaricales,

Familia: Mycenaceae,

Género: *Mycena*.

Especie: *Mycena citricolor*

4.5.3. Sinonimia

La sinonimia es: *Agaricus citricolor* Berk. & M. A. Curtis 1868, *Decapitatus flavidus* (Cooke) Redhead & Seifert, *Pistillaria flavida* (Cooke) Speg. 1896, *Stilbum flavidum* Cooke 1880,

Stilbella flavidum (Cooke) Henn. 1904, *Sphaerostilbe flavida* Masee 1909, *Omphalopsis citricolor* (Berk. & M. A. Curtis) Murril 1916, *Mycena tricolor* Velen. 1920, *Omphalia flavida* (Maublanc & Rangel) Singer 1951 (Farr and Rossman., 2016).

4.5.4. Distribución geográfica.

En 1915 Fawcett reporta que la enfermedad, desde esta época, estaba bastante distribuida en la región cafetalera de América, habiendo sido reportado en México, Las Antillas y Brasil.

La presencia de *M. citricolor* se ha detectado, según la EPPO (2016b), en países del continente americano, los cuales se observan en la Figura 2.

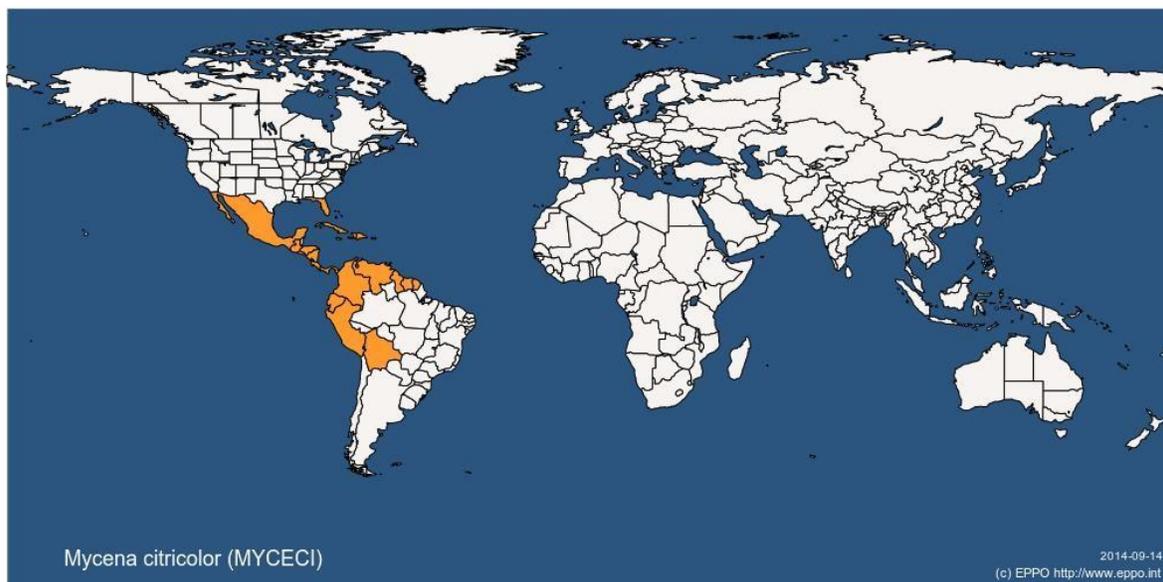


Figura 2. Distribución geográfica de *Mycena citricolor*.

En México según la (NIMF) no.8, Determinación de la situación de una plaga en un área; *Mycena citricolor* (Berkeley & Curtis) Sacc., se considera presente en el territorio nacional en áreas sembradas con cultivos hospedantes (CIPF, 2011; citado por SENASICA, 2014)

4.5.5. Hospedantes alternos.

Buller (1934) menciona que *Mycena citricolor* (Mencionado por él como *Omphalia flavida*, especie actualmente clasificada como un sinónimo de *M. citricolor*) es un ejemplo de un parasito no especializado; por lo que, en adición del café, su principal hospedante, ataca plantas que pertenecen a las más diversas plantas con flores y también varios helechos.

M. citricolor presenta un amplio rango de plantas hospedantes (500 especies), entre las cuales se destacan el níspero (*Eriobotrya japonica*), el cacao (*Theobroma cacao*) y el café (*Coffea arabica*) (CENICAFE, 2011).

En un gran número de plantas se producen escasas estructuras asexuales o ninguna en absoluto y la identificación del hongo puede ser hecho únicamente en laboratorio. Esto ha llevado a una confusión en la literatura ya que un número de hospedantes han sido reportados aparentemente simplemente por la presencia de lesiones parecidas a las formadas por este hongo y de tal tipo de observaciones no puede depender el diagnóstico (Sequeira, 1958), de esta manera, este autor reportaba en ese tiempo al menos 150 especies pertenecientes a 45 familias que pueden ser atacadas por *M. citricolor*.

4.5.6. Importancia económica.

Toda planta de café severamente atacada por el ojo de gallo sufre trastornos fisiológicos ya que restablecimiento del follaje, en donde tienen lugar las funciones de respiración y transpiración, les resta actividades a las funciones reproductoras y, por consiguiente, las cosechas subsiguientes, aun en caso de cambiar las condiciones desfavorables, no serán las ideales, mientras dure su completa reposición (Castaño, 1951; citado por CENICAFE, 2011).

M. citricolor puede causar defoliaciones severas en algunas localidades, produciendo pérdidas considerables en la producción. En varios países de Centroamérica, en plantaciones de café expuestas a altas condiciones de humedad y sembradas bajo sombrío, se han estimado pérdidas entre 20 y 30% (Waller, 2007).

4.5.7. Síntomas.

La enfermedad se caracteriza por la formación de pequeñas manchas (6-10 mm de diámetro) en las hojas (Wang y Avelino, 1999), aunque muchas de las más viejas pueden llegar a tener de 12 a 13 mm (Buller, 1934). Estas manchas, por lo general, son circulares, pero a veces pueden ser ovaladas debido a la delimitación con las nervaduras, o algo irregulares cuando dos a más manchas se fusionan (Wang y Avelino, 1999), produciendo manchas de considerable tamaño. Las hojas severamente afectadas tienen de 30 a 40 o aún más manchas, así que una larga proporción del tejido de la hoja se destruye (Buller, 1934). Las lesiones

jóvenes son café oscuras y las viejas de color café claro. En condiciones climáticas muy húmedas se producen, sobre la superficie de las manchas, cabecitas o gemas, que una vez maduras, se desprenden por la acción de las gotas de lluvia que las transportan a hojas adyacentes (Wang y Avelino, 1999), este es el estado asexual del hongo; de 20 a 50 son producidas en cada hoja, el número más grande observado fue de 70 en una mancha de 7 mm de diámetro (Buller, 1934). Sobre las manchas, principalmente en períodos lluviosos y en las horas de la mañana, se observan pequeñas estructuras fungosas, de color amarillo, que corresponden a los coremios o sinemas del estado imperfecto del agente causal de esta enfermedad. Estas estructuras reproductivas son muy abundantes (Figura 3), ya que en una sola mancha se pueden producir hasta 100 coremios (CENICAFE, 2011).

Relacionado al término correcto para nombrar a las estructuras asexuales de *M. citricolor*, algunos las nombran coremios, los cuales técnicamente son sinemas, sin embargo, los sinemas son un conjunto de conidióforos adheridos que producen conidios con fines reproductivos asexuales, pero el tallo asexual de *M. citricolor* no produce conidióforos ni conidios, por lo que no es actualmente totalmente correcto con la nueva reclasificación, llamar coremios o sinemas a la estructura asexual que se constituye por un tallo y una “cabeza” llamada comúnmente gema. Al respecto, Piepenbring (2015) indica que esta pequeña cabeza es una diáspora, término que significa propágulo de dispersión asexual (Ulloa y Hanlin, 2006), por lo que tampoco, actualmente, es correcto llamarla gema en base a que es un propágulo de dispersión asexual (Ulloa y Hanlin, 2006) que no produce conidios y solo produce en la periferia hifas infectivas (Buller, 1934).



Figura 3. Estructuras asexuales en manchas causadas por *M. citricolor*.

Conforme las manchas foliares se hacen mayores, el crecimiento de éstas tiende a detenerse por alguna razón, con la llegada de la estación seca, los tejidos enfermos de las hojas causados por *M. citricolor* se despenden, dejando numerosos círculos abiertos en la hoja. Las cerezas también son atacadas, una ligera decoloración del grano es frecuentemente causada (Buller, 1934).

4.5.8. Morfología

Las hifas de *M. citricolor* son las típicas de un hongo basidiomiceto cuyas células son generalmente binucleadas y presentan fíbulas (Sequeira, 1952; citado por Wang y Avelino, 1999), así también Buller (1934) reporta que las hifas individuales del micelio son septadas y provistas de “clamp-connexions”. El hongo produce dos tipos de cuerpos fructíferos: el basidiocarpo (sexual), que es difícil de hallar en el campo y los propágulos (tallo y propágulo asexual), que tienen forma de alfiler y es fácil encontrarlos en la estación lluviosa (Gaitán *et al.*, 2015).

La estructura asexual, que Buller (1934) llama “*stilbum-body*” es una estructura diminuta en forma de alfiler consistente en un delgado tallo cilíndrico coronado por una cabeza que, cuando se desarrolla completamente, se puede desprender fácilmente. La “*stilbum-body*” es en realidad un gemífero (propágulo de dispersión asexual). Este gemífero consiste en dos partes: 1) el tallo que puede llamarse pedicelo, y 2) la cabeza que es en realidad una gema (propágulo).

El tallo, que se estrecha gradualmente de abajo hacia arriba, es de alrededor de 2.0 mm en largo, de 0.12 mm de diámetro en su base, y alrededor de 0.05 mm en diámetro justo debajo de la cabeza, mientras que la cabeza tiene un promedio de aproximadamente 0.36 mm variando hasta 0.4 mm.

La cabeza es un esferoide achatado con una apófisis (parte saliente que permite la inserción de alguna estructura) de menor diámetro por debajo. Su superficie está ligeramente deprimida en el centro. La apófisis encierra y abraza el tallo cerca de 0.1 mm de su extremo final. La cabeza es resistente y coriácea, así que, cuando se deshidrata no se aprecia deformidad. Con moderado aumento se puede observar que la principal parte esferoidal achatada de la cabeza, pero no la apófisis, está cubierta periféricamente con un largo número de hifas filamentosas.

Son estos filamentos los que sirven para infectar una nueva hoja hospedante cuando la cabeza cae sobre ella y el clima es suficientemente húmedo (Buller, 1934).

El tallo, cuando es muy joven es bastante recto y perpendicular al substrato, pero, a medida que crece en longitud, usualmente se hace más o menos doblado o curvado (Figura 4, A-C). En la madurez, cuando tiene alrededor de 2 mm de largo, es más grueso en su base, ligeramente atenuada de su base hasta la apófisis y entonces, dentro de la apófisis, distintivamente contraída y siempre más o menos sigmoidalmente doblada (Figura 4, D-E). La posición terminal del sigmoide del tallo está oculta de la vista externa dentro de la cabeza, pero puede ser observada fácilmente después de que la cabeza haya sido removida de esta (Figura 4-F) (Buller, 1934).

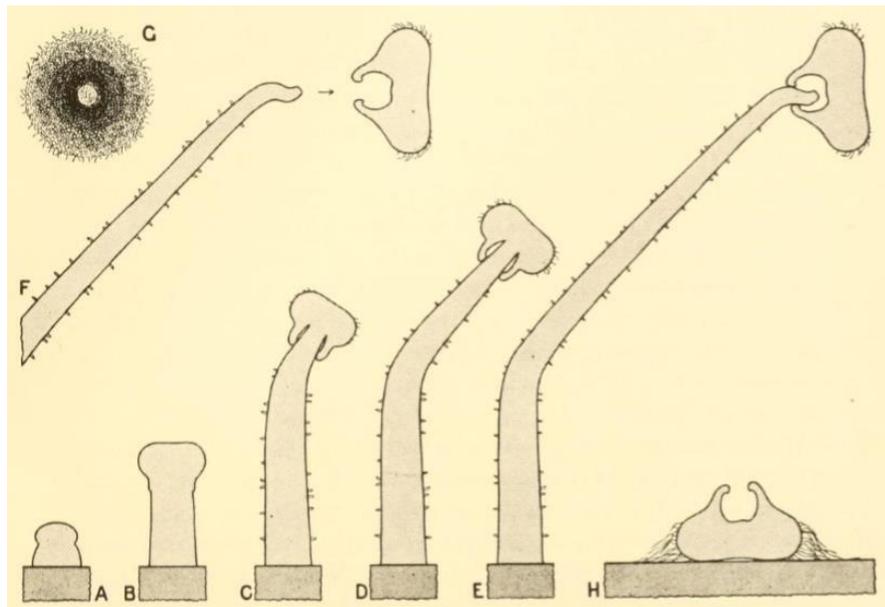


Figura 4. Fases de desarrollo de *M. citricolor* (Buller, 1934), con terminología actualizada. (A) Estado muy joven del tallo y propágulo apical. (B-D) El tallo continúa creciendo y el propágulo apical se ensancha y el ápice del propágulo se mantiene plano. (E) El tallo y propágulo ha crecido completamente. (F) El propágulo maduro se desprende del tallo y el viento lo arrastra como indica la flecha. (G) Envés de propágulo maduro. (H) Propágulo que se ha colocado sobre una hoja infectándola por medio de sus hifas periféricas infectivas.

La cabeza consiste de una masa central de células parenquimatosas relativamente largas, rodeada arriba y en los lados por una capa delgada de células más pequeñas y más aplanadas a partir del cual irradian alrededor una serie de delgadas hifas ramificadas septadas que, a los lados de la cabeza terminan en largas células en forma de pera, y en la cima de la cabeza,

terminan en más células delgadas claviformes (Figura 5, C-(g-m)). Un cierto número de células hinchadas en la cabeza dan lugar cada uno a una única hifa aérea que es usualmente simple, pero puede llegar a ser ramificado (Buller, 1934).

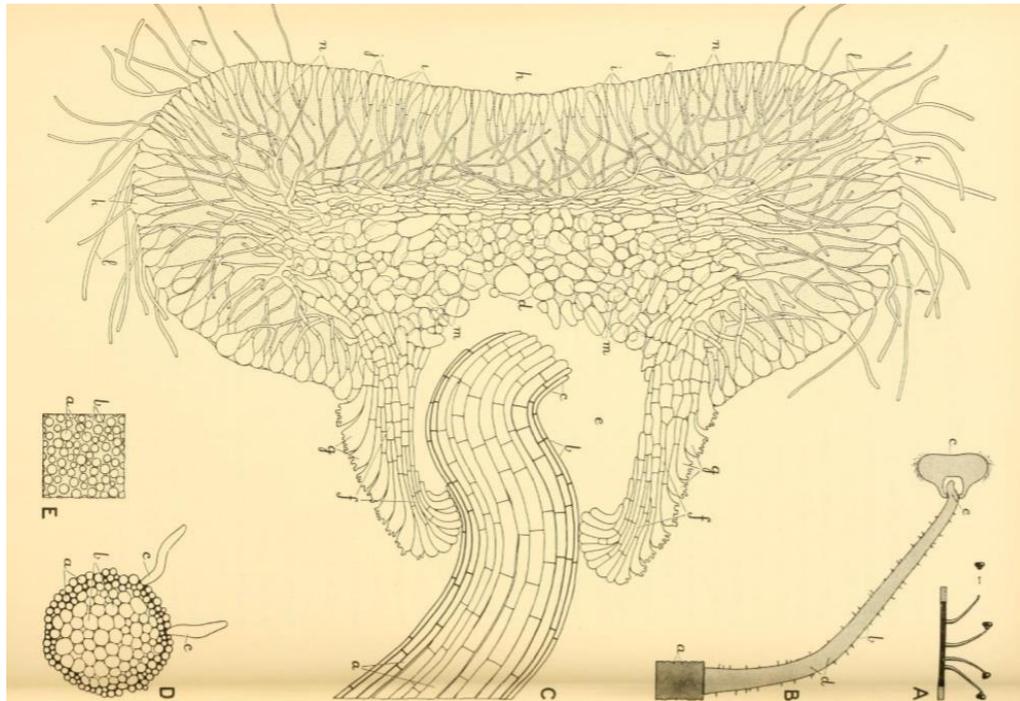


Figura 5. Propágulo de *Mycena citricolor* (Buller, 1934). A. Grupo de cuatro estructuras asexuales (tallos y propágulos) maduras sobre la superficie de una mancha de *Nerium Oleander*. B. Sección mediana longitudinal de una estructura asexual (tallo y propágulo apical) individual adjunta a una hoja de *Oleander*. C. Acercamiento a la sección longitudinal de la parte apical del tallo y del propágulo (gema). (a) pedicelo, (b-c) curvatura del pedicelo, (e) espacio de aire entre la apófisis y la última parte del tallo, (f) apófisis de la gema, (g) células fimbriadas que forman la capa de la apófisis, (h) cúspide de la gema algo deprimida, (i) células claviformes separadas por una matriz gelatinosa, (j-k) células claviformes, algunas de ellas produciendo hifas (l), (m) células parenquimatosas incrustadas en una matriz gelatinosa y formando el núcleo de la pulpa, (n) hifas delgadas septadas y ramificadas formando la corteza de la pulpa de la gema. D. Sección transversal del tallo rodeado por la base del propágulo (gema). E. Superficie vista desde la parte superior del propágulo (gema).

La apófisis o parte baja de la cabeza está formada de hifas que surgen del núcleo de la parte esferoidal achatada de la cabeza. Estas hifas se extienden hacia arriba y hacia abajo, así que al principio evitan la contracción de la parte superficial del tallo, y después hacia el interior y hacia abajo para que finalmente muchos de ellos vengan a descansar contra el tallo (Figura 5, C-(f-g)), con el resultado de que se forma un espacio de aire anular entre la parte superior del tallo y la apófisis (Figura 5, C-e) (Buller, 1934).

La enfermedad se propaga a partir de estas estructuras reproductivas del hongo, que pueden dispersarse principalmente por acción del agua y el viento. Su formación depende de la presencia de luz, con la máxima producción de cabecitas y pigmento amarillo de las mismas, cuando el hongo se expone a longitudes de onda de 310- 400 nm (CENICAFE, 2011).

Asimismo, hay reportes de que las estructuras son fosforescentes en la noche, resultando en que la enfermedad se llame candelilla en algunos lugares (Gaitán *et al.*, 2015).

4.5.9. Epidemiología.

Generalmente se considera que el ojo de gallo es una enfermedad importante en plantaciones viejas, que jamás han sido podadas, o en plantaciones establecidas bajo sombra excesiva. En ciertas zonas ecológicas, sin embargo, principalmente donde hay una fuerte precipitación y pocas horas de sol, la enfermedad puede desarrollarse sin la presencia de sombra (Wang y Avelino, 1999).

Avelino (1995), citado por Wang y Avelino (1999) menciona que cuando el combate químico está establecido, la epidemia se adelanta y por lo tanto el control tiene que empezar antes. Asimismo, indica que la cantidad de inóculo residual o inóculo primario es muy importante para el desarrollo posterior de la epidemia.

Conforme el pedicelo va creciendo en longitud por el crecimiento intercalar justo debajo de la gema. Su inferior o mitad basal usualmente llega a ser curvada. Una causa de la general curvatura del estípite es la mutual repulsión de los gemíferos. Cuando un gemífero está creciendo solo y su pedicelo esta curvado, puede ser que la curvatura sea debido al micelio en el substrato que de alguna manera repele gemífero más de un lado que de otro. Después de que la abscisión de la gema ha sido efectuada, la unión de la gema (propágulo) al pedicelo es mantenido simplemente por la apófisis.

Hasta que la abscisión de la gema ha tomado lugar, la apófisis abrocha con firmeza el pedicelo, y es esta firme unión la que hace que la abscisión de la gema de la parte superior del pedicelo sea mecánicamente posible. Después de que la abscisión ha tenido lugar, la unión de la apófisis al pedicelo se debilita, y entonces la gema puede fácilmente ser arrancada del pedúnculo por el viento.

Cuando la gema cae sobre una hoja, usualmente se fija sobre su superficie superior ligeramente cóncava y se llega a unir fácilmente con la hoja, presumiblemente por medio del mucilago en que las células claviformes empalizadas, que forman la capa exterior de células de la gema, son incrustadas.

La preparación para la geminación de la gema (propágulo) se hace antes de que la gema (propágulo) sea arrancada de su pedicelo; así, cuando la gema está madura y aun unida a su pedicelo, crecen hacia el exterior de sus células claviformes o en forma de pera todas fuera de la superficie de su parte oblada-esferoidal un gran número de hifas de infección.

4.5.10. Bioluminiscencia de *M. citricolor*

La bioluminiscencia de hongos (Figura 6) es comúnmente observada en la superficie de la tierra, y las bacterias luminosas en el mar. En los bosques, ciertos tipos de hongos y madera en descomposición emiten luz misteriosa en la noche. Este fenómeno fue observado desde tiempos antiguos y descrito por Aristóteles (384-322 B.C.) y Plinio (A.D. 23-79) (Shimomura, 2012).

El fenómeno natural de la bioluminiscencia es la emisión de luz visible por organismos vivientes mediante una enzima catalasa (luciferasa), reacción molecular de oxígeno con un substrato (luciferina). Organismos bioluminiscentes son diversos en la naturaleza, por ejemplo, bacterias, dinoflagelados, hongos e insectos. Las luciferasas no muestran homología cada una con otra y las luciferinas también son químicamente no relacionadas. El oxígeno molecular es la única característica común de las reacciones bioluminiscentes, indicando que los sistemas bioluminiscentes en la mayoría de los organismos pudieron haberse desarrollado independientemente (Wilson & Hastings, 1998 citado por Weitz, 2004). La comprensión de la fisiología de los hongos luminiscentes y su relación con la emisión de luz es importante por varias razones, tal como que la expresión de la luminiscencia puede ser resuelta dentro de una

colonia o basidiocarpo y por lo tanto usada como un marcador para la expresión génica y diferenciación (Bemudes *et al.*, 1990). No obstante, aún se necesita llevar a cabo gran cantidad de investigaciones adicionales con el fin de explicar los mecanismos y la importancia de los fenómenos de bioluminiscencia de los hongos (Weitz, 2004).

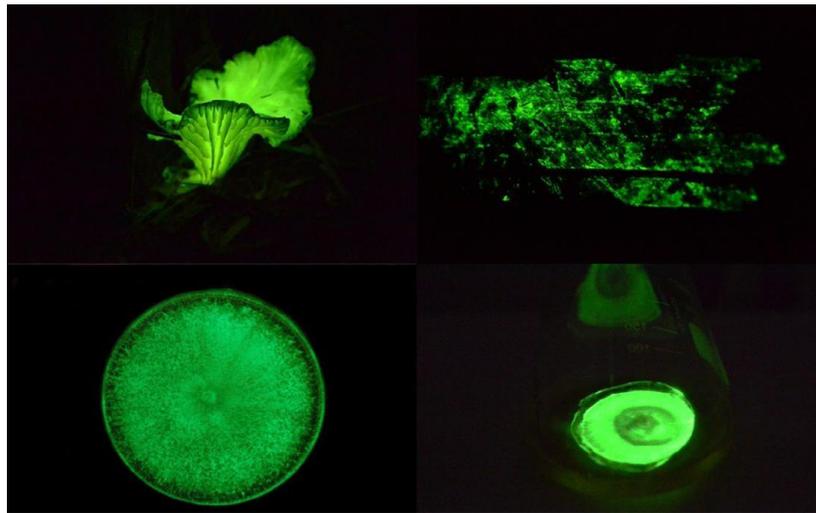


Figura 6. Bioluminiscencia en hongos (Oliveira *et al.*, 2013).

La mayoría de las especies de hongos luminiscentes producen luz durante los estados miceliales cuando son cultivados en medios adecuados y tienen un vigoroso crecimiento. Durante el estadio de cuerpos fructíferos algunas especies son luminiscentes, pero muchos no son enteramente luminiscentes (Shimomura, 2012).

Desjardin *et al.* (2007) mencionan que numerosas especies de *Mycena* forman micelio luminiscente y/o basidiomas (Figura 7), contando no menos de 26 especies reportadas como bioluminiscentes, sin embargo, en un estudio realizado Desjardin *et al.* (2010) adiciona siete especies nuevas reportadas de *Mycena* por lo que asciende a 71 el número de especies de hongos luminiscentes reportados. Dentro de las especies bioluminiscentes se reporta a *M. citricolor*, agente causal del ojo de gallo en café, reportada por Buller (1934).

M. citricolor es considerado uno de los hongos Mycenoides luminiscentes más interesantes ya que las cabecitas de las estructuras asexuales que son el inoculo primario infectante son luminiscentes. Se desconoce si los propágulos luminosos atraen artrópodos vectores de dispersión, ayudando de esta manera al hongo a infectar nuevos hospedantes (Desjardin, 2007).

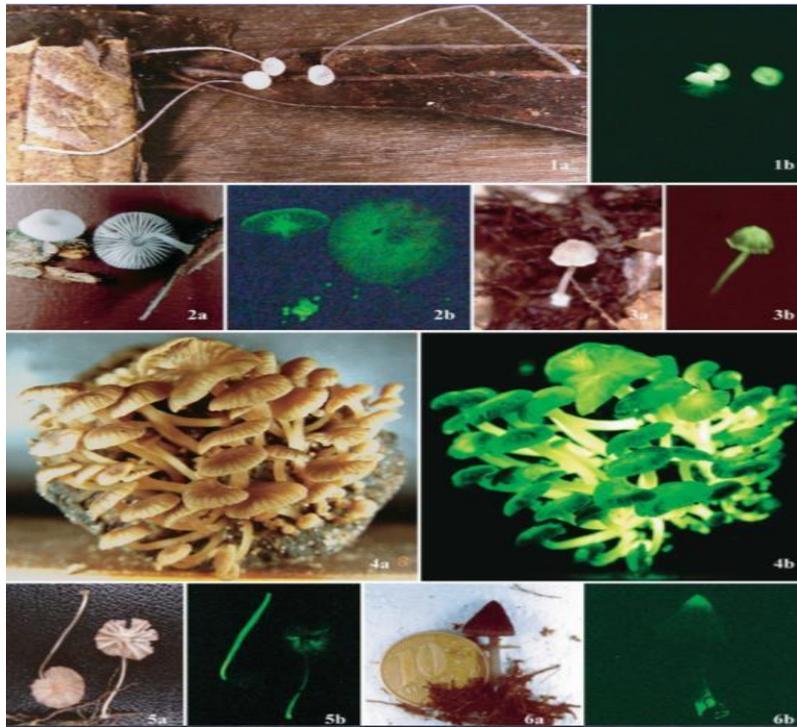


Figura 7. Especies luminiscentes de *Mycena* (Desjardin *et al.* 2007)

El descubrimiento de que el micelio de *M. citricolor* creciendo en las manchas de las hojas vivas de café emiten luz ha proporcionado un medio de diagnóstico de la enfermedad americana del café en las hojas (Buller, 1934).

Weitz *et al.* (2001) estudiaron los efectos de las condiciones de cultivo *in vitro* sobre el crecimiento micelial y luminiscencia de algunos hongos, entre los que se incluye la especie *M. citricolor*, reportando que el hongo crece a 5°C (después de 13 días), 15°C y 22°C, con un pH de 5-6 para mayor luminiscencia, asimismo los niveles de luminiscencia fueron más altos en condiciones de 24 h de oscuridad y 24 h de luz que en 12 h de luz/12 h de oscuridad.

4.5.11. Crecimiento de *M. citricolor* en medio de cultivo artificial

En pruebas hechas por Buller (1934) se realizó siembra del hongo en cajas Petri con medio de cultivo malta-agar. El micelio creció radialmente hacia afuera del centro de cada plato. Algunos de los cultivos que fueron expuestos a luz difusa del día formaron zonas concéntricas de micelio en que los anillos estériles más amplios de micelio suave se alternan regularmente con anillos estrechos de micelio soportando gemíferos. Se encontró que las zonas estériles fueron

formadas durante la noche y las zonas fértiles durante el día. Estos factores indican que la producción de gemíferos por el micelio es iniciada por un estímulo morfogenico de luz, asimismo afirma que una exposición del micelio a luz del día por pocos minutos, o posiblemente menos de un minuto, es suficiente para iniciar la producción de gemíferos.

Buller (1934) concluye: que el micelio cuando recién se obtiene de las gemas desarrolladas al aire libre en las hojas de café, la fructificación es vigorosa; cuando el micelio ha crecido varios años sobre medio artificial, pierde gradualmente su poder de fructificación; y el poder de fructificación en un cultivo viejo puede ser restaurado en gran medida pasando el micelio a través de hojas vivas.

4.5.12. Manejo de la enfermedad.

4.5.12.1. Manejo cultural

El patógeno depende en gran medida de la presencia de agua libre, por lo tanto, cualquier práctica cultural tendiente a reducir la humedad dentro del cafetal, tendera a reducir también la enfermedad. Entre las prácticas que se pueden llevar a cabo están la regulación de la sombra, la poda por surco, la deshija y la deshierba. Esta última práctica permite la eliminación de inóculo de los hospedantes alternos presentes entre la maleza. El combate cultural no es tan simple como parece, pues ninguna práctica es totalmente efectiva si el sol no logra penetrar adecuadamente en el cafetal por una u otra razón. Por ejemplo, el éxito de la poda cíclica dependerá en gran medida de la orientación de los surcos: la orientación este-oeste es evidentemente la más favorable pues permite una mayor penetración del sol. Al contrario, una pendiente pronunciada del este (parte alta) a oeste (parte baja) complicaría en gran medida el combate cultural, ya que la parcela estaría sombreada la mayor parte del tiempo: en la mañana esta estaría bajo la sombra creada por la misma ladera y en la tarde posiblemente bajo una densa nubosidad (Wang y Avelino., 1999).

En un estudio realizado por Avelino *et al.* (2007) sugiere que se deben aplicar densidades de siembra, sistemas de poda y prácticas de sombra adaptados a la altitud, aspecto e inclinación de las pendientes, los cuales son factores que determinan en gran medida el riesgo de epidemia. En zonas con alto riesgo de epidemias debido a sus características topográficas, se debe hacer un intento para aumentar las distancias entre las filas plantadas de café, para

reducir la sombra y evitar la sombra proyectada por la fruta, árboles y especies forestales. Estas prácticas deben facilitar el control químico incluso mejorar la expresión de alguna resistencia parcial.

4.5.12.2. Manejo biológico

En un estudio realizado por Vargas (1984) para medir la eficiencia de *Trichoderma harzianum* se encontró que este hongo, por sí solo, no fue muy eficiente en la eliminación de cabecitas, a pesar de que tuvo un 67.5 % en promedio de colonización de manchas. El hongo logró establecerse bien en la mayoría de las lesiones de ojo de gallo, a partir de la primera aplicación de inóculo, especialmente cuando se usó junto con el fungicida.

Se puede considerar el control biológico junto con el uso de fungicidas cúpricos, como otra alternativa en el combate de la enfermedad y quizás también integrarlo con la regulación de la sombra, que es otro factor importante que ayuda a disminuir la incidencia de ojo de gallo (Vargas, 1984).

4.5.12.3. Manejo químico

Uno de los primeros fungicidas que tenía algún efecto sobre la enfermedad, fue el caldo bordelés (Carvajal, 1939; citado por Wang y Avelino, 1999). Sin embargo los productos cúpricos no representaban una buena alternativa durante los meses de mayor precipitación, lo que propició la búsqueda de otras alternativas químicas (Wang y Avelino, 1999).

Basado en el hecho de que *M. citricolor* produce ácido oxálico, los investigadores de la Universidad de Costa Rica se dieron a la tarea de probar, bajo condiciones de campo, diferentes formulaciones de cal con el fin de neutralizar dicho ácido (Vargas *et al.*, 1991; citado por Wang y Avelino, 1999) y con base en los resultados obtenidos, la industria de agroquímicos formuló un fungicida protector basado en carbonato de calcio, el cual está suspendido en aceite mineral tipo parafínico, lo cual permite adherirse mejor al tejido (Wang y Avelino, 1999).

Conviene, sin embargo, recordar que, a causa del inóculo residual, es recomendable empezar el combate de la enfermedad a inicios de la época lluviosa con un producto sistémico para luego continuar con fungicidas protectores (Wang y Avelino, 1999).

Rao y Tewari (1988) mencionan que el hidróxido de calcio si es aplicado en apropiada concentración, puede controlar eficazmente la enfermedad y esto indica un potencial para su uso en el control de campo de la enfermedad.

Julca *et al.* (2015) en base a un estudio reporta que fungicidas como el ciproconazol, Imazalil, Triadimenol + Tebuconazol y Prochloraz tuvieron efectividad del 100% durante todo el periodo de estudio, por lo que recomiendan hacer estudios en campo de estos cuatro fungicidas.

4.6. Importancia de los hospedantes alternos.

Los hospedantes alternos juegan un papel importante en la naturaleza como reservorios de los hongos fitopatógenos durante los períodos críticos ambientales, ausencia del hospedante principal o sirven para cumplir parte de su ciclo biológico. De los hospedantes alternos pueden viajar al hospedante principal cuando éstos se establecen y generan nuevas epidemias. Cuando se establecen estrategias de manejo de las enfermedades hay que considerar los hospedantes alternos, ya sea para establecer nuevos ciclos de cultivos o cuando se quiere establecer plantaciones o cultivos nuevos en un área determinada.

En el case del café, el hongo causante de la mancha de la hoja americana es un hongo agárico nativo, *M. citricolor*. Este patógeno exhibe marcada preferencia por ciertas plantas hospedantes, emparentadas y no emparentadas, en vez de ser específico del hospedante (Lodge 1996; citado por Lodge, 2001).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Localización

La fase experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Hongos Fitopatógenos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo y en el laboratorio de Patosistemas vegetales, ubicado en la Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México.

5.2. Colectas de material vegetal

Se hicieron tres colectas durante el periodo primavera-verano, el 14 y 29 de mayo, así como el 28 de junio del año 2016.

Se visitaron los municipios de Xicotepec de Juárez y Tenango de las Flores, ubicados en la Sierra Norte del estado de Puebla, con la finalidad de coleccionar hojas de *Coffea arabica* L. (cafeto), *Gardenia jasminoides* Ellis (gardenia), y un árbol silvestre. Se hizo un registro de coordenadas geográficas con un GPS (Mobile Mapper Field Ashtech, USA). Las hojas coleccionadas se escogieron tomando en cuenta a aquellas que presentaran síntomas similares a la enfermedad conocida en México como “ojo de gallo”, causada por la especie *M. citricolor* según reporte de SENASICA (2014). En la tercera colecta, además de gardenia, el árbol, café, se coleccionaron hojas de *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. (níspero) que presentaban síntomas similares a “ojo de gallo” y posteriormente se coleccionaron muestras de níspero con las características mencionadas anteriormente en jardines del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo y la Universidad Autónoma Chapingo. Las hojas se guardaron de forma apropiada en bolsas de papel, previamente etiquetadas, asegurando el menor maltrato y se trasladaron a los laboratorios. Las hojas se prensaron y procesaron en los laboratorios.

5.3. Identificación de especies coleccionadas

La única especie de la que se tenía en duda el nombre científico fue la del árbol, ya que es silvestre, mientras que la identificación de las especies de café, gardenia y níspero fueron inmediatas sin necesidad de la utilización de claves taxonómicas.

Se identificó la especie del árbol utilizando claves taxonómicas contenidas en el libro *Trees and Shrubs of Mexico* (Stanley, 1920).

5.4. Trabajo de laboratorio

Esta fase de trabajo se basó en técnicas de laboratorio de acuerdo a Tuite (1969) y French y Hebert (1980).

5.4.1. Descripción de síntomas: manchas foliares

Las muestras se colocaron sobre la mesa de trabajo y se describieron las manchas, anotando éstos en una libreta de campo.

5.4.2. Búsqueda de signos:

Se observaron las manchas de cada una de las muestras en un microscopio estereoscópico (Nikon, SMZ800 JAPAN), con el objetivo de encontrar signos del hongo. Se seleccionaron los síntomas que presentaran signos del hongo, así como aquellas que se observaran completamente limpias, sin algún otro signo para que estas fueran procesadas.

5.4.3. Proceso de las muestras:

5.4.3.1. *Cámara húmeda:* Se procedió a inducir la formación de signos del hongo en el tejido dañado. Para este fin se usaron las manchas parecidas a las que se describen para *M. citricolor* en los que no se observaron signos del hongo o alguna otra estructura. Esto se realizó para hojas de café, gardenia y árbol. Se cortó una porción de la hoja que contenía la mancha, se colocó en una bolsa de polietileno con toallas sanitas humedecidas con agua destilada estéril y sobre éstas se colocaron las muestras cortadas; a la bolsa se le agregó aire y se cerró con una liga. La cámara húmeda se dejó en la mesa de trabajo en condiciones ambientales de laboratorio hasta que se produjeran los signos. Las hojas de níspero y árbol que se obtuvieron a partir de la tercera colecta se colocaron en cámara húmeda sin que se hicieran disecciones a estas. Asimismo, se hizo una prueba de cámara húmeda en oscuridad total a 20 ° C. Se hicieron observaciones de las muestras en cámara húmeda a los 6 y 10 días para detectar la presencia de signos.

5.4.3.2. *Selección de manchas para aislamientos en medio de cultivo agar.* Las hojas que contenían síntomas que no se procesaron en cámara húmeda fueron seleccionadas para aislar el hongo en medio de cultivo puro. Se escogieron de 15 a 20 síntomas por especie vegetal colectada.

5.4.4. Aislamiento de las manchas en medio de cultivo agar:

5.4.4.1. *Asepsia de la mesa de trabajo:* la mesa de trabajo, cámara de flujo laminar (Thermo Electron Corporation, USA) y otras áreas que se utilizaron se desinfectaron con alcohol etílico al 70%.

- 5.4.4.2. *Preparación de medio de cultivo:* se utilizaron los medios de cultivo artificiales de papa-dextrosa-agar (PDA) (7.8 g de PDA BD Difco por 200 mL de agua destilada), esterilizado en olla de presión a 120 psi (kg/cm²) por 20 min. para siembra de muestras y agar-agar (AA) (3 g AA HYCEL de México S. A. por 200 mL de agua destilada), esterilizado en olla de presión a 120 psi (kg/cm²) por 20 min para realizar aislamientos de punta de hifa.
- 5.4.4.3. *Preparación de la muestra:* las muestras que se sembraron en medio de cultivo se obtuvieron cortando parte de las manchas, completamente limpias o en su caso con signos de la enfermedad de interés, con material foliar sano; los cortes obtenidos se colocaron en una caja Petri.
- 5.4.4.4. *Desinfestación de la muestra:* en la cámara de flujo laminar se colocó la caja Petri con las muestras a sembrar. Como primer paso se agregó alcohol al 70% a la caja Petri con las muestras para retirar polvo y materiales extraños, las muestras se mantuvieron sumergidas por 1 min.; después con ayuda de unas pinzas se colocaron en papel secante estéril para retirar el exceso de líquido en las muestras. Después de que las muestras estuvieran secas se procedió a colocarlas en otra caja Petri a la cual se le agregó hipoclorito de sodio al 1.5%; las muestras duraron inmersas un tiempo de 2 min, después se colocaron manipulándolos con una pinza sobre papel secante estéril. Una vez secas, las muestras, se colocaron en una caja Petri a la cual se le agregó agua destilada estéril, esto para lavar los residuos de cloro, esta acción se repitió dos veces más, por lo que al final se fueron tres lavados. Por ultimo después del último lavado, las muestras se colocaron sobre papel secante estéril y se esperó a que secaran completamente para proceder a la siembra de éstas.
- 5.4.4.5. *Siembra en medio de cultivo y observación del crecimiento micelial:* con unas pinzas, previamente flameadas, de punta fina se tomó cada muestra y se colocó sobre cajas Petri desechables de poliestireno estériles (60 x 15 mm) con medio de cultivo PDA. Se colocaron cinco cortes por caja Petri. Después de 4 días, cada 24 h se observaron las cajas Petri para detectar el crecimiento del hongo.
- 5.4.4.6. *Purificación:* Cuando se empezó a desarrollar micelio proveniente de las muestras sembradas, se observaron y seleccionaron aquellas que tenían color blanco. De las muestras seleccionadas se tomó un pedazo del medio de cultivo con micelio en

crecimiento y se transfirió a una nueva caja Petri con medio de cultivo PDA. Se colocaron tres pedazos por caja Petri. Se incubó en condiciones de laboratorio. Las cajas se observaron cada 24 h para detectar el crecimiento del hongo. En estos aislamientos se esperó a que se produjeran las estructuras asexuales del hongo para corroborar la especie. Aquellos crecimientos en los que se observó presencia de estructuras asexuales correspondientes *M. citricolor* se seleccionaron para purificar la colonia por el método de punta de hifa.

5.4.4.7. *Punta de hifa*: para obtener cepas puras del hongo se realizó punta de hifa a las colonias que presentaron estructuras asexuales idénticas a *M. citricolor*. De cada colonia seleccionada se extrajo con una aguja de disección, previamente flameada, una alícuota de hifa de la orilla de la colonia de interés. La alícuota extraída se colocó en una caja Petri con medio de cultivo AA, para que el nuevo crecimiento de las hifas fuera más separado entre ellas y facilitar la extracción; se colocaron 3 alícuotas por caja Petri.

Después de 24 horas de la siembra en AA, se extrajo del medio una punta de hifa, corroborando antes que estuviera aislada de las demás hifas en crecimiento, la punta aislada se colocó en una caja Petri con medio de cultivo PDA colocando solo una punta por caja. Las cajas nuevas se incubaron en condiciones ambientales de laboratorio.

Se observó el crecimiento micelial de las cajas cada 24 h para corroborar que la cepa fuera pura y descartar presencia de contaminantes.

5.4.4.8. Almacenamiento de la cepa en tubo inclinado.

Con motivos de preservar la cepa por varios años futuros se almacenó la cepa en tubo inclinado, para lo cual se usó medio de cultivo PDA preparado de forma tradicional.

Se vació medio de cultivo PDA en tubos de ensaye, previamente esterilizados junto con una tapa de algodón, y se colocaron de manera inclinada para esperar a que el medio gelificara y tomara una forma inclinada dentro del tubo. Después de que los tubos con medio estuvieran listos se procedió al almacenamiento. En la cámara de flujo laminar se etiquetaron los tubos corroborando que el etiquetado correspondiera al de las cajas; con la ayuda de un asa,

previamente flameada. Se extrajo medio de cultivo con micelio de las cajas Petri y se colocó en el tubo. Ya listos, los tubos se incubaron en condiciones de laboratorio.

Cuando se observó crecimiento de micelio en todo el medio de cultivo PDA contenido en el tubo se agregó aceite mineral estéril. Después de esto los tubos se incubaron en un cuarto con una temperatura a 20°C.

5.4.5. Aislamiento de los signos en medio de cultivo agar.

5.4.5.1. *Preparación de la muestra:* los síntomas con signos procedentes de cámara húmeda se colocaron en un microscopio estereoscópico para observar si eran similares a las del hongo de interés.

5.4.5.2. *Siembra de la muestra:* Solo se observaron estructuras asexuales por lo que con la ayuda de una pinza de punta fina se tomó la estructura tratando de cortarla por el estípite evitando arrastrar contaminantes de la superficie de las muestras. La estructura se colocó en una caja Petri con medio de cultivo PDA y se incubó en condiciones ambientales de laboratorio. Posteriormente se siguió el mismo procedimiento descrito desde “purificación” correspondiente al apartado de “Aislamiento de los síntomas en medio de cultivo artificial” hasta obtener colonias puras.

5.4.6. Identificación de la especie

a) *Colonia:* se hizo inoculación en punto sobre medio de cultivo PDA contenido en cajas Petri de 20 mm, los cuales se colocaron en una cámara de cultivo a luz natural de laboratorio y temperaturas de 21 a 24 ° C. Las muestras que se evaluaron fueron obtenidas de los aislamientos obtenidos de gardenia y café, se escogieron las representativas y aquellas que se mandaron a secuenciar.

b) *Morfológica:* se tomaron estructuras asexuales provenientes de los medios de cultivo y de las muestras vegetales que contenían estructuras del hongo y un basidiocarpo que creció de manera espontánea en una muestra sembrada de gardenia en PDA; se observaron a simple vista y, para el caso de las estructuras asexuales se realizaron montajes con ácido láctico al 85% y se observaron y midieron parámetros con un microscopio compuesto (Nikon Eclipse E400 JAPAN). Asimismo, se realizaron observaciones de las colonias de los

aislamientos obtenidos. Se realizó una descripción morfológica de las estructuras asexuales y sexual, la cual se comparó de acuerdo a características reportadas por Buller (1934) y otros autores que reportan crecimiento *in vitro* de *M. citricolor*.

c) *Molecular*: del micelio de tres colonias se extrajo el ADN por el método de CETAB, el producto de PCR se amplificó con los primers universales ITS1/ITS4 e ITS5/ITS4 (White *et al.*, 1990) de las regiones internas ITS rDNA. El producto se purificó y secuenció en dos direcciones en MACROGEN (Korea), y las secuencias se analizaron con el software DNASTAR, Versión 3 (2001). Las secuencias se depositaron en GenBank (NCBI).

5.4.7. Observación de la luminiscencia del hongo

Con objetivo de corroborar la luminiscencia del hongo reportada por algunos autores, se observó la luminiscencia del hongo; se utilizó un transiluminador de luz UV (DESAGA UVIS USA) colocado en un cuarto oscuro para una mejor visualización. Se hicieron dos observaciones de luminiscencia a 254 nm; en la primera se compararon los aislamientos del hongo obtenidos en gardenia y café, así como también los aislamientos que se estaban obteniendo de los síntomas de árbol y níspero; en la segunda observación se compararon los aislamientos obtenidos de café y gardenia con la presencia de un hongo testigo.

5.5. Pruebas de patogenicidad

Se realizaron pruebas siguiendo los postulados de Koch para comprobar que el hongo *M. citricolor* es el agente causal de la enfermedad ojo de gallo en café.

a) *Activación del hongo*: las cepas del hongo guardados en tubo inclinado se activaron en el mes de agosto; se escogieron cuatro cepas representativas de *M. citricolor*, correspondientes a tres de gardenia y una de café, eligiendo en gardenia aquella en la que previamente se observó esporulación abundante, esporulación moderada y baja esporulación. Utilizando un asa previamente flameada, se extrajeron alícuotas de colonias de *M. citricolor* contenidas en tubo inclinado, las cuales se lavaron con agua destilada estéril para retirar el exceso de aceite mineral. Ya secas, las alícuotas se colocaron en cajas Petri de poliestireno estériles de (90 x 15 mm); se colocaron cuatro alícuotas por caja Petri por número de cepa.

- b) *Elección y desinfestación de plantas*: se eligieron cinco plantas de café y gardenia, para inocular una cepa elegida por planta y tener una planta testigo; la elección se hizo tomando en cuenta caracteres cualitativos de buen porte, follaje abundante y buena sanidad. Las plantas elegidas se desinfestaron 24 h antes de programada la inoculación, con el fin de eliminar residuos contaminantes en las hojas que pudieran afectar la efectividad de la inoculación. Para desinfestar las plantas se hizo un lavado de las hojas con hipoclorito de sodio al 1.5 %, aplicándolo sobre el haz y el envés de las hojas; este lavado con cloro se hizo en un periodo de tiempo no mayor a 2 min abarcando las cinco plantas de una especie, sea gardenia o café; después del lavado con cloro se aplicó agua destilada estéril en el haz y envés de cada hoja para retirar el cloro aplicado anteriormente y evitar efectos de toxicidad en la planta, en este paso no se consideró un tiempo máximo de aplicación, en total se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. Cabe mencionar que las aplicaciones de cloro y agua destilada estéril se hicieron usando un atomizador (Lusalen S.A. de C.V., México).
- c) *Inoculación de *M. citricolor* en hojas*: se realizaron dos tipos diferentes de inoculación, con herida y sin herida en las hojas. Las inoculaciones en plantas de gardenia se realizaron primero. En gardenia, por cada planta previamente etiquetada, se escogieron diez hojas a las cuales con una aguja de disección previamente flameada se les realizó una herida en los dos lados de la hoja diferenciados por la nervadura central, así también se escogieron diez hojas a las cuales no se les hizo herida; en el caso de las plantas de café se eligieron diez hojas por planta para inocular cinco con herida y cinco sin herida, cuando estas se inocularon se inocularon también cuatro plantas de gardenia, eligiendo asimismo cinco hojas con herida y cinco sin herida por planta, así también en las plantas se eligieron hojas para realizar las inoculaciones testigo. Para inocular se tomó una porción de la colonia del hongo activado posteriormente, estas porciones se obtuvieron dividiendo la colonia con un sacabocados de 1.7 cm de diámetro, previamente esterilizado y flameado, dividiendo a su vez estas porciones a la mitad con un bisturí flameado, para fines de la planta testigo se utilizó solo medio de cultivo PDA que no tuviera crecimiento de algún organismo. En cada punto de herida de la hoja se colocó una porción de la colonia haciendo coincidir el micelio de esta con la hoja, las porciones posteriormente se cubrieron con algodón húmedo estéril que se sujetó con parafilm (Pechiney Plastic Packaging Menasha Inc., USA). Para las 10

hojas sin herida el procedimiento fue similar. Una vez terminado el procedimiento en cada planta se realizó un riego al sustrato y cubrieron completamente con bolsas de polietileno estéril. Ya cubiertas, las plantas se colocaron en una cámara de incubación (Warrer Sherer, USA) calibrada a 22 ° C con periodos de luz constante de 12 h.

- d) *Evaluación de inoculación*: en la primera inoculación las bolsas se retiraron y se destaparon las hojas a los 20 días después de la inoculación, se dejaron 2 días más en la cámara bioclimática y se procedió a la evaluación; en la segunda inoculación las hojas inoculadas se destaparon 10 días después de la inoculación, las bolsas se mantuvieron cubriendo los lados 15 días más, después de 38 días de la inoculación se realizó la evaluación final. Se cortaron las hojas inoculadas y se guardaron en bolsas de papel debidamente etiquetadas para ser llevadas y procesadas en el laboratorio de hongos fitopatógenos del Colegio de Postgraduados. En el laboratorio se tomaron fotos de cada hoja, se observaron las manchas presentadas, se describió el color, largo y ancho de cada mancha, así como la presencia de estructuras asexuales y micelio.
- e) *Aislamiento de síntomas en medio de cultivo agar*: se seleccionaron las manchas que fueron parecidas a las del ojo de gallo en café. Estas manchas se aislaron siguiendo el mismo procedimiento de “Aislamiento de síntomas en medio de cultivo agar” descrito anteriormente.
- f) *Evaluación de los aislamientos en medio de cultivo agar*: las muestras sembradas se observaron a los cuatro días después de la siembra para detectar crecimiento del hongo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Descripción de síntomas: manchas foliares

Los síntomas en las muestras colectadas se observaron en el haz y envés de las hojas (Figura 8), la coloración y forma en los dos lados coincidió.

En *Gardenia jasminoides* se observaron de 1 a 3 manchas por hoja; se observaron manchas en forma circular, de color blanco a café claro cremoso; las manchas midieron de 0.2 x 0.2 cm a 0.5 x 0.7 cm de diámetro, no se observó tejido desintegrado en los síntomas. Se observó presencia de estructuras asexuales sobre dos manchas, y el máximo de estas estructuras que se observaron fue de cinco.

En el caso del árbol el cual se identificó con el nombre de *Iresine tomentella* Standl. (Stanley, 1920) se contabilizaron desde 1 a 20 manchas con forma circular teniendo en algunos casos deformaciones mínimas, el color de las manchas fue de blanco cremoso a café claro, se notó coalescencia de las manchas en algunas hojas. Asimismo, se encontró tejido desintegrado en las hojas las cuales corresponden al lugar donde se ubicaron las manchas. Estas midieron de 0.2 x 0.3 hasta 1 x 1 cm; no se observaron estructuras de *M. citricolor* sobre las manchas.

Las manchas observadas en níspero correspondieron a un número de 1 a 18 en una hoja. Los colores de estas fueron de blanco grisáceo a café claro, la forma de las manchas fue circular con mínimas deformaciones y presencia de coalescencia en algunos casos. Los síntomas midieron de 0.2 x 0.2 cm a 0.7 x 0.8 cm; se observó tejido desintegrado en algunas de las manchas, pero no se observaron estructuras parecidos al hongo *M. citricolor* sobre los síntomas.

Las hojas de cafeto presentaron hasta siete manchas por hoja, las cuales tuvieron forma circular en algunos casos con deformaciones mínimas y síntomas que habían coalescido, estos tuvieron color café claro a oscuro con diámetro de 0.2 x 0.3 cm a 1 x 1 cm de diámetro; y no se encontraron estructuras asexuales en los síntomas de las hojas colectadas.

La descripción de las manchas coincide con las características reportadas por Buller (1934), de esta manera se puede decir que estos síntomas son causados por *M. citricolor*, agente causal del ojo de gallo en café. Aunado a otras características que abajo se describen.

En general la poca o nula presencia de estructuras asexuales correspondientes al hongo *M. citricolor* en las manchas de las diferentes especies analizadas puede ser debido a que las colectas se realizaron en épocas no lluviosas, y correspondiendo a lo que alude Avelino *et al.* (2007) en un estudio en el que el desarrollo de *M. citricolor* era altamente dependiente de las precipitaciones, mientras que Wang y Avelino (1999) mencionan que en Costa Rica, el pico de infección ocurre en septiembre-octubre coincidiendo con los meses de mayor precipitación, sin duda esta condición climática limita la aparición de estas estructuras.

En la mayoría de las manchas correspondientes a las cuatro especies de plantas colectadas se observaron estructuras que no correspondían a *M. citricolor*, estas estructuras correspondieron a otras especies fúngicas, las cuales pueden o no ser saprófitos. Respecto a

esto, Buller (1934) menciona que a veces los síntomas dan entrada a otros hongos destructores de tejido que infectan el tejido intermedio. Asimismo, Cristóbal *et al.* (2016) encontró asociación de *Colletotrichum* y *Cercospora* asociados con síntomas de antracnosis en lesiones de hojas, por lo que no cabe descartar la posibilidad de que haya asociación de *M. citricolor* con algún otro patógeno en síntomas de ojo de gallo

Claramente hubo mayor presencia de manchas en las hojas de *C. arabica*, *I. tomentella* y *E. japonica* en comparación con las de gardenia, siendo esto un indicativo de que el ataque a gardenia del hongo no es intenso, mientras que en *C. arabica*, *I. tomentella* y *E. japonica*, puede ser una enfermedad con potencial de provocar daño a más del 50 % del tejido foliar de una hoja, esto tomando en cuenta que las colectas fueron en época de poca precipitación, por lo que en los meses de mayor precipitación se puede encontrar un mayor número de síntomas y por tanto mayor daño en las hojas.

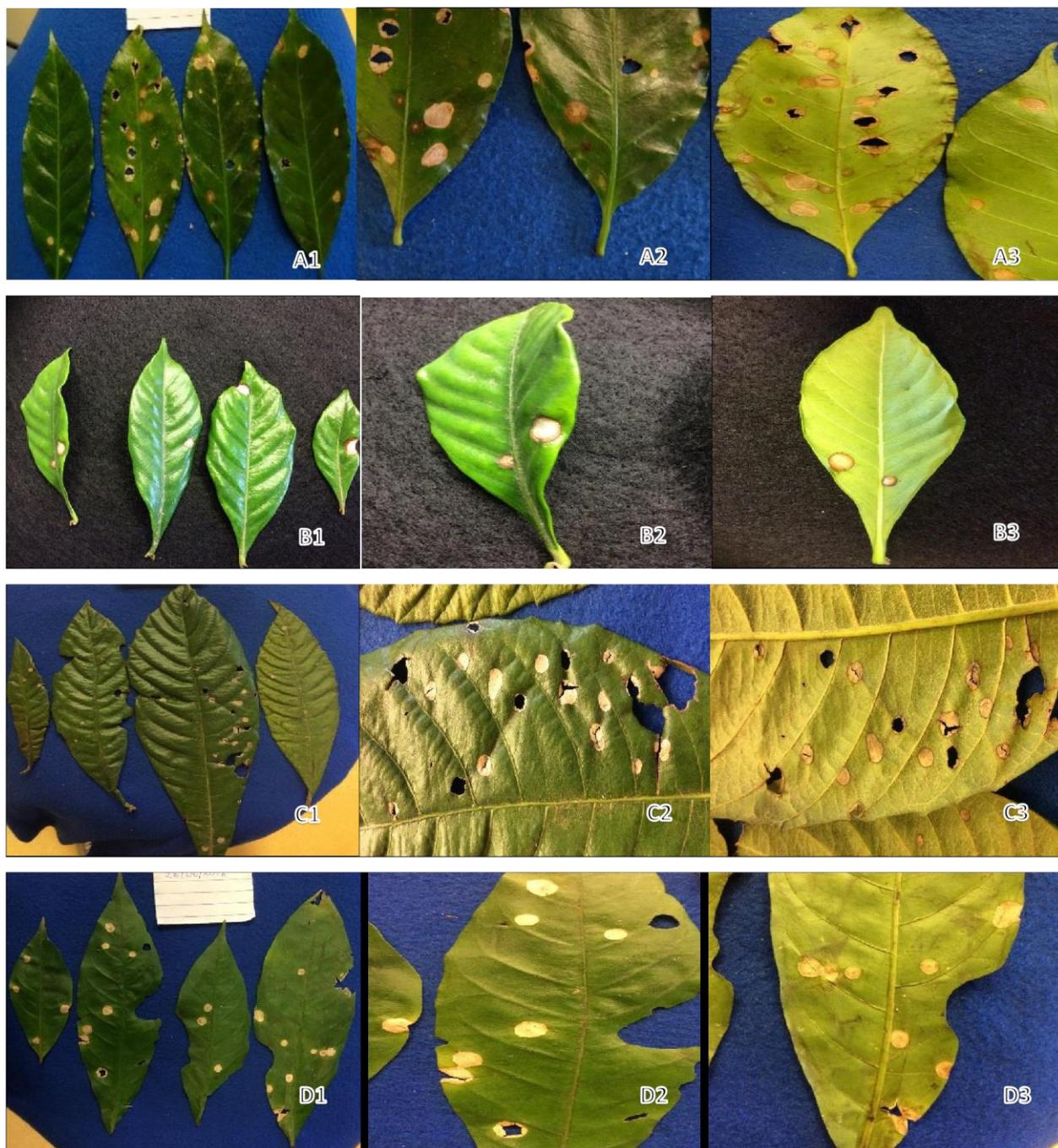


Figura 8. Síntomas sospechosos de *M. citricolor*. (A1-A3) Síntomas en hojas de café. (B1-B3) Síntomas en hojas de gardenia. (C1-C3) Manchas en hojas de nispero. (D1-D3) Síntomas en hojas de árbol.

6.2. Aislamientos obtenidos

De las colectas realizadas se obtuvieron 15 aislamientos correspondientes a *Mycena citricolor*. En el Cuadro 1 se describe el lugar de origen, fecha de colecta, especie vegetal y el número asignado a cada uno de los aislamientos que se utilizaron en la investigación, los cuales fueron guardados en tubo inclinado.

Cuadro 1. Aislamientos obtenidos de las colectas realizadas en la sierra Norte del estado de Puebla el 14 de mayo de 2016.

Número clave	Especie vegetal del que proviene el aislamiento	Lugar de colecta (Municipio)
628	Café	Xicotepec de Juárez
629	Gardenia	Tenango de las flores
630	Gardenia	Tenango de las flores
631	Gardenia	Tenango de las flores
632	Gardenia	Tenango de las flores
633	Gardenia	Tenango de las flores
634	Gardenia	Tenango de las flores
635	Gardenia	Tenango de las flores
636	Gardenia	Tenango de las flores
637	Gardenia	Tenango de las flores
638	Gardenia	Tenango de las flores
639	Gardenia	Tenango de las flores
640	Gardenia	Tenango de las flores
641	Gardenia	Tenango de las flores
642	Café	Xicotepec de Juárez

No se obtuvieron aislamientos correspondientes al árbol y níspero, esto puede ser atribuido a que sobre los síntomas no se observaron estructuras correspondientes a *M. citricolor*, pero si había presencia de otras estructuras, lo que da indicios de asociación de algún otro hongo. En el proceso de siembra *in vitro* se observó el crecimiento de otros hongos, los cuales no fueron

identificados, por lo que pueden ser o no saprofitos. Esto indica la necesidad de definir la forma correcta de aislar a *M. citricolor* de síntomas que no tienen estructuras asexuales sobre estos, así como la época preferible de colecta.

Cuadro 2. Agrupación de aislamientos obtenidos de *M. citricolor*.

Grupo	Número clave	Tipo de planta del que provino el aislamiento	Característica
1	628	Café	Producción baja de estructuras asexuales
	642	Café	
2	629	Gardenia	Aislamientos obtenidos de basidiocarpo
	630	Gardenia	
	631	Gardenia	
3	634	Gardenia	Aislamientos con alta producción de estructuras asexuales
	635	Gardenia	
	639	Gardenia	
4	641	Gardenia	Aislamientos con producción moderada de estructuras asexuales.
	633	Gardenia	
	636	Gardenia	
	640	Gardenia	
5	632	Gardenia	Aislamientos con producción baja de estructuras asexuales.
	637	Gardenia	
	638	Gardenia	

6.3. Caracterización morfológica

La caracterización morfológica se hizo de manera in vitro con medio de cultivo PDA utilizando los aislamientos 628, 630, 632 y 635 con 4 repeticiones cada uno. Estos tratamientos se mantuvieron en cámara de cultivo con temperaturas de 21-24°C.

Los aislamientos obtenidos se agruparon según características de especie e intensidad de estructuras asexuales, que fue la característica, visualmente, con diferencia entre las colonias (Cuadro 2). De los aislamientos obtenidos de gardenia se obtuvieron cuatro grupos, de esta manera se obtuvieron cinco grupos incluyendo los aislamientos de café.

Los aislamientos de café se diferencian de las de gardenia por la casi nula aparición de estructuras asexuales o basidiocarpos. El basidiocarpo del cual se obtuvieron tres aislamientos se obtuvo espontáneamente de un aislamiento obtenido de una mancha. Los aislamientos de los grupos 3, 4 y 5 se obtuvieron de síntomas de hojas sembradas en PDA, de estos aislamientos se pudo diferenciar cualitativamente la intensidad en la producción de estructuras asexuales, lo que pudo ser el primer paso que lleva a la explicación de la variabilidad genética del hongo.

6.3.1. Características de la colonia

6.3.1.1. Coloración de micelio y reverso de la colonia

La coloración de micelio se caracterizó visualmente 10 días después de la inoculación en punto del hongo *M. citricolor*. Se observó colonias aplanadas de coloración blanca de micelio algodonoso moderado con abundantes agregados superficiales de hifas entrelazadas y margen entero no denso en todas las cajas correspondientes a los cuatro tratamientos evaluados. A los 15 días, visualmente se observó coloración amarilla intensa en el área central de los tratamientos 635 y 632 así como en áreas difusas y en las orillas. Esto fue debido a la aparición abundante de estructuras asexuales. Esta coloración siguió aumentando en cuanto al área de la colonia al pasar los días, llegando a abarcar el área total de las cajas en el tratamiento 635. En los tratamientos 630 y 628 no se notó cambio de coloración a simple vista a los 15 días, mientras que a los 20 días se percibió un ligero cambio de color en el tratamiento 630, indicativo de que, si hubo aparición de estructuras asexuales después de 15 días, mientras que el tratamiento 628 no se notó cambio de coloración a simple vista.

Respecto a la aparición de áreas dispersas amarillentas, indicando la aparición de estructuras asexuales en esas áreas, sin que haya una distribución uniforme de las estructuras sobre todo el micelio desarrollado. Buller (1934) reporta crecimiento de zonas estériles, con patrón anillado (círculos concéntricos) de crecimiento, las cuales se desarrollan durante la noche, y las zonas fértiles que son capaces de producir gemíferos (asexual) que se forman durante el día por el estímulo de luz. Lo anterior pudo explicar la aparición no uniforme de estructuras asexuales. Sin embargo, en las observaciones del experimento no se notó un patrón de crecimiento de las zonas que fueron capaces de producir estructuras asexuales en comparación con Buller

(1934) en el que se notaron zonas concéntricas alternadas. Lo obtenido en este estudio conlleva a que, aparte del estímulo de luz, las zonas fértiles de micelio en que se producen estructuras asexuales también pueden ser aleatorias.

A pesar de los cambios de coloración que se percibieron visualmente, en vista frontal, a los 15 y 20 días después de la inoculación en punto, el micelio que se pudo observar por debajo de las estructuras asexuales que tuvo una coloración blanca, por lo que hasta los 20 días no hay cambio de coloración en el micelio producido en el hongo *M. citricolor* sobre medio de cultivo PDA (Figura 10: A-E).

El color del reverso de la colonia fue blanco, esto debido a que el micelio del hongo es blanco y este no cambió al pasar los días. A los diez días después de la inoculación en punto se notó coloración ligeramente blanca, mientras que a los 20 días la coloración fue totalmente blanca, esto indica que el micelio del hongo o las estructuras asexuales no sufren alteraciones de color o incluso no secretan algún tipo de coloración.

Esta característica no se ha reportado en los diferentes estudios que se han hecho sobre *M. citricolor*, pero, sin duda es una característica que puede ser usada para la identificación cualitativa.

6.3.1.2. Forma de micelio

La forma de micelio se caracterizó visualmente a los 10 días de la inoculación en punto. Se observó, de acuerdo a la terminología de Crous *et al.*, (2009), una forma plana o difundida de la colonia en vista lateral. Se observó una forma de crecimiento micelial interno radial, algodonosa, moderada y densa. No hubo diferencias visuales entre los cuatro tratamientos, todos tuvieron el mismo patrón de crecimiento.

A los 20 días de evaluación se notaron diferencias entre las colonias debido a que en algunas había presencia de estructuras asexuales, lo cual de alguna manera disminuyó el crecimiento micelial lateral, ya que hubo enfoque en desarrollar estructuras asexuales. En los tratamientos 635 y 630 hubo crecimiento radial algodonoso ligeramente marcado, mientras que en los tratamientos 628 y 632 el crecimiento radial algodonoso estuvo muy marcado; la forma de crecimiento mencionada en los últimos dos tratamientos se debe a que solo hay crecimiento micelial, por lo que la producción de este es abundante; sin embargo, en los tratamientos 635

y 630 las hifas de micelio formaron estructuras asexuales; por lo que la producción de micelio se limitó y/o disminuyó, asimismo las estructuras asexuales cubrieron áreas totales de la colonia, de tal manera que la forma de crecimiento del micelio no pudo apreciarse bien.

Asimismo, se observó la presencia de fíbulas en el micelio (Figura 9), lo cual es una característica más que puede servir para la identificación del hongo.

El diámetro de las colonias fue de una medida de 3.6 x 3.7 cm a los 6 días hasta de 6.5 a 6.7 a los diez días, mientras que a los 12 días se notó un llenado completo de caja en los 4 tratamientos evaluados pero el tratamiento 630 tuvo un crecimiento de micelio más lento en comparación de los demás tratamientos.

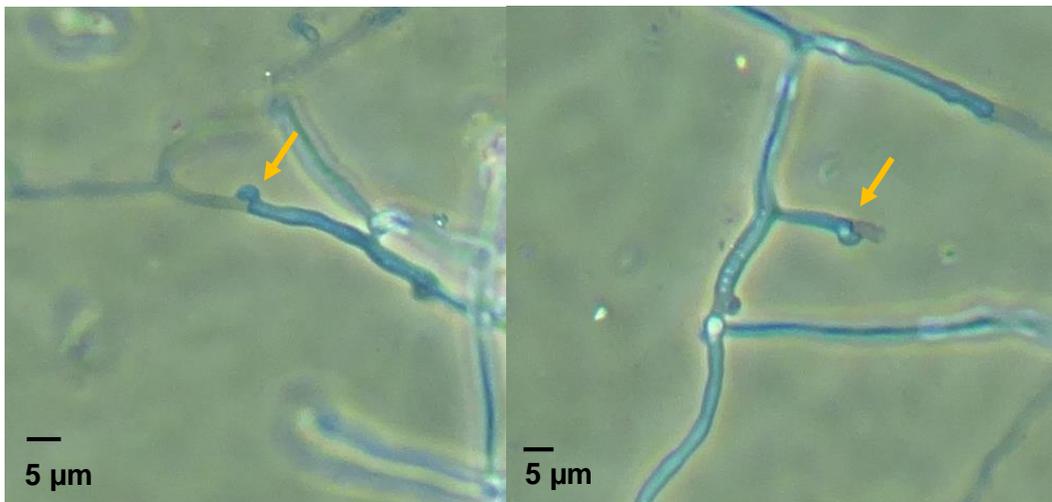


Figura 9. Fíbulas presentes en micelio de *M. citricolor* creciendo sobre medio de cultivo PDA, barra=5 μm .

La característica de forma del micelio distingue a los tratamientos evaluados, por lo que puede tomarse como referente para diferenciar variabilidad en el hongo.

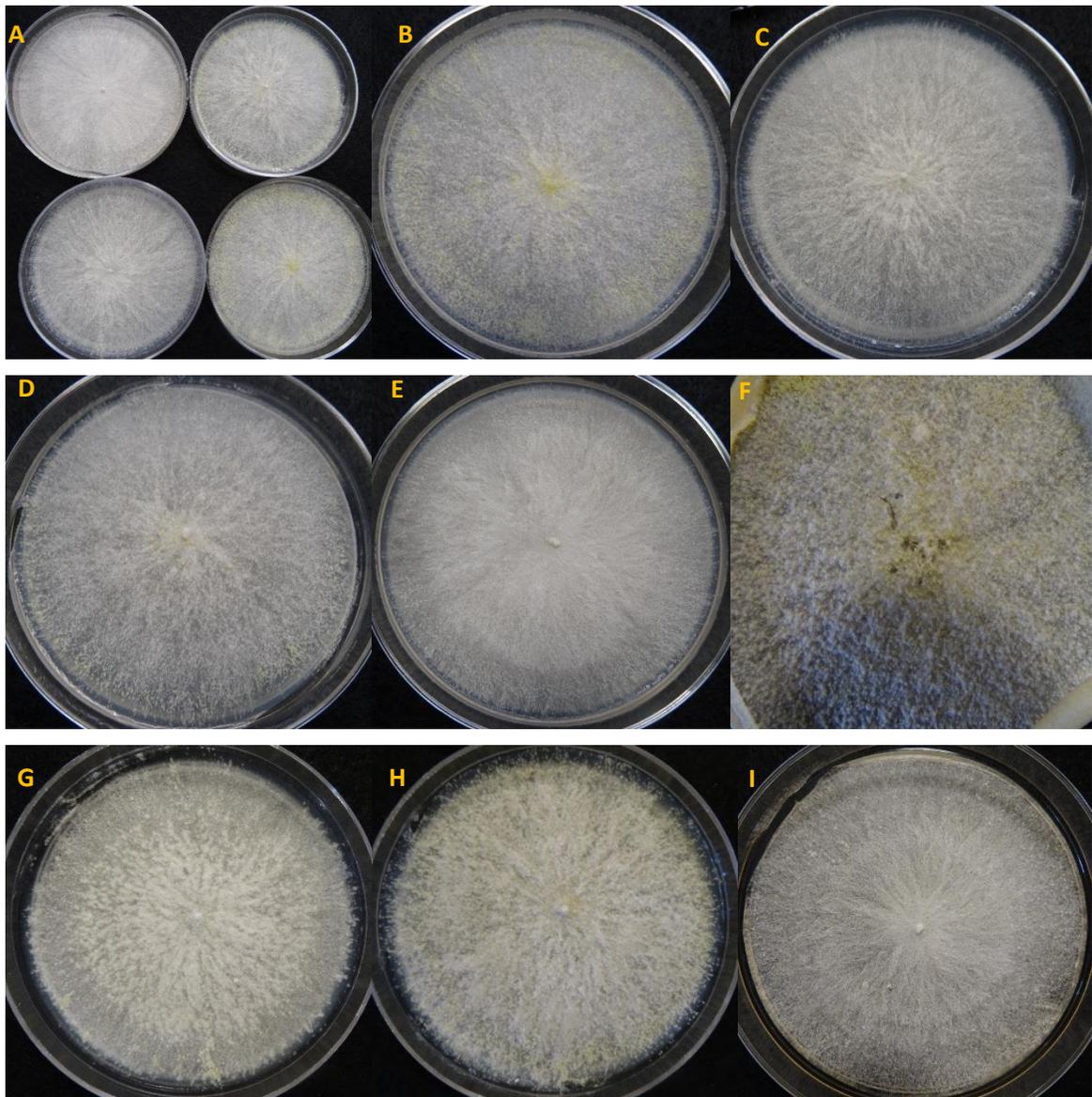


Figura 10. Crecimiento micelial a los 20 días: (A) Comparación entre los tratamientos 628, 632, 630 y 635, (B) Tratamiento 635, (C) Tratamiento 632, (D) Tratamiento 630, (E) Tratamiento 628. Crecimiento micelial a los 30 días (F) Tratamiento 635, (G) Tratamiento 632, (H) Tratamiento 630, (I) Tratamiento 628.

6.3.2. Características de estructuras asexuales

En los diferentes aislamientos se obtuvieron estructuras asexuales, aunque visualmente en diferentes cantidades tanto en café como en gardenia. En los aislamientos de gardenia el tratamiento 632 fue el que menor cantidad de estructuras asexuales presentó, mientras que el tratamiento 635 produjo abundantes estructuras y con una intensidad de color mayor en

comparación del tratamiento 632 y 630. El tratamiento 630 tuvo producción de mediana intensidad comparándolo con los números 632 y 635. En el tratamiento 628, correspondiente al aislamiento en café, no se notó presencia de estructuras asexuales desarrolladas completamente, dichas estructuras pudieron observarse mediante la ayuda de un estereoscopio; el crecimiento fue similar al del tratamiento 632.

Las estructuras asexuales que se produjeron fueron de color amarillento, aunque en diferentes intensidades entre tratamientos; el tratamiento 635 mostro un color más intenso que el 630, siendo que este último mostro un color amarillo claro. Visualmente el tamaño fue similar en los tratamientos 630 y 635. La forma de las estructuras se observa similar en ambos tratamientos, tratándose de un tallo, el cual en la base tiene, aparentemente, un ancho mayor que el ancho de la parte superior, habiendo una diferencia mayor entre más largas sean las estructuras; se observa una estructura similar a lo que varios autores mencionan como gema o cabeza, la cual se encuentra sujeta a la parte superior del tallo.

El crecimiento de las estructuras asexuales, en todos los tratamientos, se observó inicialmente por la agregación de micelio en puntos pequeños sin tener elevación o alguna forma similar. Posteriormente en estos puntos aparecieron pequeñas estructuras de color amarillo que se fueron alargando, estas estructuras primeramente van ensanchándose a medida que crecen hasta llegar a tomar la forma de una estructura asexual típica observada en los tratamientos. Regularmente estas estructuras comienzan apareciendo en el centro de la colonia, sin embargo, se observó que también es común que aparezcan en las orillas a pesar de que no exista presencia de estas en áreas anteriores a la orilla.

Las características de las estructuras observadas coinciden con lo reportado por Buller (1934), el cual describe cualitativa y cuantitativamente las características asexuales de *M. citricolor* (syn. *Omphalia flavida*).

La presencia de estructuras asexuales se notó a los 10 días después de la siembra, esto en el tratamiento 635. Por lo que con esta observación se da paso a afirmar que este tratamiento tiene un crecimiento acelerado e intenso, de tal manera que puede resultar con mayor eficiencia infectiva en el cultivo de interés.

Se observaron dos tipos de estructuras asexuales, aquella que maduraron (Figura 11, F y G) y presentaron una curvatura mencionada por Buller (1934) y aquellas que no llegaron a madurar y a presentar a curvatura (Figura 11, E), teniendo a simple vista un largo menor que aquellas que si maduraron.

La estructura asexual madura consistió de un tallo amarillento claro, este tallo se observó con tendencia a ser más delgado a medida que se acercaba a la parte de inserción de la gema (propágulo), teniendo así un ancho inferior y un ancho superior diferentes, también se notó una zona bulbosa en la base del tallo en medio de cultivo (Figura 11-F), Buller (1934) no menciona esta parte creciendo en medio de cultivo, lo que Buller (1934) ilustra en Figura 4 es el corte transversal de la hoja con la mancha donde se desarrolló la estructura asexual. En aquellas estructuras provenientes de manchas se notó una zona rectangular más o menos definida (Figura 11-E), diferenciándose por tener un ancho ligeramente mayor, y una cabeza amarillenta.

Aquellas estructuras asexuales no maduras tuvieron un tallo amarillento, se notó un tallo con menos diferencia entre el ancho inferior y superior, también se observó una base bulbosa y una cabeza amarillenta.

Se registró la observación de hifas infectivas (Figura 11, H) alrededor de las cabezas sin uniformidad en el acomodo de estas.

Las características observadas y reportadas en este estudio entran dentro del rango reportado por Buller (1934) (Cuadro 3), el cual hace un estudio morfológico del hongo en cuestión, de esta manera se concluye que, morfológicamente, la especie evaluada en el presente trabajo corresponde a la especie *M. citricolor*.

Buller (1934) no reporta alguna característica de base bulbosa del tallo, que puede presumirse es la zona de anclaje de la estructura al medio o sustrato donde se encuentra creciendo el hongo, por lo que este sería el primer reporte morfológico de esta característica.

Cuadro 3. Medida de las estructuras asexuales de *M. citricolor* maduras y no maduras.

Estructuras-maduras (μ/mm)			Buller (1934)/mm	
Medio de cultivo PDA	Largo	Ancho	Largo	Ancho
Propágulo apical (diáspora, gema)	160-455 / 0.16-0.455	126-432 (-435) / 0.126-0.432 (-0.435)	0.4	0.36
Hifas infectivas	(1-) 1.35-25 (-53) / (0.001-) 0.00135-0.025 (-0.053)		0.05-0.1	
Estípite (tallo)	530-2214 (-2251) / 0.53-2.214 (-2.251)		(-2.0)	
Base		85-212 (-290) / 0.085-0.212 (-0.290)	(-0.12)	
Ápice		35-182 (-225) / 0.035-0.182 (0.225)	(0.05)	
Bulbo basal del tallo	70-304 (-325) / 0.07-0.304 (-0.325)	70-325 (-405) / 0.07- 0.325 (-0.405)		
Estructuras inmaduras (μ/mm)				
Propágulo apical (diáspora, gema)	175-290 (-305) / 0.175-0.290 (-0.305)	150-282 (-285) / 0.150-0.282 (-0.285)		
Hifas infectivas	----	-----		
Estípite (tallo)	170-470 (-500) / 0.170-0.470 (-0.5)			
Base		85-254 (-290) / 0.085-0.254 (-0.29)		
Apice		65-201 (-225) / 0.065-0.201 (-0.255)		

Bulbo basal del tallo (medio)	70-295 (-325) / 0.070-0.295 (-0.325)	75-325 / 0.075-0.325		
-------------------------------	---	-------------------------	--	--

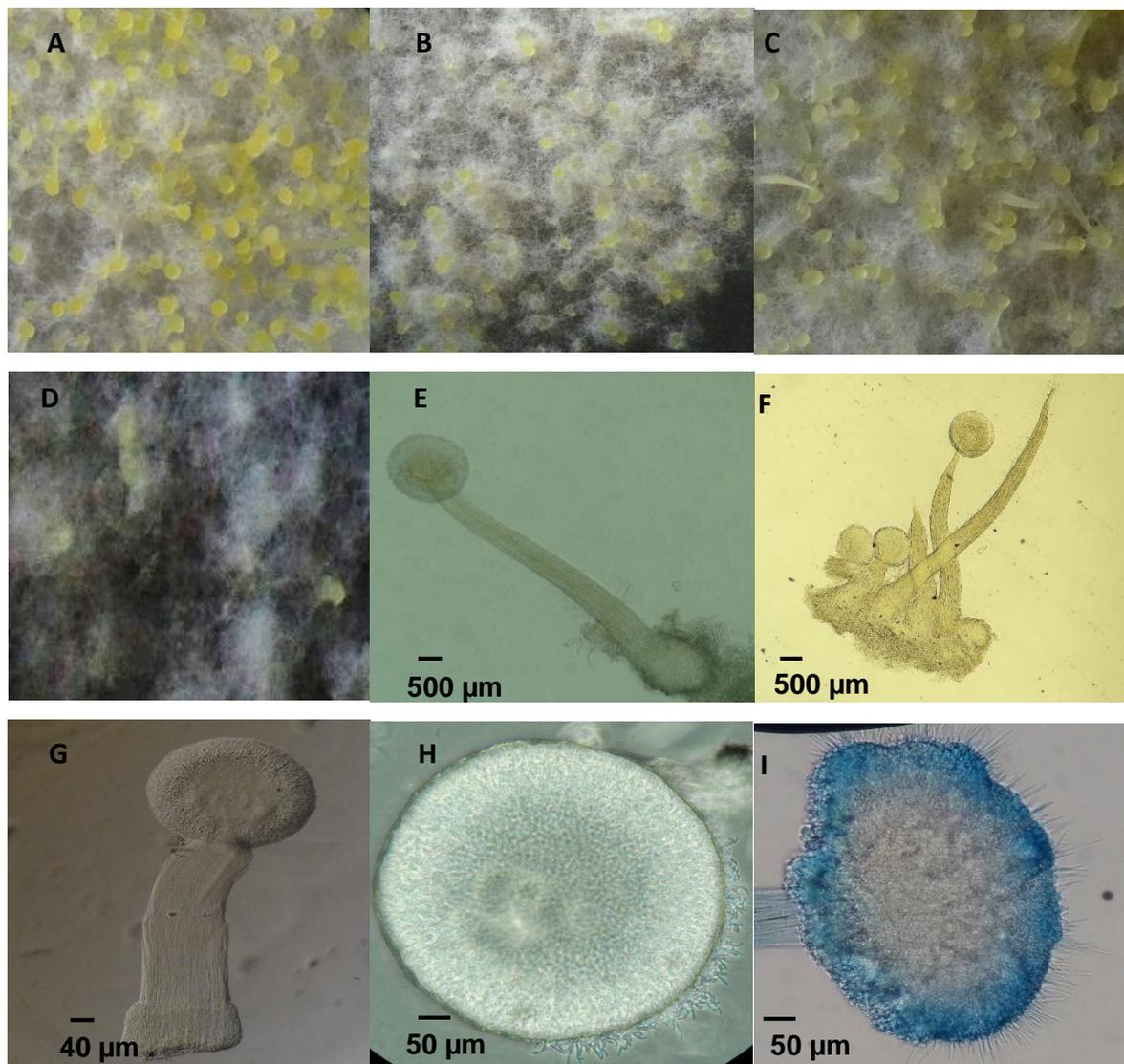


Figura 11. Estructuras asexuales en crecimiento *in vitro* sobre medio de cultivo PDA a los 20 días. (A) Tratamiento 635. (B) Tratamiento 632 (Solo micelio en agregaciones de hifas flojas). (C) Tratamiento 630. (D) Tratamiento 628 (Primordios de estructuras asexuales). (E-F) Estructura asexual madura, barra=500 µm. (G) Estructura asexual no madura proveniente de mancha, barra=40 µm. (H-I) Vista de hifas infectivas en periferia del propágulo en posición superficial apical, barra=50 µm.

6.3.3. Características de estructuras sexuales (basidiocarpos)

De los aislamientos obtenidos, solo se obtuvo una estructura que visualmente correspondió a un basidiocarpo, este se produjo sobre medio de cultivo PDA en una siembra correspondiente a una mancha de gardenia, el basidiocarpo apareció sobre el tejido vegetal sembrado en medio de cultivo PDA y no se notó presencia de alguna estructura parecida a ésta en los demás aislamientos (Figura 12).

El basidiocarpo observado se caracterizó por tener una altura mayor a las estructuras asexuales, al menos tres veces mayor. Asimismo, el ancho del tallo se observó mayor y con mayor firmeza.

En los cultivos solo se obtuvo un basidiocarpo, del cual se obtuvo un aislamiento, produciendo nuevas estructuras asexuales. Por lo que con esto se pudo decir que las dos estructuras corresponden a la misma especie. La poca cantidad de basidiocarpos se debe a que no hubo inducción alguna, sino que se esperó a que se produjeran de manera espontánea, por lo que la poca producción de estos coincide con lo mencionado por Salas y Hancock (1972) que mencionan que en algunos hospedantes los gemíferos (asexual) y estados sexuales de *M. citricolor* son observados, pero en muchos de ellos únicamente el estado de gemífero ha sido observado.



Figura 12. Estructura sexual correspondiente a un basidiocarpo (pileo cerrado) de color amarillo claro a blanco al madurar, todavía inmaduro, observado sobre una mancha sembrada en medio de cultivo PDA.

6.4. Identificación molecular

Las secuencias de gardenia mostraron similitud al ser alienadas en DNASTAR (2001), asimismo las de café, lo cual da referencia de que se pueden utilizar cualquiera de las dos regiones para secuenciar este hongo. Sin embargo, al alinear la secuencia de café y gardenia se muestra una sola diferencia, esto indica que las dos corresponden a la misma especie presentando una ligera mutación (en un solo nucleótido), dando pauta a la deducción de diversidad genética del hongo en cuestión.

Cuadro 4. Datos de secuencias analizadas con DNASTAR (2001) versión 3.0 y comparadas en el BLAST del GenBank NCBI.

Aislamiento	ITS	ND*	BLAST – GenBank NCBI: Identidad (%)**		
	rDNA		uncultured <i>Mycena</i> JF519455***	<i>Mycena</i> CLONE JF519396	<i>Mycena pura</i> JF908403
	Bp				
624-1-4 (Gardenia, ab. asexual)	670	1 g/t	71	71	74.5
624-5-4	681	1 g/t	71.4	71.4	74.5
625-1-4 (cafeto)	672	1 a/c	71.2	71.2	74.6
625-5-4	696	1 a/c	72.1	72.1	74.9
630-5-4 (Gardenia, basidiocarpo blanco)	698	-	71.9	71.9	74.8

*Número de nucleótidos

**Determinado con el software DNASTAR Versión 3

***Numero de accesoión en NCBI (National Center of Biotechnology Information) GenBank.

g, Glicina / (en lugar de) t, Tiamina a,

Adenina / (en lugar de) c, Citosina

Como se puede observar en el Cuadro 4, la sola diferencia entre café y gardenia se da en un par de bases, estas variaciones son típicamente conocidas como SNPs (Single Nucleotide

Polymorphism) por sus siglas en inglés, estos son posiciones singulares de pares de bases en el DNA genómico en el que existen diferentes alternativas de secuencias (alelos) en individuos normales de algunas poblaciones, en la que el alelo menos frecuente tiene una abundancia de 1% o más, los SNPs son el polimorfismo que ocurre entre las muestras de DNA con respecto a una base única (Jehan and Lakhnpaul., 2006).

Los SNPs constituyen los marcadores moleculares más abundantes en el genoma y están ampliamente distribuidos a través de los genomas aunque su ocurrencia y distribución varía entre las especies (Agarwal *et al.*, 2008), por lo que en el caso de *M. citricolor* es necesaria una investigación más amplia sobre este caso para ver la ocurrencia de este fenómeno y ver los efectos que esto tiene pues Jehan *et al.* (2006), menciona que los SNPs en las regiones de codificación (cSNPs) puede tener importancia funcional si el cambio de aminoácidos resultante causa un fenotipo alterado. Esto puede explicar las diferencias fenotípicas notadas entre los aislamientos secuenciados en las evaluaciones que se realizaron. Será interesante y de gran utilidad relacionar este polimorfismo con los efectos de infección y fenotipo del hongo, ya que como Grünwald *et al.* (2016) indica, la genómica poblacional tiene como objetivo descubrir los mecanismos genéticos subyacentes a los fenotipos asociados a rasgos adaptativos, como la patogenicidad, virulencia, resistencia a los fungicidas y especialización del huésped, ya que en las secuencias genómicas un gran número de polimorfismos de un solo nucleótido están fácilmente disponibles en múltiples individuos de la misma especie.

Así, entre las secuencias de gardenia y café, puede concluirse que las dos pertenecen a la misma especie de *Mycena*, sin embargo, no cabe descartar que esta diferencia en un par de nucleótidos es la que provoca una variabilidad en el comportamiento de este hongo, en cualquiera de sus características.

El porcentaje máximo de alineamiento de las secuencias muestra realmente poca coincidencia para asegurar que las secuencias pertenecen a las especies que arroja el GenBank, sin embargo, la posibilidad de que el género coincida es positiva, de esta manera se asegura que los aislamientos secuenciados pertenecen al género *Mycena*.

El no haber coincidencia de las secuencias de los aislamientos con la especie *M. citricolor* es debido a que en la base de datos de GenBank no hay una accesión depositada

correspondiente a esta especie. Al no encontrar la especie *M. citricolor* reportada en el GenBank se concluye, sumado a la identificación morfológica, que la especie evaluada, refiriéndose a *M. citricolor*, en el presente estudio, corresponde a la misma en el caso de gardenia y café, por lo que gardenia es un hospedante alternativo de *M. citricolor*, obteniendo así las primeras secuencias de esta especie a depositar en el GenBank.

6.5. Bioluminiscencia del hongo

La luminiscencia del hongo se observó dos veces. Una ocasión teniendo como medio de crecimiento PDA y otra en medios de cultivo Pseudomona-Agar (PA; Fluka Analytical, U. S. A).

Se observó luminiscencia positiva del micelio. En los cultivos de PDA se notó una leve luminiscencia (Fig. 13-A), mientras que en medio PA se observó mayor luminiscencia (Figura 13-C, D), sin embargo, el crecimiento del micelio fue mínimo. El poco crecimiento de micelio en PA puede deberse a que este medio se usa exclusivamente para bacterias y se usa para evaluar luminiscencia. Mientras que en hongos no se ha corroborado la eficacia para resaltar luminiscencia.

Cabe mencionar que cuando se realizó la observación no había presencia de estructuras asexuales, lo que beneficia la poca luminiscencia que se nota.

La luminiscencia es una característica importante para la identificación cualitativa del hongo, tanto en el laboratorio como en el campo, de esta manera Sequeira (1958) utilizó esta característica para identificar al hongo en síntomas que no tenían las gemas que eran sospechosas de ser de *M. citricolor* puesto que, como es mencionado por él, es el único organismo causante de manchas foliares que se conoce es luminiscente. Por lo anterior, esta característica de luminiscencia en el micelio puede ser utilizada para la identificación de esta especie en crecimiento *in vitro* en laboratorio, esto ya corroborado por Buller (1934) en 1925 que notó la emisión de luz de un cultivo del hongo contenido en un matraz Erlenmeyer en laboratorio.

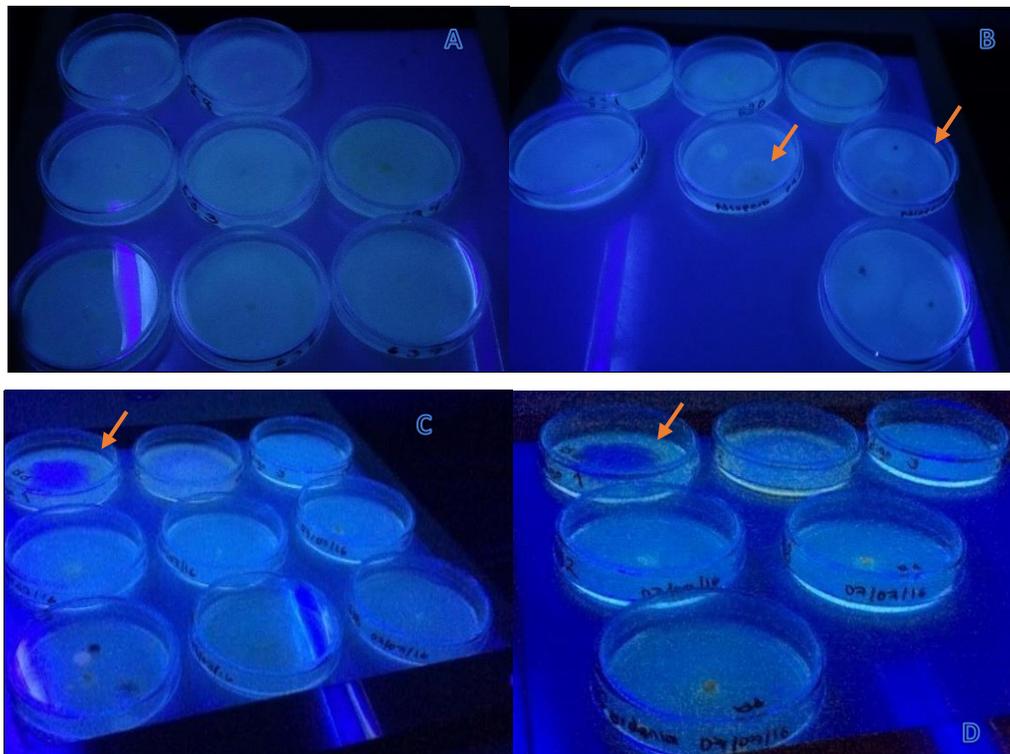


Figura 13. (A) Bioluminiscencia de *M. citricolor* en medio de cultivo PDA. (B) Bioluminiscencia de *M. citricolor* y aislamientos de níspero, las tres primeras cajas de izquierda a derecha corresponden a *M. citricolor*, las demás a níspero. (C-D) Bioluminiscencia de aislamientos de *M. citricolor* en medio de cultivo PA comparado con un aislamiento testigo, de izquierda a derecha la primer caja señalada con una flecha corresponde al tratamiento testigo.

6.6. Pruebas de patogenicidad

Los cuatro aislamientos evaluados fueron patogénicos en *C. arabica* y *G. jasminoides*, los síntomas se presentaron en ambas especies a los 12 días después de la inoculación.

No se notaron lesiones de algún tipo en las inoculaciones sin herida tanto en *C. arabica* y *G. jasminoides*. En las inoculaciones con herida se notaron lesiones parecidas a las de ojo de gallo, las cuales fueron redondas. Las manchas en gardenia (Figura 14) fueron café grisáceo con margen rojizo que después se vuelven café claro, se notó que el cambio a colores claros se relacionaba con una tendencia de destrucción del tejido vegetal de la mancha; las manchas midieron 0.3-1.7 x 0.2-1.8 cm en la primera inoculación (Figura 14 A-C) y de 0.3-1.2 x 0.3-1 cm en la segunda inoculación (Figura 14 E-F). En la primera inoculación se hallaron estructuras

asexuales en la mayoría de las manchas, mientras que en la segunda solo se notó presencia de micelio color blanco.

En café (Figura 14 G-H) las manchas fueron café claro a blanquizco con margen delimitado de color café a café rojizo, estas midieron de 0.2-0.8 x 0.3-0.9 cm, no hubo presencia de estructuras asexuales, pero sí de micelio blanco en el envés de las manchas.

La presencia de estructuras asexuales en la primera inoculación de gardenia puede deberse a que las hojas se destaparon a los 20 días, por lo que tuvieron mayor humedad, que es una condición para que las estructuras sexuales aparezcan, lo que explica el grado de daño, que fue mayor que en la segunda inoculación.

Se hicieron aislamientos de las manchas presentadas, en gardenia se obtuvo crecimiento correspondiente al hongo inoculado, por lo que se corrobora el agente causal. En café no se obtuvo crecimiento, por lo que es necesario repetir inoculaciones, pudiendo destapar las hojas después de más de 10 días después de la inoculación, de esta manera se puede detectar la mejor metodología a fin de que se obtenga crecimiento del hongo.



Figura 14. (A-C) Manchas en hojas con herida de *G. jasminoides* a los 22 días después de la primera inoculación. (D) Hoja de *G. jasminoides* inoculada sin herida a los 22 días después de la primera inoculación. (E-F) Manchas en hoja de gardenia a los 38 días después de la segunda inoculación. (G-H) Manchas en hojas con herida de *C. arabica* a los 38 días después de la inoculación.

7. CONCLUSIONES

Morfológica y molecularmente la especie descrita en los aislamientos obtenidos correspondieron a *Mycena citricolor*.

Gardenia es un hospedante alternativo de *M. citricolor* en la Sierra Norte de Puebla, lo que representa un potencial de infección de ojo de gallo para el cultivo de café.

No es recomendable sembrar gardenia en cafetales ya que es una fuente de inóculo de *M. citricolor*.

Se obtuvieron aislamientos de las manchas foliares de café y gardenia, mas no de níspero y árbol. Sin embargo, los síntomas presentados en estos dos últimos corresponden a los causados por *M. citricolor* en cafeto por lo que no cabe descartar que estos son hospedantes alternos del hongo en cuestión.

Las secuencias correspondientes al estado asexual de *M. citricolor* obtenidos de aislamientos de manchas en gardenia y cafeto mostraron polimorfismo por diferencia de un solo nucleótido respectivamente y la secuencia del basidiocarpo no mostró polimorfismo.

8. LITERATURA CITADA

- Agarwal, M., Shrivastava, N., and Padh, H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* 27: 617-631. DOI: 10.1007/s00299-008-0507-z
- Avelino, J., Cabut, S., Barboza, B., Barquero, M., Alfaro, R., Esquivel, C., and 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: 1532-1542. DOI: 10.1094/PHYTO-97-12-1532
- Bermudes, D., Gerlach, V. L., and Nealson, K. H. 1990. Effects of culture conditions on mycelial growth and luminescence in *Panellus stypticus*. *Mycologia* 82: 295-305. DOI: 10.2307/3759900
- Buller, R. A. H. 1934. *Omphalia flavida*, a gemmiferous and luminous leaf-spot fungus. *Researches on Fungi* 6: 397-442
- CABI. 2016. *Mycena citricolor* (American leaf spot of coffee). Centre for Agriculture and Biosciences International. <http://www.cabi.org/cpc/datasheet/35243>. Consultado el 06 de mayo de 2016.
- CENICAFE. 2011. Ojo de gallo o gotera del cafeto *Omphalia flavida*. Centro Nacional de Investigación de Café. Chinchiná, Caldas, Colombia.
- Cristóbal-Martínez, A. L., Yáñez-Morales, M de J., Solano-Vidal, R., Segura-León, O., and Hernández-Anguiano, A. M. 2016. Diversity of *Colletotrichum* species in coffee (*Coffea arabica*) plantations in Mexico. *European Journal of Plant Pathology*. DOI: 10.1007/s10658-016-1029-0
- Crous, P. W., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z., and Samson, R. A. (Eds.). 2009. Fungal Biodiversity. CBS, Laboratory Manual Series. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. The Netherlands.

- Desjardin, D. E., Oliveira, A. G., and Stevani, C. V. 2007. Fungi bioluminescence revisited. *Photochemical & Photobiological Sciences* 7: 170-182. DOI: 10.1039/B713328F
- Desjardin, D. E., Perry, B. A., Lodge, D. J., Stevani, C. V., and Nagasawa, E. 2010. Luminescent *Mycena*: new and noteworthy species. *Mycologia* 102: 459-477. DOI: 10.3852/09-197
- EPPO. 2016a. *Mycena citricolor* (MYCECI). (B) *Mycena citricolor* (MYCECI), Distribution. EPPO. Online: <https://gd.eppo.int/taxon/MYCECI>. Consultado el 05 de mayo de 2016
- EPPO. 2016b. *Mycena citricolor* (MYCECI), Distribution. EPPO. Online: <https://gd.eppo.int/taxon/MYCECI/distribution>. Consultado el 05/05/2016
- Escamilla, P. E. 1993. El Café Cereza en México: tecnología de la producción. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- FAOSTAT. 2016. Direction of Statistics: Production. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics. http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/S. Consultado el 26 de agosto de 2016.
- Farr, D. F., and Rossman, A. Y. 2016. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. <http://nt.ars-grin.gov/fungaldbases/>, consultado el 26 de agosto de 2016.
- Fawcett, G. L. 1915. Fungus diseases of Coffee in Porto Rico. Porto Rico Agricultural Experiment Station. Bull. 17: 11.
- French, E. R. y Hebert, T. T. 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. IICA. San José, Costa Rica.
- Gaitan, A. L., Cristancho, M. A., Castro Caicedo, B. L., Rivillas, C. A., and Gómez, G. C. 2015. Compendium of Coffee Diseases and Pests. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Gichuru, E. K., Agwanda, C. O., Combes, M. C., Mutitu, E. W., Ngugi, E. C. K., Bertrand, B.

and Lashermes, P. 2008. Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea arabica*. Plant Pathology 57: 1117-1124. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2008. 01846.x

Granados Ramírez, R., Medina Barrios, M., and Peña Manjarrez, V. 2014. Variación y cambio climático en la vertiente del Golfo de México: Impactos en la cafecultura. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 5: 473-485.

Grünwald, N. J., McDonald, B. A., and Milgroom, M. G. 2016. Population genomics of fungal and oomycete pathogens. Annual Review of Phytopathology 54: 323-346. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080614-115913

ICO. 2016a. Historia del café (International Organization of Coffee). (http://www.ico.org/ES/coffee_storyc.asp. Consultado el 05 de mayo de 2016

ICO. 2016b. Total production by all exporting countries (International Organization of Coffee). <http://www.ico.org/prices/po-production.pdf>. Consultado el 05 de mayo de 2016

Jehan, T., & Lakhanpaul, S. 2006. Single nucleotide polymorphism (SNP)-methods and applications in plant genetics: a review. Indian Journal of Biotechnology 5: 435.

Julca, A., Bello, S., Cruz, R., Borjas, R., and Gamboa, R. 2015. Efecto de seis fungicidas sobre el crecimiento *in vitro* de *Mycena citricolor* (Berk & Curt). Saber y Hacer 2: 9-16.

Kranz J., Schmutterer, H and Koch, W. 1977. Diseases, Pests and Weeds in Tropical Crops. John Wiley & Sons. Germany.

Lodge, D. J. 2001. Diversidad Mundial y Regional de Hongos. Enfoques contemporáneos para el estudio de la biodiversidad. Instituto de Biología, UNAM, México.

McKnight, K. H. and McKnight, V. B. 1987. A Field Guide to Mushrooms: North America (Vol. 34). Houghton Mifflin Harcourt. USA.

Miller, O., K. 1984. Mushrooms of North America. E. P. Dutton, Inc. New York.

Mycobank. 2016. *Mycena citricolor*. Online:

<http://www.mycobank.org/name/Mycena%20citricolor&Lang=Eng>, consultado el 26 de agosto de 2016

Oliveira, A. G., Carvalho, R. P., Waldenmaier, H. E., & Stevani, C. V. 2013. Bioluminescência de fungos: distribuição, função e mecanismo de emissão de luz. *Quim. Nova* 36: 51.

Osorio, N. 2002. *The global coffee crisis: A threat to sustainable development*. London, UK: International Coffee Organization.

Piepenbring, M. 2015. *Introduction to Mycology in the Tropics*. American Phytopathological Society. St. Paul, MN.

Rao, D. V., and Tewari, J. P. 1988. Suppression of the symptoms of American leaf spot of coffee with calcium hydroxide. *Plant Dis.* 72:688-690. DOI: 10.1094/PD-72-0688

Regalado, O. A. y Villanueva, M. A. 1990. Enfermedades del Cafeto. En: *El Cultivo del Cafeto en México*. INMECAFE.

Salas, J. A., & Hancock, J. G. 1972. Production of the perfect stage of *Mycena citricolor* (Berk. and Curt.) Sacc. *Hilgardia* 41: 213-234.

SENASICA. 2014. Ojo de gallo (*Mycena citricolor* Berkeley). Dirección General de Sanidad Vegetal - Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México, D. F. Ficha Técnica 49.

Sequeira, L. 1958. The host range of *Mycena citricolor* (Berk. & Curt.) Sacc. *Turrialba* 8:136147

SIAP. 2016. Cierre de la producción agrícola por cultivo 2014. Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera, México, D.F. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-laproduccion-agricola-por-cultivo/>. Consultado el 05 de mayo de 2016.

Shimomura, O. 2012. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*, Revised Edition. World Scientific, Singapore.

Stanley, P. C. 1920. *Trees and shrubs of Mexico*. Smithsonian Institution, Washington D. C.

- Tuite, J. 1969. Plant Pathological Methods. Fungi and Bacteria. Burgess Publishing Company. USA.
- Ulloa, M., y Hanlin, R. T. 2006. Nuevo Diccionario Ilustrado de Mycología. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- USDA/NRCS. 2015a. *Coffea arabica* L. PLANTS Database. United States Department of Agriculture/ Natural Resources Conservation Service. <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=COAR2&display=31> consultado el 24 de noviembre de 2016
- USDA/NRCS. 2015b. *Gardenia jasminoides* Ellis. PLANTS Database. United States Department of Agriculture/ Natural Resources Conservation Service. <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=GAJA&display=31> consultado el 24 de noviembre de 2016
- Vargas, E. 1984. Interacción de tratamiento biológico y químico en el combate del ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en el cafeto. *Agronomía Costarricense* 8: 91-97.
- Waller, J. M., Bigger, M., and Hillocks, R. J. (Eds.). 2007. Coffee Pests, Diseases and their Management. CABI. Wallingford, UK.
- Wang, A. y Avelino, J. 1999. El ojo de gallo del cafeto (*Mycena citricolor*). Pages 243-260 in: *Desafíos de la Caficultura en Centroamérica*. Bertrand, B. and Rapidel, B. (Eds). IICA, San José, Costa Rica.
- Weitz, W. H. J. 2004. Naturally bioluminescent fungi. *Mycologist* 18: 4-5. DOI: 10.1017/S0269915X0400101
- Weitz, H. J., Ballard, A. L., Campbell, C. D., and Killham K. 2001. The effect of culture conditions on the mycelial growth and luminescence of naturally bioluminescent fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 202:165-170. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10798.x 165-170

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis. M.A, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White, (Eds) PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, USA.

Zamarripa-Colmenero, A. y Escamilla-Prado, E. 2002. Variedades de Café en México. Origen, Características y Perspectivas, Huatusco. Universidad Autónoma Chapingo. México.

ANEXO 1. PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO PDA CON PAPA NATURAL

CANTIDAD PARA 200 mL

Ingredientes	Cantidad
Papas blancas peladas	40 g
Dextrosa (J. T. Baker, México)	2.4 g
Agar (HYCEL DE MÉXICO S.A. DE C.V.)	4 g
Agua destilada	200 mL

1. Las papas blancas en pequeños fragmentos se hirvieron por 20 min en un vaso de precipitados agregando los 200 mL de agua destilada. Se separaron los fragmentos de papa del agua.
2. El agua sobrante se colocó en un matraz Erlenmeyer, se agregó la dextrosa y el agar, el matraz se tapó con algodón cubierto de aluminio.
3. La mezcla contenida en el matraz se esterilizo por 20 min a 120 psi en una olla de presión.
4. El medio de cultivo esterilizado se vació en tubos de ensaye, estos tubos se taparon con algodón y se colocaron de manera inclinada para que el medio de cultivo gelidificara también de manera inclinada.