



Evaluación de actinomicetos asociados a *Coffea canephora* como agentes de biocontrol de *Hemileia vastatrix*

José Alberto Espinosa-Pérez, Miguel Salvador-Figueroa, María de Lourdes Adriano-Anaya, Isidro Ovando-Medina, Miguel Salvador-Adriano, Gamaliel Velázquez-Ovalle, Benjamín Moreno-Castillo*

Instituto de Biociencias. Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, Mexico.

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo aislar, seleccionar y evaluar en campo los cultivos crudos quitinolíticos (CCQ) de cepas de actinomicetos asociados a la rizosfera de plantas de café robusta (*Coffea canephora*), para determinar su potencial como agentes de biocontrol de la roya del café (*Hemileia vastatrix*). Muestras de suelo de rizosfera fueron recolectadas en una plantación de café robusta localizada en el municipio de Tapachula, Chiapas, México a 300 msnm. Se obtuvieron 25 aislamientos microbianos, de los cuales 11 fueron cepas de actinomicetos y seis mostraron actividad quitinolítica en medio M9 más quitina coloidal como única fuente de carbono. Las cepas IBC-CcR1 y IBC-CcR6 fueron seleccionadas debido a su mayor actividad quitinasa, por lo que sus CCQ (individualmente o en combinación) fueron evaluados en campo como agentes de biocontrol de la roya en plantas de café robusta. El análisis estadístico indicó similitud entre tratamientos, pero diferencias con el testigo en cuanto al área bajo la curva del progreso de la enfermedad (abcpe). El CCQ de las cepas IBC-CcR1 y IBC-CcR6 retrasaron la enfermedad por 34 y 32 días, respectivamente, mientras que el oxícloruro de cobre causó un retraso de 20 días en comparación al testigo.

Palabras clave:

Control biológico
Quitinasas
Robusta
Roya del café
Severidad

Keywords:

Biological control
Chitinases
Robusta
Coffee least rust
Severity

Evaluation of actinomycetes associated to *Coffea canephora* as biocontrol agents of *Hemileia vastatrix*

Abstract

The objective of this study was to isolate, select, and evaluate in the field crude chitinolytic cultures (CCC) derived from actinomycete strains associated with the rhizosphere of Robusta coffee plants (*Coffea canephora*) to determine their potential as biocontrol agents against coffee rust (*Hemileia vastatrix*). Rhizosphere soil samples were collected from a Robusta coffee plantation located in the municipality of Tapachula, Chiapas, Mexico, at an elevation of 300 meters above sea level. Twenty-five microbial isolates were obtained; of these, 11 were actinomycete strains, six of which exhibited chitinolytic activity in M9 medium supplemented with colloidal chitin as the sole carbon source. Strains IBC-CcR1 and IBC-CcR6 were selected due to their high chitinase activity, and their CCCs (applied individually or in combination) were evaluated in the field as biocontrol agents against rust on Robusta coffee plants. Statistical analysis showed similarities among the treatments, but differences compared to the control regarding the area under the disease progress curve (AUDPC). The CCC from strains IBC-CcR1 and IBC-CcR6 delayed disease progression by 34 and 32 days, respectively, whereas copper oxychloride caused a delay of 20 days compared to the control.

* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias.
Universidad Autónoma de Chiapas.
Boulevard Príncipe Akishino
sin número, Colonia
Solidaridad 2000, C.P.
30798.
Tapachula, Chiapas, México.
Teléfono: + 52 9626427972.
Correo-electrónico:
benjamin.moreno@unach.mx

1. Introducción

El estado de Chiapas es el principal productor de café árabe (*Coffea arabica* L.) en México; con una producción anual de 104 mil toneladas (40 % de la producción nacional) cosechadas en 253 mil hectáreas aproximadamente (SIAP, 2019). Los cafetos son afectados, entre otros hongos, por *Hemileia vastatrix* Berk & Broome, que produce la enfermedad conocida como roya del café. El microorganismo ocasiona necrosis foliar, caída prematura de la hojas, pudrición de frutos, pérdida de calidad y reducción de hasta 80 % del rendimiento, cuando no se implementan acciones de manejo y control (Henderson, 2019; SENASICA, 2013). El proceso infectivo de *H. vastatrix* inicia con el anclaje de las urediniosporas en los estomas o el tejido foliar adyacente, la germinación de la urediniosporas (3 h después del anclaje), la introducción del tubo germinativo a través del estomas, el desarrollo intracelular de micelio y el desarrollo de haustorios para penetrar las células (Salcedo-Sarmiento et al., 2021; Silva-Castro et al., 2018; Talhinhos et al., 2017).

El manejo convencional de la roya del café es realizado mediante la aspersión de fungicidas sintéticos, lo que ha implicado riesgos en la generación de resistencia, impacto ambiental y riesgos para salud humana (da Costa et al., 2020; Zambolim, 2016). Alternativamente existen microorganismos con potencial de biocontrol de fitopatógenos, tales como los actinomicetos, capaces de sintetizar compuestos bioactivos antifúngicos (Qin et al., 2011) y antibióticos (Chater, 2006; de Lima Procópio et al., 2012; Watve et al., 2001), además de quitinasas extracelulares y otras enzimas micolíticas (Das et al., 2007; Herrera-Estrella y Chet, 1999; Vurukonda et al., 2018).

El uso de microorganismos quitinolíticos como agentes de biocontrol es una herramienta que podría sustituir, reducir o complementar los programas de manejo químico de los fitopatógenos (Brzezinska et al., 2014; Gohel et al., 2006; Jackson et al., 2012; Nagpure et al., 2014), por lo que el presente estudio tuvo como objetivo aislar, seleccionar y evaluar en campo el efecto de la aspersión de los cultivos crudos quitinolíticos de cepas de actinomicetos sobre la severidad de roya en plantas de café robusta.

2. Materiales y Métodos

2.1. Aislamiento de microorganismos

Las cepas de actinomicetos se obtuvieron de una plantación de 10 años, proveniente de la finca de café (*Coffea canephora*) “Los Olivos” (-92.2235° N, 14.97628° W). Las condiciones de la finca son: suelo de tipo luvisol, textura franca, capa arable de aproximadamente de 50 cm, localizada en la comunidad cantón “El Triunfo”, municipio de Tapachula Chiapas (-92.222500°N, 14.988333°W). Diez plantas de café dentro de la plantación fueron seleccionadas bajo un modelo de selección en “zig-zag” (López-Cruz et al., 2014), de las que se colectaron 10 g de suelo de rizosfera por cada planta, submuestras que se depositaron en bolsas plásticas estériles que fueron colocadas en refrigeración (4 °C). Veinticuatro horas después, las submuestras fueron

mezcladas y homogeneizadas en el laboratorio. De la muestra compuesta y bajo condiciones estériles, se obtuvieron 10 g de suelo que fueron disueltos en 100 mL de buffer de sodio fosfato 0.1 M + Tween 80 (pH 7) 0.1 %, para luego ser puestos bajo agitación a 170 rpm por una hora y a temperatura ambiente (Ceballos et al., 2012). La mezcla fue serialmente diluida hasta 10^{-6} , para luego tomar alícuotas de 20 μ L y distribuirlas por triplicado en placas de agar nutritivo (AN). Las placas se incubaron por 4 d a 30 °C (Moreno et al., 2016), para posteriormente seleccionar e identificar las cepas de actinomicetos por la presencia del micelio característico.

2.2. Ensayo de actividad quitinasa

Las cepas seleccionadas en el procedimiento anterior fueron cultivadas durante 5 d a 30 °C y 130 rpm en medio mínimo M9, adicionado con 1 % de quitina coloidal como única fuente de carbono. La quitina coloidal se preparó siguiendo el método reportado por Gómez-Ramírez et al. (2004). La actividad quitinasa del sobrenadante fue determinada con el sustrato cromogénico 4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminida (PNG), siguiendo el método descrito por Moreno et al. (2016), con ligeras modificaciones. 100 μ L de sobrenadante se adicionaron a 100 μ L de 4-PNG (Sigma Aldrich - N9376) en 300 μ L de buffer sodio-fosfato 0.1 M (pH 7.0). Las reacciones se incubaron a 37 °C por 4 h y se detuvieron adicionando 500 μ L de Na_2CO_3 1 M. La actividad quitinasa relativa se midió a 405 nm, reacción caracterizada por una coloración amarilla que indicó la liberación del subproducto 4-nitrofenil.

2.3. Preparación de los tratamientos

Las dos cepas seleccionadas como las mejores productoras de quitinasas fueron cultivadas nuevamente en el medio M9 bajo las mismas condiciones descritas previamente. Después de la incubación, el CCQ (quitinasas, metabolitos extracelulares y aproximadamente 1×10^6 UFC mL^{-1}) fue filtrado en tres capas de tela tipo “cheesecloth” para eliminar los residuos de quitina coloidal, mismos que fueron posteriormente evaluados individualmente y en combinación 1:1 (V: V) como tratamientos en el ensayo de campo.

2.4. Ensayo de campo

El ensayo se estableció bajo un diseño completamente al azar y los tratamientos evaluados fueron 1) CCQ cepa IBC-CcR1, 2) CCQ cepa IBC-CcR6, 3) CCQ IBC- CcR1 + IBC-CcR6, 4) Oxiclورو de cobre (5 g L^{-1}) y 5) agua (control). Los tratamientos preparados en fresco fueron asperjados cada 15 días durante seis meses (septiembre del 2021 a febrero del 2022) sobre 12 plantas de café robusta por tratamiento, las cuales fueron seleccionadas al azar en la finca “Los Olivos” (-92.2235° N, 14.97628° W). Para la aspersión se utilizaron aspersores manuales (Klintek modelo ATO-100), dirigiéndose el rocío hacia el haz y envés de las hojas hasta alcanzar el punto de goteo.

2.5. Medición de la severidad y parámetros epidemiológicos de la roya del café

Para monitorear y medir la severidad de la roya se calculó un índice de infección basado en una escala de daño de ocho grados establecida por López et al. (2018), de acuerdo al porcentaje foliar con síntomas visibles de la enfermedad: grado 0 = sin síntomas, grado 1 = con puntos cloróticos o 1 % de la hoja con síntomas, grado 2: hasta 2 % del área foliar con síntomas, grado 3 = hasta 4 % con síntomas, grado 4 = de 5-8 %, grado 5 = de 9-16 %, grado 6 = 17-32 % y grado 7 = más de 33 % de la hoja con roya. Se muestrearon seis ramas por planta, dos inferiores, dos medias y dos superiores (Rivillas et al., 2011; 2017) con lo que se calculó el índice de infección por planta mediante la fórmula $II\ (%) = (\sum an/7N) \times 100$, donde a es cada uno de los grados de la escala (0-7), n corresponde al número de hojas presentes en cada grado y N es el número total de hojas muestreadas (Carlier et al., 2003). Con los índices de infección acumulados se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (abcpe) (Achicanoy, 2000; Godínez-Paoli et al., 2020) utilizando la siguiente fórmula: $abcpe = \sum [(II_1 + II_2)/2] \times [t_2 - t_1]$, donde II_1 y II_2 son los índices de infección acumulados a los tiempos t_1 y t_2 , respectivamente, siendo t_1 y t_2 los días en que se hicieron los muestreos después de la aplicación inicial.

También se calculó la tasa de infección aparente (r) de cada tratamiento (Granados-Montero et al., 2020; Van der Plank, 1963): $r = [1/(t_2 - t_1)] [\ln(X_2/1 - X_2) - \ln(X_1/1 - X_1)]$, donde t_1 y t_2 representan los días transcurridos entre el muestreo inicial y el final, respectivamente. X_1 y X_2 son la proporción acumulada de la enfermedad en t_1 y t_2 , mientras que $\ln$ es el logaritmo natural.

Por último se determinó el factor Δt , el cual es un parámetro descriptivo que mide el retraso en el desarrollo de la enfermedad causado por un tratamiento con respecto al testigo, mediante la siguiente fórmula (Whitney, 1976): $\Delta t = (1/r) \ln (x_0/x_{0s})$, donde Δt es el retraso en el progreso de la enfermedad (en días) causado por el tratamiento (x_{0s}) en comparación con el testigo (x_0), r es la tasa aparente de infección de x_{0s} calculado con la fórmula (3) de Van der Plank y $\ln$ es el logaritmo natural.

2.6. Análisis estadístico

Para monitorear la evolución de los índices de infección en el tiempo, se realizó un análisis de medidas repetidas y una separación de medias por el intervalo de confianza 95% (Fajardo-Franco et al., 2020). Los valores transformados del abcpe elevado al cuadrado se analizaron mediante un ANOVA y una separación de medias mediante la prueba de Tukey (nivel de significancia de 0.05). Previo al ANOVA se verificaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad (Shapiro-Wilk y prueba de Levene, respectivamente). Los análisis se realizaron en el software R (R Core Team, 2026 ver 4.6.1., 2026-06-24 "Happy Hop") con apoyo del paquete Rcommander (v. 2.13.0).

3. Resultados y Discusión

Se obtuvieron un total de 25 aislamientos microbianos asociados a la rizosfera de plantas de café robusta, de los cuales 11 fueron identificados como actinomicetos de acuerdo a su morfología colonial y la presencia de micelio (Parada et al., 2017; Pérez-Corral et al., 2017; Zanane et al., 2018). Seis cepas fueron seleccionadas por su rápido crecimiento en agar nutritivo y por su capacidad de producir pigmentos en el medio de cultivo, las cuales fueron codificadas como IBC-CcR1, IBC-CcR2, IBC-CcR3, IBC-CcR4, IBC-CcR5 y IBC-CcR6. Después de cultivar las seis cepas en medio mínimo M9 + 1 % de quitina coloidal como única fuente de carbono, se seleccionaron las cepas IBC-CcR1 y IBC-CcR6 como las mejores productoras de quitinasas extracelulares, ya que mostraron la mayor absorbancia (405 nm), después de degradar el sustrato cromogénico 4-PNG (Cruz-Ortiz et al., 2020; Moreno et al., 2016). Los actinomicetos son microorganismos que se han reportado como agentes de biocontrol de diferentes fitopatógenos, cuya capacidad antagónica se atribuye a sus hábitos micoparásitos, competencia, antibiosis y a la producción de enzimas micolíticas que degradan la quitina estructural contenida en la pared celular de los hongos. Estas enzimas hidrolizan los enlaces glucosídicos β (1,4) entre monómeros de N-acetil-glucosamina (GlcNAC) que son utilizados como fuente de carbono en el metabolismo bacteriano (Fajardo-Franco et al., 2020; Sharon et al., 2007; Toniutti et al., 2017). A diferencia del control químico, el cual puede ofrecer resultados rápidos en el control de hongos fitopatógenos, el control biológico suele ofrecer resultados más lentos pero más consistentes y perdurables en el tiempo, sin el riesgo de generar resistencia (Hernández-Martínez y Velázquez-Premio, 2016).

En el ensayo de campo, el análisis de medidas repetidas mostró diferencias altamente significativas entre tratamientos ($F_{4,319} = 121.3$; $P < 0.01$; Figura 1). A partir del segundo mes de iniciado el ensayo de campo, se empezaron a observar diferencias entre los tratamientos, siendo las plantas asperjadas con el CCQ de las cepas IBC-CcR1 y IBC-CcR6 de manera individual, las que presentaron los menores índices de infección por roya. Al final del experimento, las plantas asperjadas con el CCQ de la cepa IBC-CcR1 fueron las que mostraron los índices de infección significativamente más bajos en comparación con el testigo y los demás tratamientos. La mezcla de CCQ mostró valores de infección superiores al tratamiento individual IBC-CcR1, lo que probablemente indicó una interacción negativa entre ambos CCQ, probablemente debido a interacción entre las células de las diferentes cepas o incluso sus metabolitos. Aun así, la mezcla fue estadísticamente similar al oxiclورو de cobre hacia el último muestreo del experimento de campo.

Diferentes trabajos han dado cuenta de la efectividad de los metabolitos extracelulares de diversas cepas de actinomicetos. El-Shatoury et al. (2020) evaluaron dos cepas de *Streptomyces* (MG788011, MG788012) contra *Botrytis cinerea* agente causal de la mancha de chocolate en plantas

de habas (*Vicia fabae* L.), quienes al aplicar los metabolitos crudos y células de ambas cepas obtuvieron una severidad inferior al 8 % en comparación con el testigo (33 %). Li et al. (2011) evaluaron *in planta* el potencial de biocontrol de los metabolitos extracelulares de *Streptomyces globisporus* JK-1 contra el hongo del tizón del arroz *Magnaporthe oryzae*, obteniendo una reducción significativa de la enfermedad

(88.3 %) en comparación al testigo. Widyantoro et al. (2020) demostraron que un biofungicida elaborado con metabolitos de *Streptomyces* mostró la menor tasa de infección aparente ($r = 0.06$) y acumuló la menor cantidad de enfermedad (abcpe = 991.7) ocasionada por *Fusarium oxysporum* en plantaciones de banano.

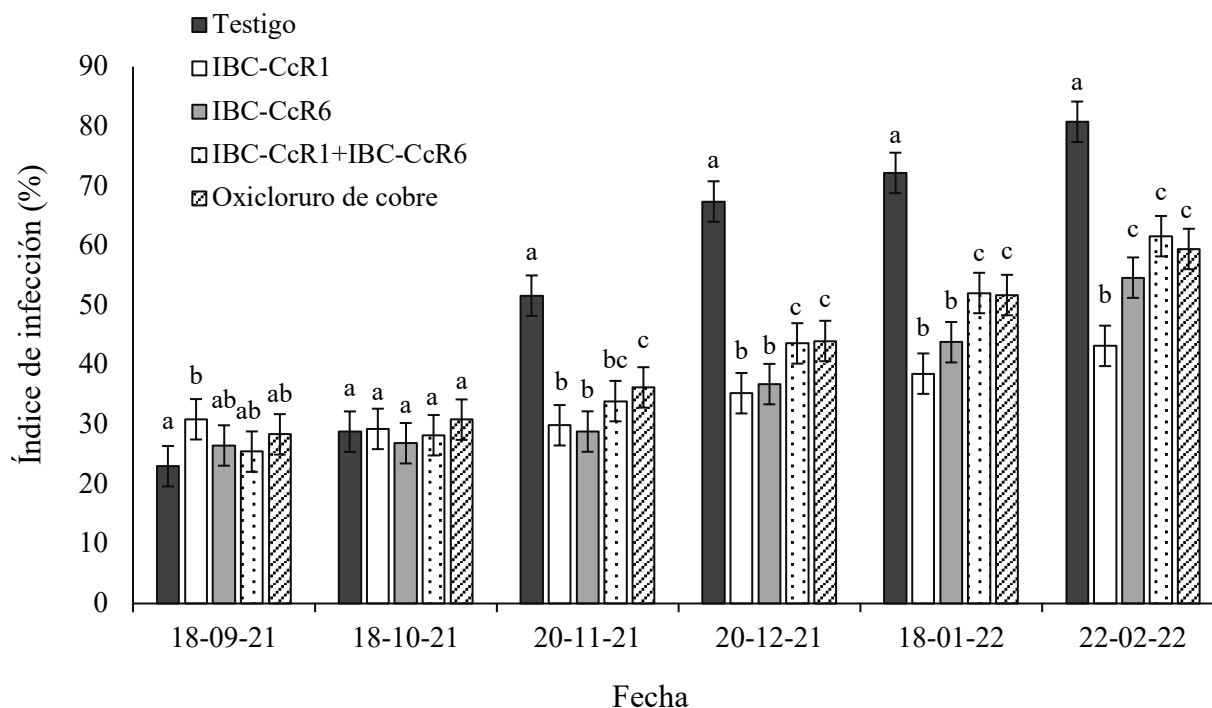


Figura 1. Índices de infección de roya del café (*Hemileia vastatrix*) en plantas de *Coffea canephora*. Ensayo realizado de septiembre de 2021 a febrero de 2022 en la Finca “Los Olivos”, Cantón el Triunfo, Tapachula, Chiapas, México. Barras con la misma letra en la misma fecha son estadísticamente iguales. Las barras de error representan los intervalos de confianza (95 %) de la media en cada evaluación.

Al final del presente estudio, las plantas tratadas con el sobrenadante de IBC-CcR1 mantuvieron alrededor de un 43 % la severidad de roya, mientras que las plantas asperjadas con IBC-CcR6, la combinación de ambas cepas y el oxidocloruro de cobre finalizaron con 54, 61 y 59 %, respectivamente (Figura 1).

El análisis de varianza del abcpe indicó diferencias significativas entre tratamientos ($F_{4,55} = 13.3$; $P < 0.05$), mientras que la separación de medias indicó que todos los tratamientos fueron iguales entre sí, pero diferentes al abcpe promedio del testigo (Figura 2). Fajardo-Franco et al. (2020) evaluaron el efecto de biofungicidas elaborados con *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia* y *Bacillus subtilis* más *A. indica* más *Syzygium aromaticum*, para el control de la roya del café en plantaciones de *Coffea arabica* var. Garnica y Typica, donde *M. alternifolia* acumuló la menor enfermedad (abcpe = 61.8) y la menor tasa aparente de infección ($r = 0.028$).

Con relación al retraso en el progreso de la roya del café (Δt), se estimó que las cepas IBC-CcR1 y IBC-CcR6 retrasaron 34 y 32 días el progreso de la enfermedad, respectivamente. La

combinación de ambas cepas causó un retraso de 23 días en comparación con el testigo, mientras que el fungicida químico retrasó 20 días la enfermedad (Figura 2). Estos resultados sugieren que los tratamientos a base de las cepas (solas o en combinación) tuvieron efecto inhibitorio sobre la cantidad de inóculo producido en el sitio experimental o proveniente de otras plantaciones (Talhinhos et al., 2017), lo cual pudo deberse a la acción quitinolítica del sobrenadante de las cepas sobre las urediniosporas de *H. vastatrix* (Bhatti et al., 2017; Sharon et al., 2007).

4. Conclusiones

Se aislaron 25 cepas microbianas provenientes de la rizosfera de plantas de *Coffea canephora*, donde 11 fueron actinomicetos y de las cuales seis cepas mostraron actividad quitinolítica sobre quitina coloidal.

Las cepas IBC-CcR1 y IBC-CcR6 fueron seleccionadas para ser evaluadas en campo debido a la mayor actividad quitinasa y por haber mostrado abundante cantidad de esporulación y rápido crecimiento en agar nutritivo.

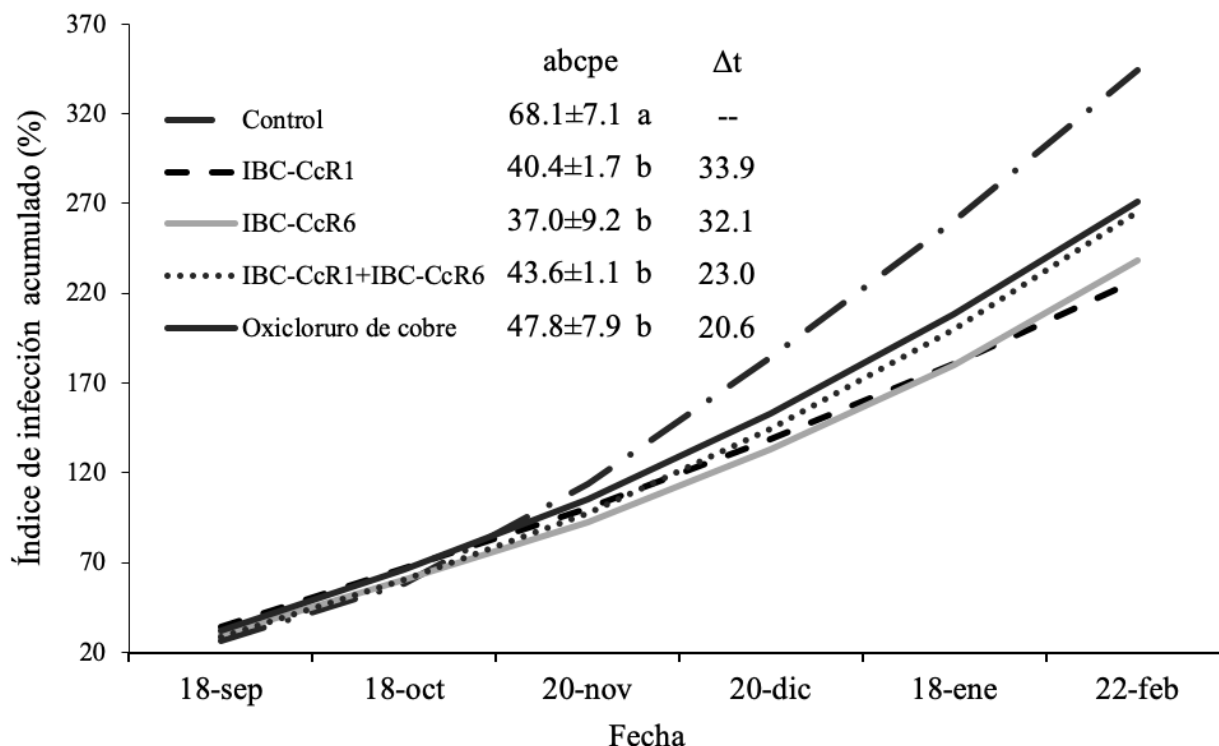


Figura 2. Índices de infección acumulados de roya del café (*Hemileia vastatrix*) en plantas de *Coffea canephora*. Ensayo realizado de septiembre de 2021 a febrero de 2022 en la Finca “Los Olivos”, Cantón el Triunfo, Tapachula, Chiapas, México. Valores promedio de área bajo la curva del progreso de la enfermedad (abcpe ± error estándar) con la misma letra son estadísticamente iguales. Se muestran los valores del retraso en el progreso de la enfermedad (Δt) con respecto al testigo (control).

Los resultados en campo indicaron que el CCQ de la cepa IBC-CcR1 tiene potencial como agente de biocontrol de la roya del café, ya que generó un retraso de la enfermedad por 34 días, superando al oxicloruro de cobre (20 días), además de acumular la misma cantidad de enfermedad (abcpe) que el fungicida químico.

Agradecimientos

A los productores de café del sitio experimental (Cantón el Triunfo) y al propietario de la Finca “Los Olivos” por las facilidades otorgadas para el experimento de campo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Achicanoy H. 2000. Descripción cuantitativa de las epidemias de las plantas. Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín, 53(1), 941-968.
- Bhatti AA, Haq S, Bhat RA. 2017. Actinomycetes' benefaction role in soil and plant health. Microbial Pathogenesis, 111, 458-467.
- Brzezinska M, Jankiewicz U, Burkowska A, Walczak M. 2014. Chitinolytic microorganisms and their possible application

in environmental protection. Current Microbiology, 68, 71-81.

- Carlier J, De Waele D, Escalant JV. 2003. Evaluación global de la resistencia de los bananos al marchitamiento por *Fusarium*, enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* y nemátodos: evaluación extensiva. Guía Técnica INIBAP 6. Red Internacional para el mejoramiento del banano y plátano, Montpellier, Francia.
- Ceballos I, Mosquera S, Angulo M, Mira JJ, Argel LE, Uribe-Velez D, Romero-Tabarez M, Orduz-Peralta S, Villegas V. 2012. Cultivable bacteria populations associated with leaves of banana and plantain plants and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. Microbial Ecology, 64, 641-653.
- Chater KF. 2006. *Streptomyces* inside-out: A new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 361(1469), 761-768.
- Cruz-Ortiz LA, Flores-Méndez M, Escobar-Ventura KR, Moreno-Castillo B. 2020. Aislamiento de bacterias antagonicas de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y promotores de crecimiento en banano (*Musa AAA*). IBCIENCIAS, 3, 32-36.
- da Costa GA, Freitas-Lopes RL, Lino JB, Julião EC, Michereff SJ, Lopes UP. 2020. An efficient method for inducing sporulation of cercosporoid fungal species causing leaf spots in cassava. Journal of Plant Pathology, 102, 201-204.

- Das S, Goyal R, Bhattacharya SN. 2007. Laboratory-based epidemiological study of superficial fungal infections. *Journal of Dermatology*, 34, 248-253.
- de Lima Procópio RE, da Silva IR, Martins MK, de Azevedo JL, de Araújo JM. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16, 46-471.
- El-Shatoury SA, Ameen F, Moussa H, Wahid OA, Dewedar A, AlNadhari S. 2020. Biocontrol of chocolate spot disease (*Botrytis cinerea*) in faba bean using endophytic actinomycetes *Streptomyces*: A field study to compare application techniques. *PeerJ*, 3, 85-82.
- Fajardo-Franco ML, Aguilar-Tlatelpa M, Guzmán-Plazola RA. 2020. Biofungicides evaluation in two coffee cultivars for *Hemileia vastatrix* control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 38, 293-306.
- Godínez-Paoli R, Leyva-Mir SG, García-Mateos MDR, Magdaleno-Villar J, Cruz- Álvarez O, Martínez-Damián MT. 2020. Fungicides, biocontrollers and resistance inducers in commercial bell pepper hybrids inoculated with *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 38, 258-268.
- Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini P, Chhatpar HS. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *African Journal of Biotechnology*, 5, 54-72.
- Gómez-Ramírez M, Rojas-Avelizapa LI, Rojas-Avelizapa NG, Cruz-Camarillo R. 2004. Colloidal chitin is stained with Remazol Brilliant Blue R®, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and evaluating chitinases. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 213-219.
- Granados-Montero M, Avelino J, Arauz-Cavallini F, Castro-Tanzi S, Ureña N. 2020. Leaf litter and *Mycena citricolor* inoculum on the American leaf spot epidemic. *Agronomía Mesoamericana*, 31, 77-94.
- Henderson TP. 2019. La roya y el futuro del café en Chiapas. *Revista Mexicana de Sociología*, 81, 389-416.
- Hernández-Martínez G, Velázquez-Premio T. 2016. Análisis integral sobre la roya del café y su control. *Revista Internacional de Desarrollo Regional Sustentable*, 1, 92-99.
- Herrera-Estrella A, Chet I. 1999. Chitinases in biological control. *EXS*, 87, 171-184.
- Jackson D, Skillman J, Vandermeer J. 2012. Indirect biological control of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*, by the entomogenous fungus *Lecanicillium lecanii* in a complex coffee agroecosystem. *Biological Control*, 61, 89-97.
- Li Q, Jiang Y, Ning P, Zheng L, Huang J, Li G, Jiang D, Hsiang T. 2011. Suppression of *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of *Streptomyces globisporus* JK-1. *Biological Control*, 58, 139-148.
- López-Cruz V, Paz GA, Nuñez TR, Fornet HE. 2014. Comparación de dos métodos de muestreos para el estudio de *Rhizoctonia solani* Kühn, en el cultivo de *Vigna unguiculata* L. Walp. (frijol caupi). X Encuentro Regional de Agricultura Organica y Sostenible. Ciudad de Holguín, Holguín, Cuba. 12 p.
- López JM, Marín-Ramírez G, Gaitán A, Ángel CA. 2018. Diagrama de área estándar para la estimación visual de severidad de roya del café. *Avances Técnicos Cenicafe*. 498,1-8.
- Moreno B, Dunn MF, Navarro KG, Meléndez FH, Ortiz MH, Guevara SE, Palacios GH. 2016. Antifungal performance of extracellular chitinases and culture supernatants of *Streptomyces galilaeus* CFFSUR-B12 against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-12.
- Nagpure A, Choudhary B, Gupta RK. 2014. Chitinases: in agriculture and human healthcare. *Critical Reviews in Biotechnology*, 34(3), 215-232.
- Parada RB, Marguet ER, Vallejo M. 2017. Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19, 17-23.
- Pérez-Corral DA, García-González NY, Gallegos-Morales G, Ruiz-Cisneros MF, Berlanga-Reyes DI, Ríos-Velasco C. 2017. Aislamiento de actinomicetos asociados a rizosfera de árboles de manzano antagonicos a *Fusarium equiseti*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6, 1629.
- Qin J, Li MJ, Wang P, Zhang MQ, Wang J. 2011. ChIP-Array: Combinatory analysis of ChIP-seq/chip and microarray gene expression data to discover direct/indirect targets of a transcription factor. *Nucleic Acids Research*, 39, W430-W436.
- R Core Team. (2026). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. www.R-project.org
- Rivillas CA, Serna CA, Cristancho MA, Gaitán AL. 2011. La roya del café en Colombia. Impacto, manejo y costos del control. Resultados de investigación. *Boletín Técnico Cenicafe*, 36, 1-51.
- Rivillas CA, Hoyos AM, Ramírez IC. 2017. Manejo de la roya. Nuevo fungicida para su control en Colombia. *Avances Técnicos Cenicafe*, 480, 1-4.
- Salcedo-Sarmiento S, Aucique-Pérez CE, Silveira PR, Colmán AA, Silva AL, Corrêa-Mansur PS, Rodrigues FÁ, Evans HC, Barreto RW. 2021. Elucidating the interactions between the rust *Hemileia vastatrix* and a *Calonectria* mycoparasite and the coffee plant. *IScience*, 24, 102352.
- SENASICA. 2013. Ficha Técnica No. 40 Roya del café *Hemileia vastatrix* Berkeley y Broome. In Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2-23. https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/ContenidoPublico/Roya_cafeto/Fichas_técnicas/Ficha_Técnica_de_Roya_del_cafeto.pdf
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2019. Avance de Siembras y Cosechas Resumen Por Cultivo. http://infosiap.siap.gob.mx/Agricola_siap/ResumenProducto.do?producto=5500&invitado=true&ciclo=3
- Sharon E, Chet I, Viterbo A, Bar-Eyal M, Nagan H, Samuels GJ, Spiegel Y. 2007. Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. *European Journal of Plant Pathology*, 118, 247-258.
- Silva-Castro I, Barreto RW, Rodriguez MCH, Matei PM, Martín-Gil J. 2018. Control of coffee leaf rust by chitosan oligomers and propolis. "Agriculture for Life, Life for Agriculture" Conference Proceedings, 1, 311-315.
- Talhinhas P, Batista D, Diniz I, Vieira A, Silva DN, Loureiro A, Tavares S, Pereira AP, Azinheira HG, Guerra-Guimarães L, Várzea V, Silva MdoC. 2017. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology*, 18, 1039-1051.
- Toniutti L, Breitler JC, Etienne H, Campa C, Doubeau S, Urban L, Lambot C, Pinilla JCH, Bertrand B. 2017. Influence of environmental conditions and genetic background of

- Arabica coffee (*C. Arabica* L.) on leaf rust (*Hemileia vastatrix*) pathogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2025.
- Van Der Plank JE. 1963. The control of plant disease studied as part of epidemiology. En Van Der Plank JE. *Plant Diseases. Epidemics and Control*. Academic Press. Pp 1-6.
- Vurukonda SSKP, Giovanardi D, Stefani E. 2018. Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 952.
- Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*, 176, 386-390.
- Whitney PJ. 1976. *Microbial plant pathology*. Hutchinson & Co. Ltd, London.
- Widyantoro A, Hadiwiyono, Subagiya. 2020. Biological control of *fusarium* wilt on banana plants using biofertilizers. *Biodiversitas*, 21, 2119-2123.
- Zambolim, L. 2016. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 1, 1-8. Springer.
- Zanane C, Latrache H, Elfazazi K, Zahir H, Ellouali M. 2018. Isolation of actinomycetes from different soils of Beni Amir Morocco. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 2508, 2994-3000.