

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL
MARLON NÚÑEZ

TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL
GRADO DE MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

**Aislamiento e identificación molecular y morfológica de *Boeremia* sp., agente causal
de necrosis foliar en *Coffea arabica* en Panamá.**

PANAMÁ, REPUBLICA DE PANAMÁ

2022

LUIS CARLOS MEJÍA. Investigador del Centro de Biodiversidad y Descubrimiento de Drogas del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT-AIP) y miembro del SNI de Panamá.

CERTIFICA QUE: MARLON JOSTHAN NÚÑEZ PEÑALBA

Ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis de Maestría, con el título:

Aislamiento e identificación molecular y morfológica de *Boeremia* sp., agente causal de necrosis foliar en *Coffea arabica* en Panamá.

Revisado este trabajo, autorizan su presentación para ser juzgado, y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Panamá el 08 de junio de 2022.

DEDICATORIA

Este trabajo para la titulación del grado de maestro en Microbiología Ambiental; es dedicado a mi esposa Raitza Atencio, con quién converse la idea de participar del programa y me acompañó durante toda la travesía de este. Es dedicado a mi hijo Martín Núñez, quién llegó durante la realización del trabajo, en medio de la pandemia de COVID-19; y por último es dedicado a mi familia de procedencia; mi Madre Filiodelfa Peñalba y mi Padre Mario Núñez, quienes me formaron como persona, e inculcaron valores que motivaron el estudio y el trabajo honesto.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco al programa de Maestría en Microbiología Ambiental de la Universidad de Panamá, junto a la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado; a la SENACYT, por financiar el programa mediante el convenio No. 68-2017, SENACYT-UP; Al Doctor Luis C. Mejía, por ofrecerme el tema de estudio y orientarme; al INDICASAT-AIP, por el uso de las facilidades del laboratorio, e insumos para la realización del trabajo; así como a todo el equipo de trabajo que de una forma u otra me brindó su apoyo durante la realización de esta investigación; Evangelina López, Yaleskia Valdés, Ariel Raschella, Marjorie Cedeño, Librada Atencio, Indira Quintero, Luis Ramírez, y por último, agradezco Dios por todo.

INDICE GENERAL

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	5
3. OBJETIVOS	7
3.1. Objetivo general	7
3.2. Objetivos específicos.....	7
4. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	8
4.1. Breve Revisión de la familia <i>Dydimellaceae</i>	8
4.1.1. Género <i>Boeremia</i>	9
5. ASPECTOS METODOLOGICOS	10
5.1. Giras de Campo y aislamientos.....	10
5.2. Descripción Morfológica	10
5.3. Pruebas de Patogenicidad	12
5.3.1. Ensayo <i>ex vivo</i>	13
5.3.2. Ensayo <i>in vivo</i>	13
5.4. Identificación Molecular, análisis Filogenéticos.....	14
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	20
6.1. Aislamiento	20
6.2. Descripción Morfológica.....	20
6.3. Prueba de Patogenicidad	21
6.3.1. Ensayo <i>ex vivo</i>	21
6.3.2. Ensayo <i>in vivo</i>	21
6.4 Identificación molecular, análisis filogenéticos.....	25
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	29
8. BIBLIOGRAFÍA	31
9. ANEXOS	36

INDICE DE FIGURAS

Figura 01	Lesiones en campo, en Boquete, Chiriquí	16
Figura 02	Diagrama de aislamiento de Lesiones	17
Figura 03	Pruebas de Patogenicidad - Ensayo <i>ex vivo</i>	18
Figura 04	Pruebas de patogenicidad. Ensayo <i>in vivo</i>	19
Figura 05	Morfología en cultivo puro de hongo patógeno aislado y conidias.....	23
Figura 06	Pruebas de Patogenicidad. ensayo <i>ex vivo</i> , resultados.....	24
Figura 07	Prueba de patogenicidad. Ensayo <i>in vivo</i> , resultados.....	25
Figura 08	Filogenia de <i>Boeremia</i> basada en locus ITS.....	27
Figura 09	Filogenia de <i>Boeremia</i> basada en locus LSU.....	28
Figura 10	Filogenia de <i>Boeremia</i> basada en loci ITS y LSU.....	29

INDICE DE TABLAS

Tabla 01	Información de colecta.....	11
Tabla 02	Lista de los especímenes usados en los análisis filogenéticos de este trabajo.....	37
Tabla 03	Comparación morfológica de especies de <i>Boeremia</i>	38
Tabla 04	Concentraciones de ADN de aislados preseleccionados.....	39

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

CENICAFE: Centro nacional de investigación del café (Colombia)

HR: Humedad Relativa

ITS: Espaciadores transcritos internos

LSU: Subunidad ribosomal mayor

MEA: Agar extracto de malta

MSNM: Metros sobre el nivel del Mar

OA: Agar Avena

ONU: Organización de las Naciones Unidas

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa.

PDA: Agar papa dextrosa

PIB: Producto interno bruto

V8: Agar V8

1. RESUMEN

El cultivo de café de altura representa un rubro agrícola de alta importancia para Panamá. Al igual que en otros países, la producción de café se ve constantemente amenazada por plagas y enfermedades. En este trabajo se identifica el agente causal de una patología en *Coffea arabica* en dos localidades de la Provincia de Chiriquí, Panamá. Durante los meses de junio y octubre de 2019 se realizaron giras de trabajo a cafetales del distrito de Boquete, provincia de Chiriquí, con el objetivo de estudiar patologías de *Coffea arabica* var. Geisha. En la finca El Velo, a más de 1600 metros sobre el nivel del mar (MSNM), se observaron individuos de *C. arabica* var. Geisha con síntomas similares a los de la enfermedad conocida como Quema o Derrite del café y se procedió a la colecta de tejidos lesionados para su estudio detallado en laboratorio. Adicionalmente, en noviembre del mismo año se visitó la localidad de Silla de Pando en el distrito de Volcán, donde se observaron síntomas similares y se realizó colecta de muestras para estudio en laboratorio. En ambas localidades las lesiones foliares se caracterizaban por ser de color marrón oscuro a negro en hojas jóvenes y con cierto grado de clorosis, adicionalmente se observaron lesiones con necrosis en ramas verdes, y principalmente en zonas terminales de ramas más altas de los árboles, y que en conjunto daba la apariencia de una muerte descendente. Las muestras de tejido fueron transportadas a laboratorio refrigeradas en hielo para aislamiento de agente causal. De las muestras procesadas se logró aislar diversos hongos y uno de manera consistente entre las dos localidades

muestreadas a partir de lesiones foliares y de la cual se seleccionaron dos cepas para estudios detallados. Los aislados fueron puestos a crecer en diferentes condiciones de medios de cultivo y temperatura. Se logró inducir esporulación en medio de agar avena (OA) y se determinó la temperatura óptima de crecimiento en 23°C. La morfología de conidias de este hongo correspondió con las de especies del género *Boeremia* Aveskamp, Gruyter & Verkley. Se realizaron pruebas de patogenicidad *ex vivo* e *in vivo* lográndose obtener lesiones similares a las de campo y volviéndose a reaislar las cepas inoculadas. Se llevó a cabo una secuenciación de ADN de los loci ITS y LSU y análisis filogenéticos. Filogenias basadas en método de máxima verosimilitud incluyendo todas las especies del género *Boeremia* no nos permite asignar el agente causal a una especie conocida. La combinación de datos morfológicos de conidias, ovoides a elipsoides y hialinas, con tamaño de 1.1-2.0 µm de ancho x 2.9-6.8 µm de largo y, junto la información molecular sugiere que el agente causal aislado se trata de una nueva especie de *Boeremia* por ser descrita. Sin embargo se requieren datos moleculares de más loci para concluir sobre las relaciones filogenéticas de estos aislados con otras especies de *Boeremia* y para completar la descripción de esta especie. Este trabajo representa el primer reporte de una especie de *Boeremia* patógena de *Coffea arabica* en Panamá y se sugiere estudios adicionales sobre su distribución en el país y cuantificación del daño que puede causar.

1. ABSTRACT

The cultivation of high altitude coffee represents an agricultural item of high importance for Panama. As in other countries, coffee production is constantly threatened by pests and diseases. In this work, the causal agent of a pathology in *Coffea arabica* in two localities of the Province of Chiriquí, Panama, is identified. During the months of June and October 2019, field work were carried out to coffee plantations in the district of Boquete, province of Chiriquí, with the aim of studying pathologies of *Coffea arabica* var. Geisha. At the El Velo farm, at more than 1600 meters above sea level (MSNM), individuals of *C. arabica* var. Geisha with symptoms similar to those of the disease known as “Derrite o Quema”, and injured tissues were collected for detailed study in the laboratory. Additionally, in November of the same year, the town of Silla de Pando in the district of Tierras Altas was visited, where similar symptoms were observed and samples were collected for laboratory study. In both localities, the foliar lesions were characterized by being dark brown to black in young leaves and with a certain degree of chlorosis. In addition, lesions with necrosis were observed in green branches, and mainly in terminal areas of the highest branches of the trees. which altogether gave the appearance of a descending death. The tissue samples were transported to the laboratory refrigerated on ice to isolate the causal agent. From the processed samples it was possible to isolate various fungi and one consistently between the two locations sampled from foliar lesions and from which two strains were selected for detailed studies. The isolates were put to grow in different

conditions of culture media and temperature. Sporulation was induced in oatmeal agar (OA) medium and the optimum growth temperature was determined at 23°C. The conidia morphology of this fungus corresponded to those of species of the genus *Boeremia* Aveskamp, Gruyter & Verkley. *Ex vivo* and *in vivo* pathogenicity tests were carried out, obtaining lesions similar to those in the field and re-isolating the inoculated strains. DNA sequencing of the ITS and LSU loci and phylogenetic analyzes were performed. Phylogenies based on the maximum likelihood method including all species of the genus *Boeremia* does not allow us to assign the causal agent to a known species. The combination of morphological data of conidia, ovoid to ellipsoid and hyaline, with a size of 1.1-2.0 µm wide x 2.9-6.8 µm long and, together with molecular information, suggests that the isolated causal agent is a new species of *Boeremia* to be described. However, molecular data from more loci are required to conclude on the phylogenetic relationships of these isolates with other *Boeremia* species and to complete the description of this species. This work represents the first report of a species of *Boeremia* pathogenic to *Coffea arabica* in Panama and suggests additional studies on its distribution in the country and quantification of the damage it can cause.

2. INTRODUCCIÓN

Estudios económicos muestran que la industria del café en Panamá aporta un gran valor agregado de 212,2 millones de balboas, lo que representa el 0.4% del Producto Interno Bruto del país (PIB). Sumado a eso, se generan más de 74 millones en ingresos por ventas, lo que hace un gran total de alrededor de 297 millones de balboas, que contribuyen a la economía nacional, sólo en café tostado. Esta industria impacta positivamente en las comunidades aledañas, generando oportunidad de empleos por la mano de obra que se contrata de forma permanente y eventual en su producción (Comisión de Asuntos Agropecuarios, 2019) dentro de este rubro, existe una estimación especial para la producción de café Geisha; esta variedad, ha logrado captar la atención internacional hacia la producción panameña de café, producto estrella en la industria, que tiene un récord histórico en la venta de 454 gramos en 1,300.50 balboas en el 2020 (Redacción mi diario. 18 de septiembre de 2020).

A nivel mundial, la principal plaga para este importante rubro es la roya del café, causada por el hongo *Hemileia vastatrix* (Rhiney et al. 2021), sin embargo, existen otros patógenos de relativa importancia para la industria cafetalera como lo son algunos representantes de la familia *Didymellaceae*, dónde se encuentran varias especies de *Phoma*, un género muy complejo, llegó a incluir alrededor de 3000 especies (Monte et al. 1991); este número luego se redujo, tras reclasificaciones y estudios exhaustivos de morfología y análisis moleculares, y hoy en día son aceptadas alrededor de 223 especies en este género (Boerema et al. 2004; Aveskamp et al. 2009). Como parte de estos estudios de reclasificación de especies de *Phoma* se creó el género *Boeremia*, muy similar morfológicamente, pero

claramente diferenciado de *Phoma* en estudios moleculares. En ambos géneros, hay varias especies, asociadas con lesiones en especies de café.

El derrite del café, es una enfermedad que se desarrolla con mayor frecuencia a partir de 1400 MSNM, con una temperatura de 20° Celsius, y un mínimo de 6 horas de luz, las hojas muestran signos de marchitamiento progresivo del tejido succulento de brotes terminales, y los síntomas descienden por el tallo principal hacia las ramas laterales (Gil-Vallejo. L. y Leguizamón-Caicedo J. 2010, Senasica. 2014).

El primer reporte sobre esta enfermedad se hizo en 1957; El agente causal fue identificado como *Phoma costaricensis* a partir de plantas sintomáticas muestreadas en Costa Rica y también observadas en Panamá (Echandi. 1957); Recientemente se ha reportado la presencia de *P. costaricensis* causando quema o derrite en plantaciones de café que están por encima de los 1400 MSNM, en Costa Rica (Barquero M. et al. 2014).

El cultivo de café en Panamá tiene como principales plagas, la Roya del Café y el Ojo de Gallo; sin embargo, censos de la población del café, reportan presencia de la enfermedad de quema o derrite en Chiriquí, dónde de 506 reportes de fincas con problemas fitosanitarios, 62 fincas hacían reportes de derrite o muerte descendente, siendo un total del 12% de las fincas con reporte para el año 2011. (MIDA. 2011)

En este trabajo, se realizaron colectas de tejido con lesiones similares a quema o derrite, en dos localidades de la provincia de Chiriquí, la finca El Velo, en el distrito de Boquete y finca Silla de Pando, en el distrito de Volcán en el año 2019, con la finalidad de identificar el agente causal de estas lesiones, por métodos morfológicos y moleculares.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

1. Aislar e identificar el agente causal de síntomas de enfermedad similares a Quema o Derrite en individuos de *Coffea arabica* en la provincia de Chiriquí.

3.2. Objetivos específicos

1. Aislar mediante métodos tradicionales de patología vegetal el agente causal de síntomas de Quema o Derrite, en plantas de *Coffea arabica*.
2. Describir la morfología del cultivo y las conidias del agente causal de síntomas de Quema o Derrite, en plantas de *Coffea arabica*.
3. Realizar identificación molecular de agente causal de síntomas de Quema o Derrite, en plantas de *Coffea arabica* mediante análisis filogenéticos de los loci ITS y LSU.

4. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

4.1 Familia Didymellaceae.

La familia *Didymellaceae* es un grupo de hongos, con géneros altamente polifiléticos, con más de 5,400 especies reportadas en el MycoBank (Crous et al. 2004). Esta familia fue propuesta inicialmente para acomodar tres grandes géneros de hongos; los géneros *Ascochyta*, *Didymella* y *Phoma* (De Gruyter et al. 2009). Posteriormente, se creó el género *Boeremia*, para agrupar a los individuos cuya morfología era muy similar a la especie “tipo” del género *Phoma*, *Phoma exigua* (Aveskamp et al. 2010, Chen et al. 2017). Sin embargo, dada la gran similitud morfológica entre estos hongos fitopatógenos, se han convertido en un grupo difícil de identificar (Zimouska et al. 2018); lo que ha conllevado a que la caracterización molecular tenga un importante incremento en su uso, para complementar las descripciones morfológicas, tornándose esenciales en la identificación de especies en la familia *Didymellaceae* (Rai et al. 2014; Jayasiri et al. 2017; How et al. 2020). Hasta el momento, mayo de 2022; hay al menos siete especies enlistadas en la base de datos del Index Fungorum, asociadas al cultivo del café y pertenecientes al género *Phoma*; *Phoma rubiginosa* var. *major*, *Phoma rubiginosa* var. *circumstipata*, *Phoma rubiginosa*, *Phoma rubicola*, *Phoma rubiae*, *Phoma coffeicida*, *Phoma coffeae*, *Phoma coffeicola*, *Phoma coffeiphila*. Dentro del género *Boeremia*, hasta el momento, mayo del 2022, podemos encontrar 22 especies y 12 variedades de *Boeremia exigua* enlistadas en la base de datos del Index Fungorum, en donde sólo dos, se reportan asociadas al café; *Boeremia coffeae* y *Boeremia exigua*.

4.1.1 Género *Boeremia*

El género *Boeremia* se caracteriza por presentar en su estado asexual, conidias de forma variable, desde aseptadas, hasta con dos septos, y en su estado sexual, presentan ascosporas elipsoidales con un septo (Kallol et al. 2021), cabe señalar que sólo hay un reporte de *Boeremia* con estado sexual, *B. lycopersici* (Chen et al. 2015; Jawardena et al. 2019).

Las especies de *Boeremia* están distribuidas por todo el mundo y se conocen como patógenos débiles oportunistas o parásitos de heridas de una gran variedad de plantas (Banerjee et al. 2020; Gomzhina et al. 2020; Jawardena et al. 2021) Algunas especies de *Boeremia* y variedades de *B. exigua* son específicas de sus plantas hospederas, cómo *B. coffeicola*, que es específica de plantas de café (Berner et al. 2015); mientras que otras parecen tener un rango de hospederos y sustratos altamente variados (Kowalski et al. 2019; Kallol et al. 2021). Aveskamp, Gruyter y Verkley, llegaron a reportar hasta 200 especies diferentes de plantas hospederas, dónde hongos de género *Boeremia*, producían síntomas de enfermedad como manchas marrones en las hojas, pudrición del tallo, y muerte regresiva o descendente de los brotes. Se forman lesiones hundidas de color marrón oscuro en la base de la planta y eventualmente se expanden para rodear el tallo, lo que resulta en un color amarillento y marchitamiento de las hojas más viejas. Esto conducirá a la muerte de la planta. (Koike et al. 2006).

5. ASPECTOS METODOLOGICOS

5.1. Giras de campo y Aislamientos

Se realizaron dos giras de recolección de muestras al distrito de Boquete el 16/08/2019 y 19/10/2019, y una gira al distrito de Volcán el 13/11/2019 (tabla 01), donde se recolectaron muestras de hojas de plantas de café, *Coffea arabica* var. Geisha con síntomas de la enfermedad (Fig.01) Las muestras se colocaron en bolsas plásticas y se transportaron refrigeradas con hielo en una hielera al laboratorio donde fueron procesadas. Las muestras se lavaron con agua del grifo y luego se cortaron trozos de tejido con síntomas en cuadrados de 2 mm para su procesamiento; se desinfectaron por inmersión en una solución de etanol al 70% durante 2 minutos y luego en una solución de hipoclorito de sodio al 0.03% durante tres minutos, finalmente se lavaron con agua destilada estéril y se colocaron en agar extracto de malta (MEA) al 2%, 16 piezas por plato petri y se cultivaron a temperatura ambiente (22-23°C) (Fig.02)

Los hongos que crecían a partir de los trozos de tejido lesionado, después de cinco días de crecimiento, se transfirieron a nuevos platos de 2% de MEA. Pasados siete días de crecimiento, se documentó fotográficamente los cultivos y se preservaron en glicerol al 10% y agua destilada estéril, para posteriores estudios morfológicos. Se observaron cultivos con diversas morfologías, pero hubo una que fue consistente en ambos sitios de muestreo. Para estudios detallados se seleccionaron los aislados DE46 y DE86 como representantes de la morfología consistente en el área del distrito de Boquete y el distrito de Volcán respectivamente.

Tabla 01. Información de Colecta

Localidad	Fecha de colecta	Colector	Variedad de café	Tejido	Fecha de Aislamiento
Finca El Velo (Hacienda La Esmeralda), Alto Quiel, distrito de Boquete, Chiriquí	16/08/2019	Luis C. Mejía / Ariel Raschella	Geisha	Hojas	27/08/2019
Finca El Velo (Hacienda la Esmeralda) Alto Quiel, distrito de Boquete, Chiriquí	19/10/2019	Marlon Núñez / Luis C. Mejía	Geisha	Hojas	28/10/2019
Finca Ninety Plus Geisha Estates, Silla de Pando, Volcán, Chiriquí	13/11/2019	Luis C. Mejía	Geisha	Hojas	23/11/2019

5.2. Descripción Morfológica.

Se tomaron los aislados DE46 y DE86 de los viales preservados y se pusieron a crecer en MEA al 2% por 10 días, de allí, se pasaron a platos de PDA, V8 y OA, cada cepa, haciéndolos crecer con un fotoperiodo de doce horas de luz y doce horas de oscuridad a temperatura ambiente, alrededor de 22-23°C, durante 15 días y se midió su crecimiento radial, así como se foto documento la morfología del estado anamorfo, se registró la forma del micelio, la coloración y la coloración del sustrato del medio luego de esos 15 días, con la ayuda de una paleta de colores (Rayner, 1970). También se realizaron placas al microscopio para foto documentar la presencia, tamaño y forma de las conidias con la ayuda de microscopio Olympus BX53 (Olympus, Tokyo Japón)

5.3. Pruebas de Patogenicidad

5.3.1. Ensayo *ex vivo*

Se llevó a cabo un ensayo *ex vivo* de inoculación de los aislados de hongos en hojas desprendidas de *Coffea arabica* var. Geisha, en cámara húmeda, para probar su patogenicidad; Se cortaron discos de agar con micelio en crecimiento activo del margen de un cultivo de 7 días en MEA al 2% de los aislados DE46 y DE86. Los discos se pusieron en contacto con la parte abaxial de hojas sanas desprendidas; de en un lado de la nervadura central, entre las venas secundarias, se colocaron dos discos de MEA al 2% por el lado del micelio, con 50 µL de agua esterilizada encima del disco de agar para humedecer el mismo y evitar sequedad, y se colocaron dos discos de MEA al 2% sin micelio en la lámina del otro lado de la nervadura central, entre las venas secundarias y encima 50 µl de agua

esterilizada (controles). Se inocularon cuatro hojas por cepa para un total de 8 puntos de contacto. Las hojas experimentales se colocaron dentro de una caja de plástico transparente con dimensiones de 45 x 75 x 25 cm, y esta se colocó dentro de una cámara de crecimiento de plantas (BIOBASE BJPX-P1500D, Shandong, China) que tenía los siguientes parámetros ambientales: 12 horas de luz, 12 horas de oscuridad, a 24°C, 75% de humedad relativa. (Fig.03) La humedad relativa, en el interior de la cámara de humedad, era alrededor del 90%.

5.3.2. Ensayo *in vivo*

Se inocularon plántulas de *Coffea arabica* var. Geisha de dos meses de edad (post germinación) con los aislados DE46, DE86, obtenidos de lesiones de campo.

Las inoculaciones se realizaron utilizando dos discos de PDA con micelio de 9 días de crecimiento del presunto patógeno en la parte abaxial de la hoja, a un lado de la nervadura principal, entre las venas secundarias, de hojas maduras seleccionadas y dos discos de control (PDA) en el otro lado de la nervadura principal por hoja (Fig.04). Se usaron hojas maduras, completamente expandidas y lignificadas. Se agregaron 10µL de agua destilada estéril al punto de contacto para la inoculación; no se realizó lesión mecánica. Los discos de agar se hicieron con un horador de 4 mm de diámetro, cabe señalar que primero se colocaron los controles de agar y luego se empezaron a colocar las cepas aisladas.

El experimento se realizó dentro de una cámara de crecimiento de plantas (BIOBASE BJPX-P1500D, Shandong, China) con condiciones ambientales controladas 85% HR, 22°C y fotoperíodo de 12h de luz y 12h de oscuridad (Fig.04); durante la primera noche, estuvieron dentro de una cámara húmeda con una HR alrededor del 90%.

5.4. Identificación Molecular y análisis Filogenéticos.

La extracción de ADN se realizó a partir de un cm² de micelio con siete días de crecimiento activo y se colocó en tubos de homogeneización de 1,5 ml que contenían perlas de cerámica estériles, matriz de lisis garnier (MP Biomedicals, Alemania), y 350 µL de solución de lisis y la homogeneización se llevó a cabo en un homogeneizador Power Lyzer 24 (Qiagen, EE. UU.) a 2100 rpm, durante dos minutos. Todos los demás procedimientos se realizaron según lo recomendado por el fabricante del kit de extracción de ADN de tejido Puregene (Qiagen, EE.UU.), se realiza luego una medición de concentración del ADN con un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, massachusetts USA).

Posteriormente, se realizó una PCR de punto final, amplificando la región interespacial ITS con cebadores ITS4 e ITS5 (White et al. 1990), y el locus que codifica para la subunidad ribosómica grande (LSU) de forma parcial con los cebadores P2, LR3, LR5 y LR7 (Guadet et al. 1989 ; Vilgalys y Hester 1990) bajo las siguientes condiciones: 25 µl de volumen total para la reacción, que contienen 5-15 ng de ADN genómico, 200 mM de cada dNTP, 2,5 unidades de Taq ADN polimerasa (QIAGEN, Alemania), 2 mM de cada cebador y tampón 10x con MgCl₂ 15mM; se utilizó el termociclador iCycler ABI 2720 (Applied Biosystems, EE.UU.) El ciclado térmico programado para la región ITS fue el siguiente: 5 min a 94°C, 35 ciclos de 45s a 94°C, 30s a 50°C, 10,5 min a 72°C, y un período final de extensión de 10 min a 72°C. El programa del termociclador para la región LSU fue el siguiente: 8 min a 95°C, 35 ciclos de 15s a 95°C, 20s a 55°C, 1 min a 72°C y un período de extensión final de 5 min a 72°C. Los productos amplificados se evidenciaron mediante electroforesis en gel ultrapura de agarosa (Invotrogen, USA) al 1.0-1.1 %, corrido a una potencia de 104 Watts / 45-50 minutos.

Los amplicones se purificaron con el Kit ExoSAP-IT (USB, Cleveland, EE. UU.) Siguiendo el protocolo del fabricante; el ADN purificado se utilizó en un nuevo ciclo de reacciones de secuenciación utilizando el kit BigDye Terminator v 3.1 (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad CA). El producto de esa reacción final se purificó utilizando el kit Big Dye Xterminator y posteriormente se secuenció con un analizador genético Applied Biosystems 3500 (Life Technologies, Carlsbad, CA).

La inferencia filogenética para el género *Boeremia* se realizó utilizando el gen ITS y el gen LSU. Todas las secuencias, obtenidas, fueron editadas con el programa Sequencher 5.1. Se realizó la alineación utilizando el programa CLUSTALW, en MEGA X (Tamura *et al.*, 2013). El árbol filogenético se construyó utilizando el método de Máxima Verosimilitud empleando, el modelo K2 para el gen ITS, modelo JC para el gen LSU y finalmente el modelo K2 para el árbol concatenado ITSxLSU, todos con 1,000 réplicas bootstrap, en el software MEGA X, los árboles luego se editaron utilizando el programa FigTree v1.4.4.



Figura 01. Lesiones en campo, en Boquete, Chiriquí. A. Campo de cultivo de Café en Boquete, Chiriquí. B-C. Hoja con necrosis, mancha marrón, D. Brote nuevo con clorosis y necrosis del brote de un nuevo tallo.

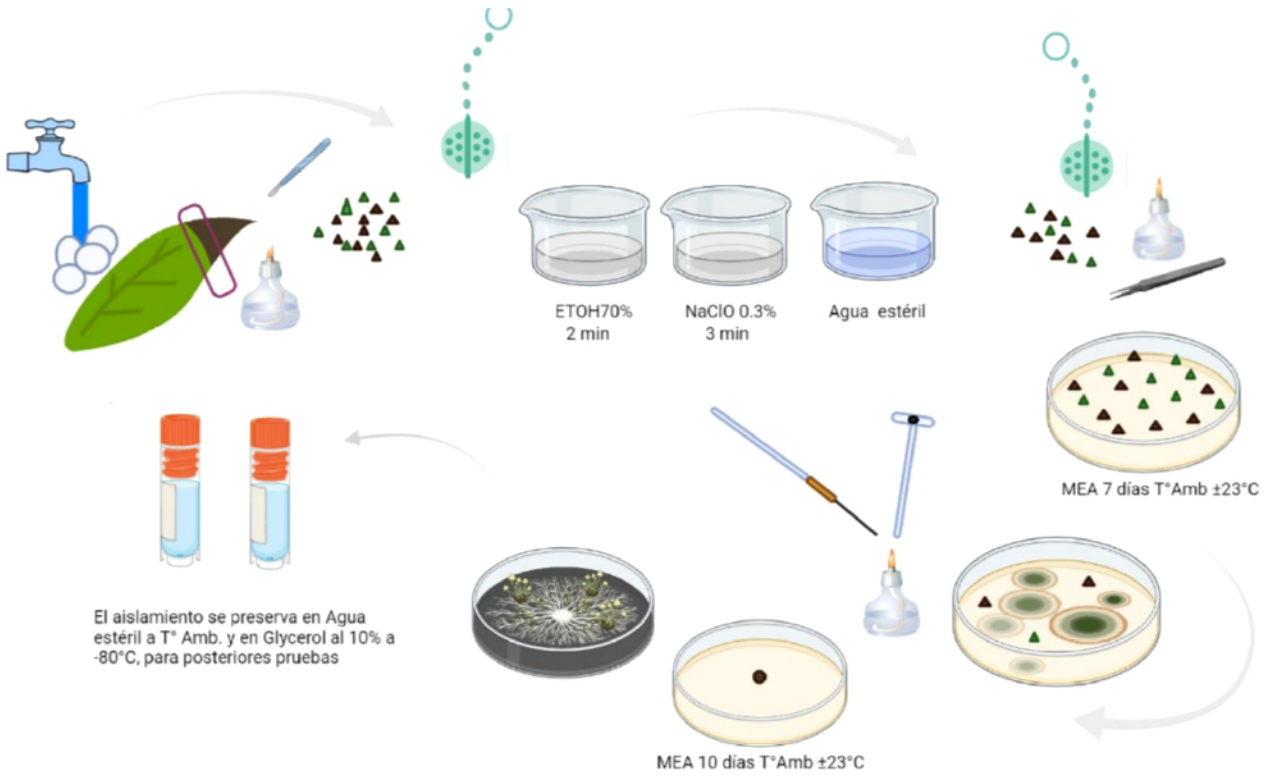


Figura 02. Diagrama de aislamiento de hongo a partir de lesiones. Diagrama del flujo del trabajo para el aislamiento del patógeno presunto responsable de las lesiones de derrite en café de altura de tierra altas de Chiriquí.

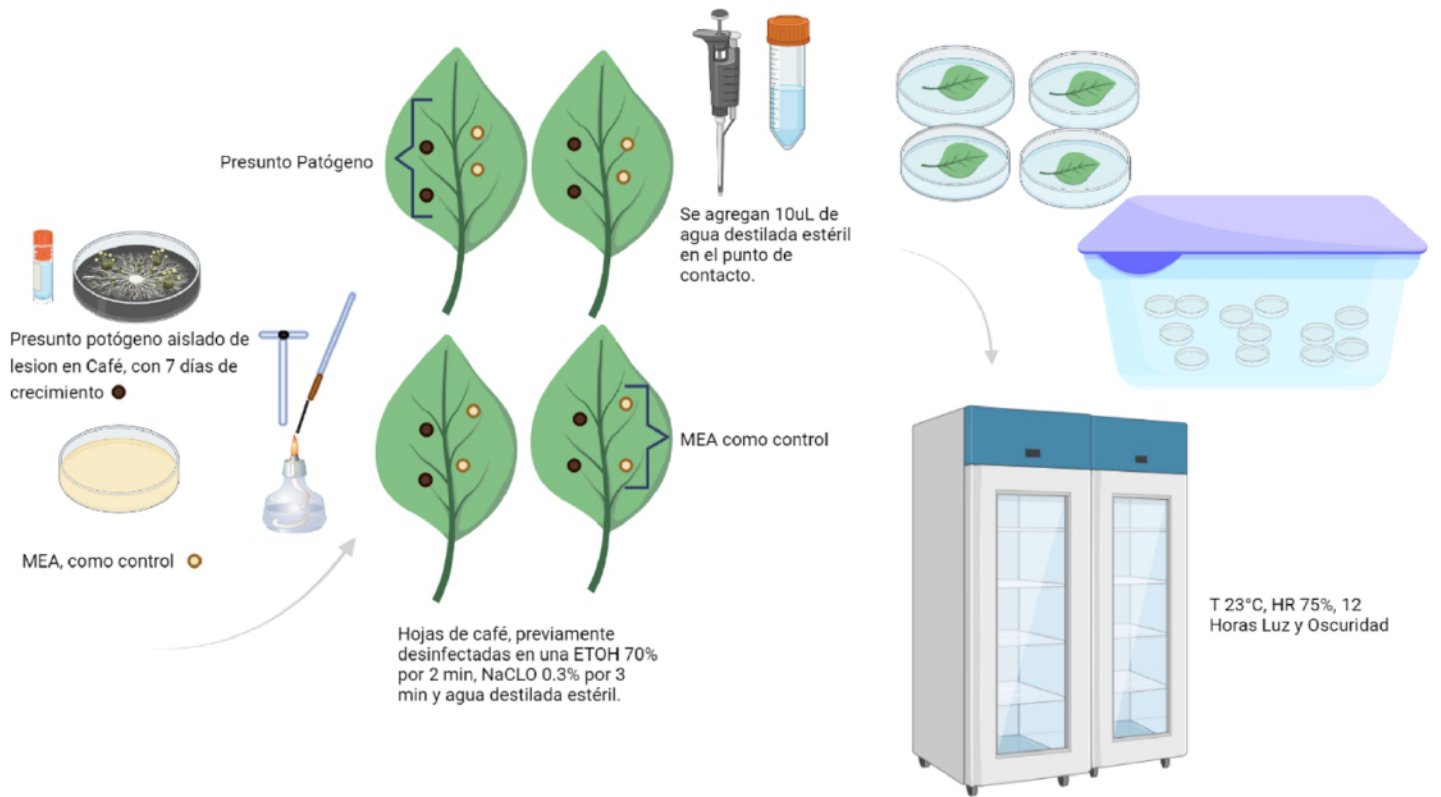


Figura 03. Prueba de Patogenicidad – Ensayo *ex vivo*. Diagrama del flujo del trabajo en la prueba de patogenicidad, para evidenciar la capacidad de generar lesiones en hojas sueltas por parte del hongo aislado.

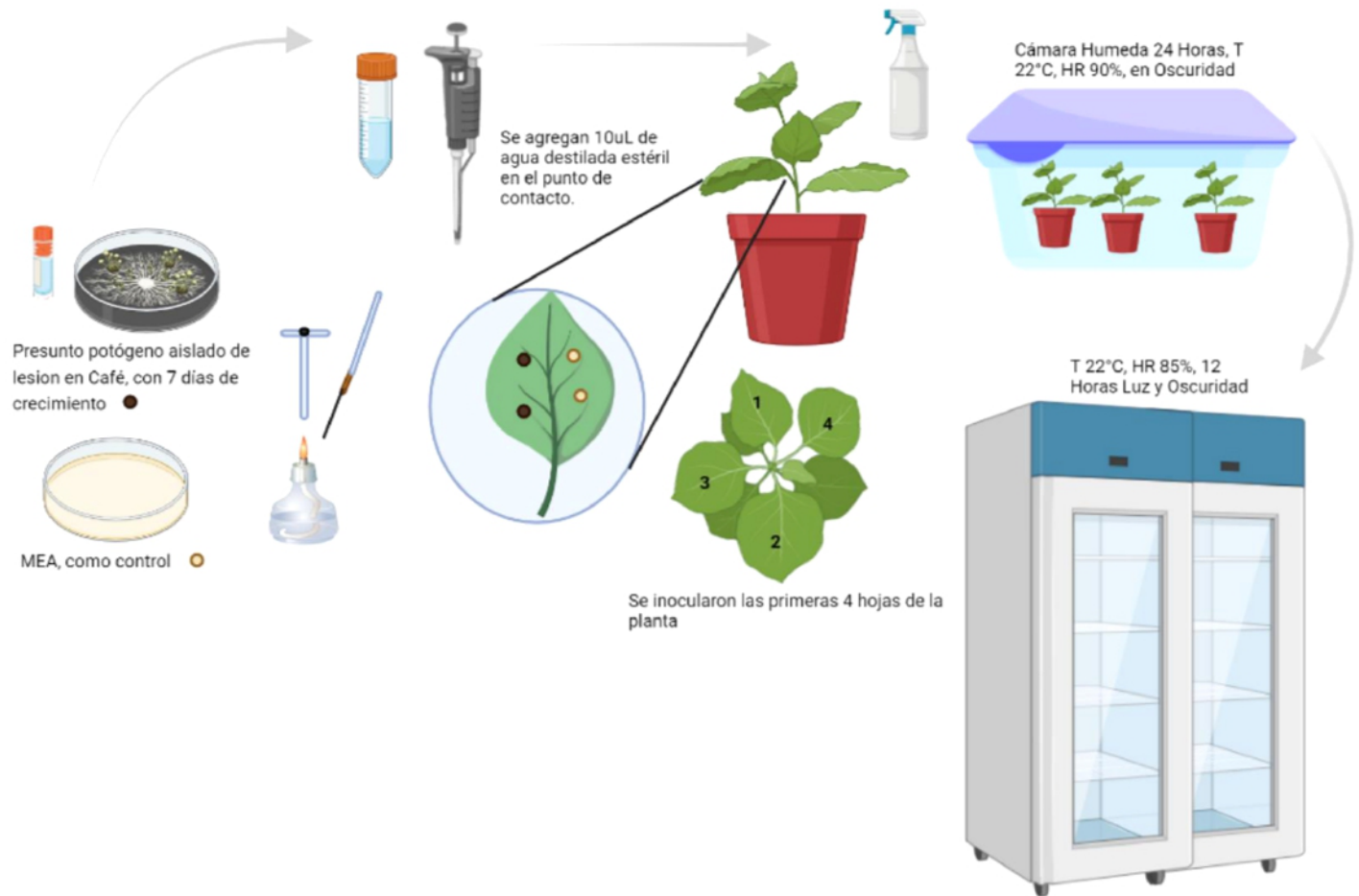


Figura 04. Prueba de patogenicidad. Ensayo *in vivo*. Diagrama del flujo de trabajo, durante la prueba *in vivo*, para demostrar que el hongo aislado, era capaz de generar lesiones en plantas.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Aislamientos

De las 3 giras, de trabajo se lograron obtener 96 aislados, donde hubo una morfología predominante y consistente en ambos sitios de muestreo. Se escogió un aislado con la morfología predominante en cada sitio, el aislado DE46 proveniente de El Velo, del distrito de Boquete y el aislado DE86, proveniente de Silla de Pando en el distrito de Tierras Altas; con estos dos aislados se realizaron todos los ensayos posteriores.

6.2. Descripción Morfológica basada en aislados DE86 y DE46

El crecimiento en OA a los 15 días a 22°C mostró una forma de crecimiento en el plato redondeada, con micelio elevado y margen ciliado, la coloración del micelio usando la paleta de colores de Raynier 1970, fue vinacio pálido (85 pale vinaceus) con beige (45 buff color), y el sustrato color beige vinacio (86 vinaceous buff) con centro marrón vinacio (84 Brown Vinaceus). El promedio de crecimiento radial a los 7 días fue de 30 mm y a los 15 días de 48 mm.

El crecimiento en PDA a los 15 días a 22°C mostro una forma de crecimiento en el plato redondeada, con micelio elevado y margen ciliado; el color del micelio usando la paleta de colores de Raynier 1970, fue vinacio pálido (85 Pale vinaceous) y el color del sustrato fue beige vinacio (86 vinaceous buff). El promedio de crecimiento radial a los 7 días fue de 54.5 mm y a los 15 días 65.5 mm.

El crecimiento en V8 a los 15 días a 22°C mostro una forma de crecimiento en el plato redondeada, con micelio elevado y margen ciliado; el color del micelio usando la paleta de

colores de Raynier 1970 fue, rosado beige (61. Rosy Buff), no coloreo el sustrato. El promedio de crecimiento radial a los 7 días fue de 28 mm y a los 15 días 66 mm.

Se observó esporulación y formación de conidias de forma variable en el aislado DE86, cuyas conidias eran ovoides a elipsoides y hyalinas, con una medida de 2.95-6.81 μm de largo y 1.1-2.0 μm de ancho, siendo las esporas más pequeñas reportadas dentro del grupo *Boeremia*. (Fig.05)

6.3 Pruebas de Patogenicidad

6.3.1 Ensayo *ex vivo*.

Las pruebas *ex vivo*, en la cámara húmeda, demostraron la capacidad de ambas cepas aisladas de generar lesiones en hojas sueltas de plantas de *Coffea arabica* var. Geisha, generando lesiones evidentes desde las 48 horas, en todos los 8 puntos de contacto de cada ensayo, no así, en ningún disco de agar control. (Fig.06)

6.3.2 Ensayo *in vivo*.

Durante el ensayo *in vivo*, no se generaron lesiones en ninguno de los 8 puntos de contacto de la cepa DE46, durante los días de realización del experimento, sin embargo, la cepa DE86, genero lesiones evidentes a partir de las 72 horas en 4 puntos en contacto de los 8 puntos; ningún disco de control genero lesión alguna en ningún punto de contacto. (Fig.07).

Un factor importante para tener en cuenta para la invasión del hongo dentro del tejido foliar es la presencia de daño mecánico, producto del viento, insectos, animales o caficultores que pasan por el cafetal. En el caso del agente etiológico del derrite *Phoma costaricensis*, el daño mecánico es parte del ciclo de la infección (Gil-Vallejo et. al. 2010) Experimentalmente, mediante ensayos *ex vivo*, ambos aislados probados generaron

lesiones, sin necesidad de generar lesión mecánica, sin embargo, en el ensayo *in vivo*, sólo un aislado fue capaz de penetrar en el tejido foliar, posiblemente por las estomas que se abrieron durante la primera noche dentro de la cámara húmeda con una HR relativa alta, alrededor del 90% que propicio la apertura de las estomas.

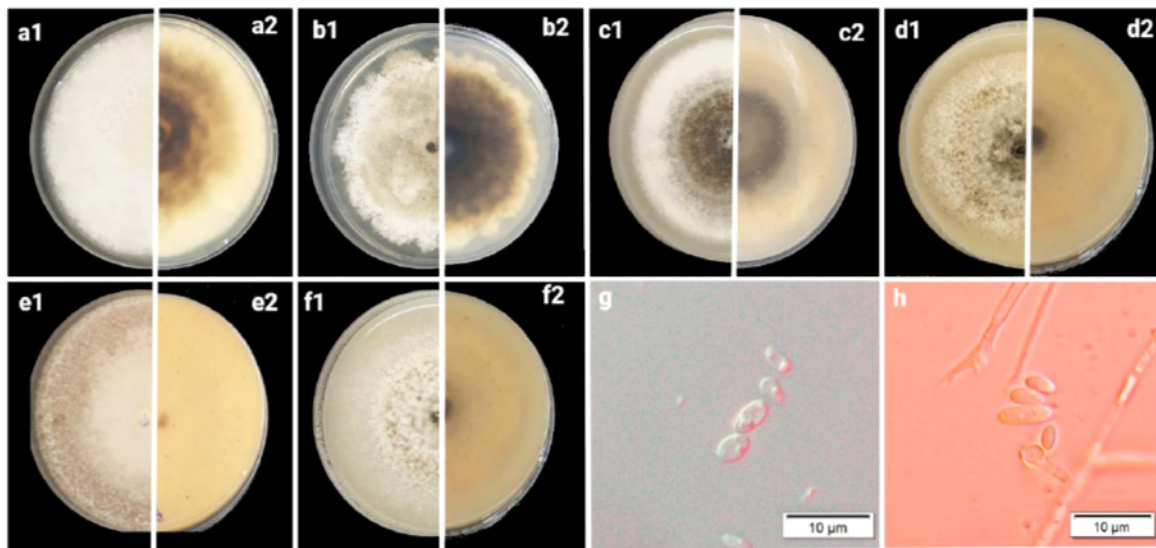


Fig.05. Morfología en cultivo puro de Hongo Patógeno Aislado y Conidia. a1-a2 DE46 en PDA, adelante/detrás. b1-b2 DE86 en PDA, adelante/detrás. c1-c2 DE46 en OA, adelante/detrás. d1-d2 DE86 en OA, adelante/detrás. e1-e2 4E86 en V8, adelante/detrás. f1-f2 DE86 en V8, adelante/detrás. g-h Conidias

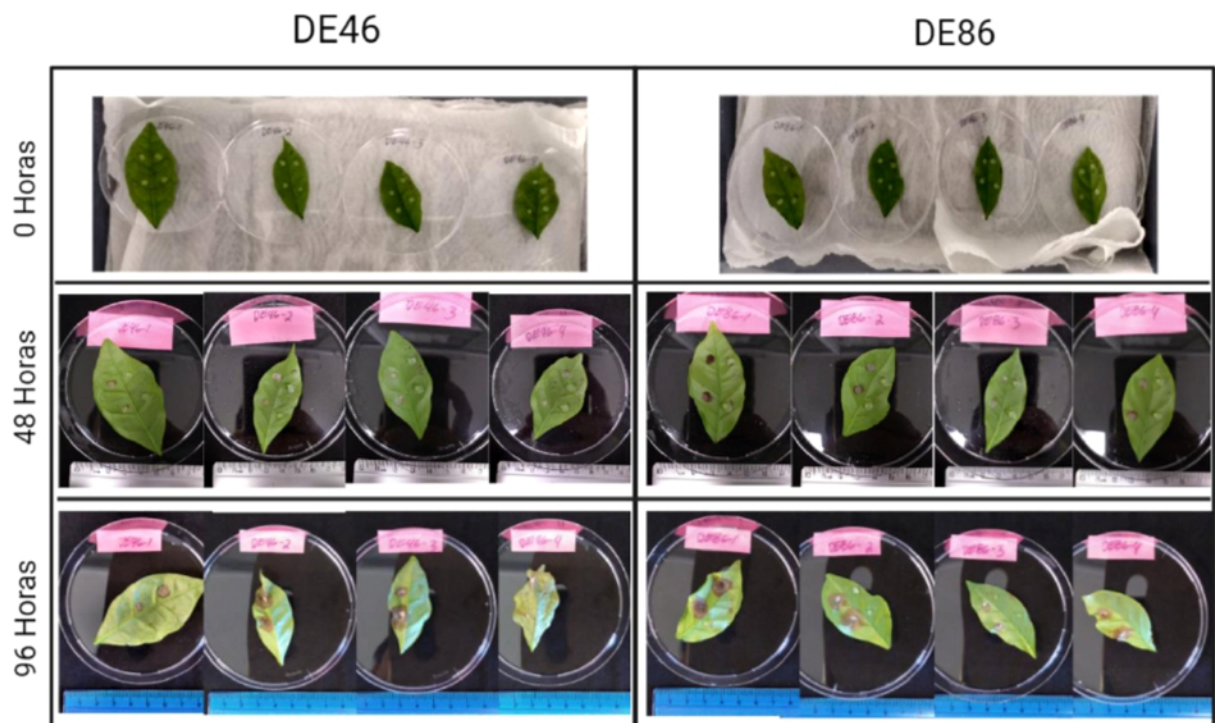


Figura 06. Prueba de Patogenicidad. Ensayo *ex vivo*, resultados. Lesiones provocadas por ambos aislados en el paso del tiempo, en hojas de *Coffea arabica* var. Geisha, desde las 48 horas de inicio del experimento.



Figura 07. Prueba de patogenicidad Ensayo *in vivo*, Resultados. a.1 Armado de cámara húmeda inicial para que se dé la infección. a.2. Discos de agar con micelio (2) y discos de agar control (2). b. Cepa DE46 1. Día 0. 2. Día 3. c. Cepa DE86 1. Día 0, 2. Día 3.

6.4. Identificación Molecular, Análisis filogenéticos

El uso de ITS como un código de barras para la identificación de hongos, históricamente ha sido el más practicado en varios grupos taxonómicos (Seifert, 2009), sin embargo, el uso de ITS por sí sólo no es suficiente para tener clara resolución en la definición entre especies. Para poder establecer la familia *Didymellaceae*, se emplearon combinaciones de otros marcadores como LSU e ITS con β -TUB (De Gruyter et al. 2009) luego se sumaron más loci de ADN como el gen de la subunidad grande de la ARN polimerasa II (RPB2) (Aveskamp et al. 2010).

En este estudio, utilizamos una combinación de datos moleculares y morfológicos. La filogenia basada en los análisis del locus ITS (Fig.08), locus LSU (Fig.09) y concatenado de ambos loci (Fig.10), ubican a los especímenes aislados DE46 y DE86, en un mismo clado, altamente relacionados como miembros de una misma especie y distinta a otras especies conocidas de *Boeremia*. A pesar de que los valores bootstrap obtenidos aquí son bajos, algunos clados reflejan la topología y relaciones filogenéticas aceptadas para este género y obtenidas con análisis de más genes (Jayawardena et al 2019). Por ejemplo, la relación entre *B. strasseri*, *B. liacis*, y *B. crinicola*.

Desde el aspecto taxonómico, la característica particular de sus esporas, notablemente pequeñas frente a las especies más estrechamente relacionadas (ver tabla 02), nos llevan a sugerir de que se trata en efecto de una nueva especie de *Boeremia*. Sin embargo, es necesario secuenciar y analizar más loci para lograr un mayor apoyo a las relaciones filogenéticas.

Considerando los resultados de este trabajo, se sugiere realizar un muestreo en otras localidades donde se produce café de atura en Panamá, para determinar la prevalencia de

la enfermedad en el país al igual que la de Derrite causada por *P. costaricensis*. Observaciones recientes sobre la morfología de estructuras reproductivas (picnidios) en lesiones tipo Derrite colectadas en el Velo sugieren la presencia simultánea de *P. costaricensis* en la zona, sin embargo, se requieren más estudios para confirmar su identidad. Un sistema de vigilancia fitosanitaria que le dé seguimiento a estas y otras patologías del café en el país es recomendado ya que este rubro agrícola es de alta importancia para el país y ayudaría a estar mejor preparados para manejar estas amenazas.

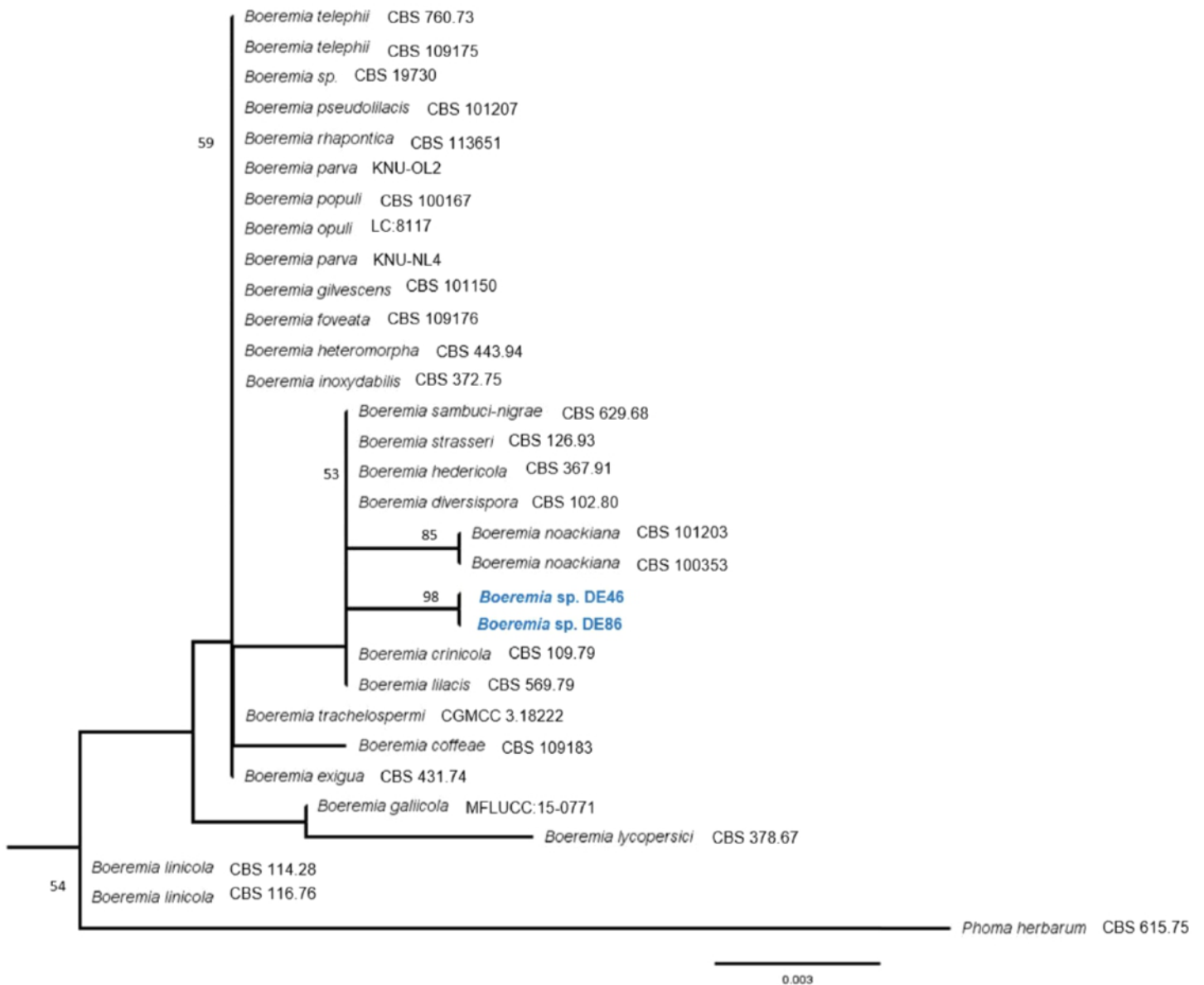


Figura 08. Árbol Filogenético de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood, ML score = -2383.29) estimado a partir de secuencias de locus ITS para 22 especies descritas y dos sin describir de *Boeremia* y usando *Phoma herbarum* como grupo externo. Valores bootstrap de 50 o más aparecen arriba de las ramas.

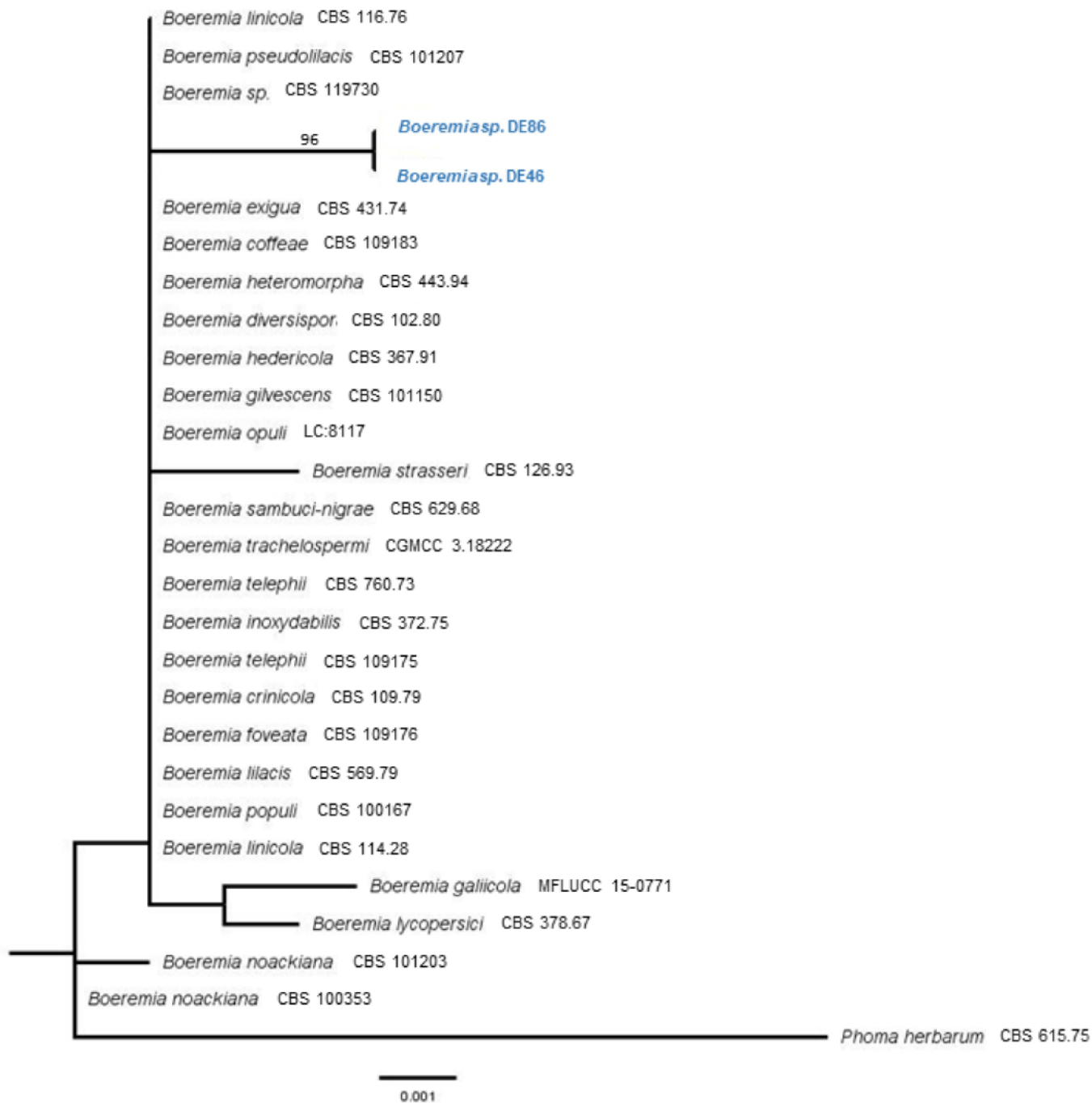


Figura 09. Filogenético de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood, ML score = (-1569.00) estimado a partir de secuencias de los locus LSU para 22 especies descritas y dos sin describir de *Boeremia* y usando *Phoma herbarum* como grupo externo. Valores bootstrap de 50 o más aparecen arriba de las ramas.

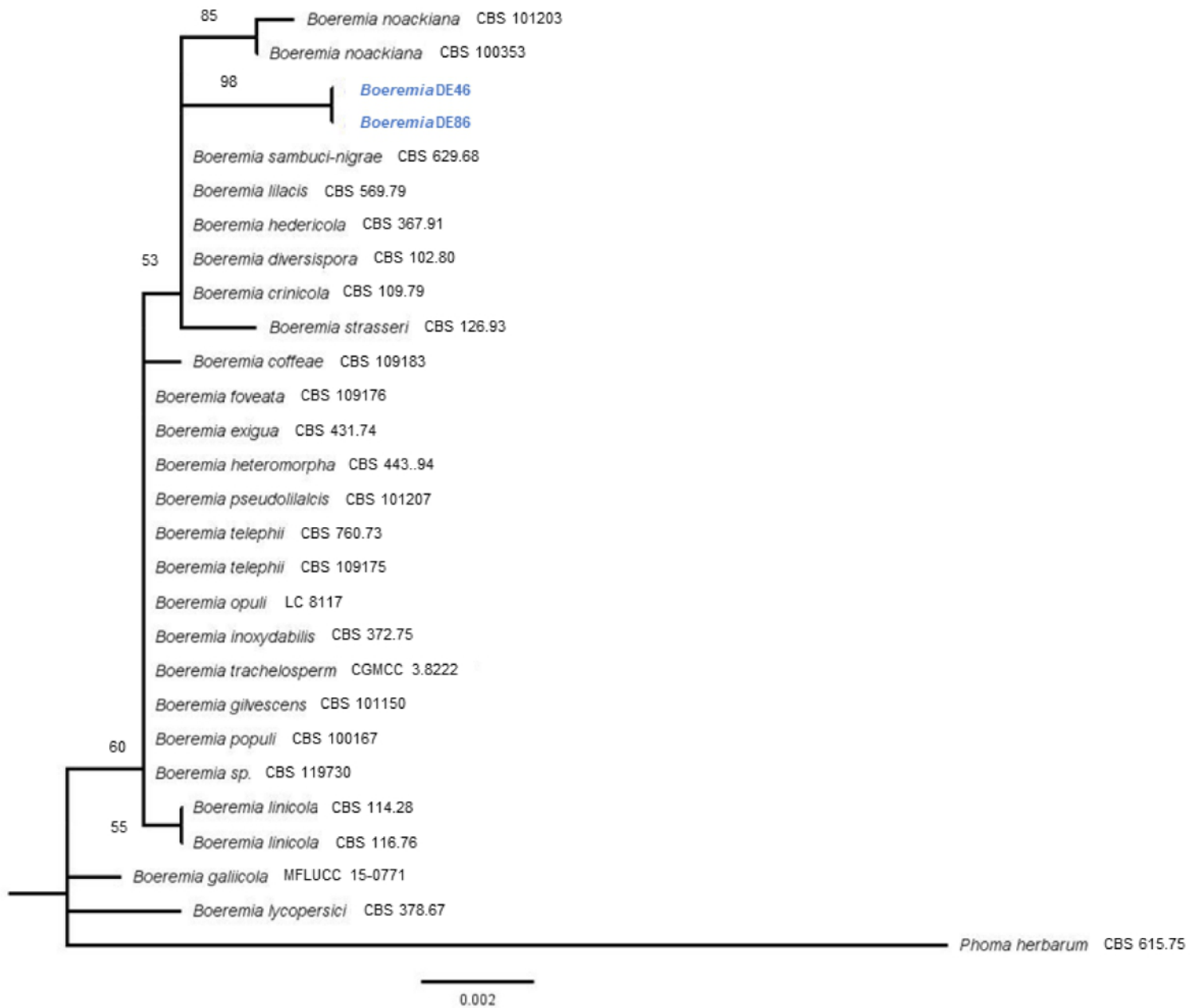


Figura 10. Árbol Filogenético de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood, ML score = -2383.29) estimado a partir de secuencias de los loci ITS y LSU para 22 especies descritas y dos sin describir de *Boeremia* y usando *Phoma herbarum* como grupo externo. Valores bootstrap de 50 o más aparecen arriba de las ramas.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El hongo patógeno aislado, a partir de lesiones en plantas de *Coffea arabica*, var. Geisha en Chiriquí, es una nueva especie dentro del género *Boeremia*, que genera lesiones foliares similares a quema o derrite en el café en campo y en condiciones controladas de crecimiento de laboratorio, en ensayos *ex vivo* e *in vivo*.
- Recomendamos realizar un muestreo en otras localidades donde se produce café de atura en Panamá, para determinar la prevalencia de la enfermedad en el país.
- La temperatura óptima de 22°C para el crecimiento de *Boeremia sp.* (DE46 y DE86) en laboratorio, sugiere que este hongo se ve favorecido en pisos altitudinales más altos para producción de café, por arriba de los 1400msnm, en dónde se alcanza esta temperatura, lo cual brinda el ambiente propicio para su desarrollo.
- Es necesario secuenciar y analizar más loci para lograr un mayor apoyo a las relaciones filogenéticas obtenidas y mejorar la resolución las relaciones entre los hongos analizados.

8. BIBLIOGRAFIA

- Aveskamp, M.M., Woudenberg, J.H.C., de Gruyter, J., Turco, E., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. 2009. Development of taxon-specific sequence characterized amplified region (SCAR) markers based on actin sequences and DNA amplification fingerprinting (DAF): a case study in the *Phoma exigua* species complex. *Molecular Plant Pathology* 10 (3): 403–414.
- Aveskamp, M. M., de Gruyter, J., Woudenberg, J. H., Verkley, G. J., & Crous, P. W. 2010. Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in mycology*, 65, 1–60. <https://doi.org/10.3114/sim.2010.65.01>
- Banerjee A. and Panja B. First report of *Boeremia exigua* var. *exigua* as a pathogen of *Cycas circinalis* in India. 2020. *J Plant Pathol* 102, 935–936. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00514-5>
- Barquero M., Robles A., Hidalgo M., Chacón M., Gamboa A. 2014. Aggressiveness of *Phoma* and *Colletotrichum* Isolates in Los Santos Region of Costa Rica. Conference: 25th International Conference on Coffee Science At: Armenia, Colombia.
- Berner, D., Cavin, C., Woudenberg, J.H.C., Tunalı, B., Büyük, O. & Kansu, B. 2015. Assessment of *Boeremia exigua* var. *rhapontica*, as a biological control agent of Russian knapweed (*Rhaponticum repens*). *Biological Control* 81: 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11.009>

- Boerema, G.H., de Gruyter, J., Noordeloos, M.E. & Hamers, M.E.C. 2004. Phoma identification manual. Differentiation of specific and infra-specific taxa in culture. CABI Publishing, Wallingford, 470 pp.
- Chen Q., Jiang J.R., Zhang G.Z., Cai L., Crous P.W. 2015. Resolving the Phoma enigma. *Studies in Mycology*, Volume 82, Number 1, 1 September 2015, pp. 137-217(81). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.10.003>
- Chen Q., Hou L.W., Duan W.J., Crous P.W., Cai L. 2017. Didymellaceae revisited. *Studies in Mycology*, Volume 87, Number 1, 1 June 2017, pp. 105-159(55). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.06.002>
- Comisión de Asuntos Agropecuarios, Anteproyecto de Ley 331, 2019. que incentiva la producción de Café en Panamá. Sección 0815-01603 Panamá, exposición de motivos.
- Crous P., Gams W., Stalpers J., Robert V. and Stegeuis G. 2004. 'MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century'. *STUDIES IN MYCOLOGY* 50: 19–22
- de Gruyter, J., Aveskamp, M. M., Woudenberg, J. H., Verkley, G. J., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. 2009. Molecular phylogeny of Phoma and allied anamorph genera: towards a reclassification of the Phoma complex. *Mycological research*, 113 (Pt 4), 508–519. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.01.002>
- Echandi E. 1957. 'La Quema de los cafetos causada por *Phoma costarricensis* nsp'. *Rev. Biol. Trop.* 5 (1) :81-102.

- Gil-Vallejo. L. y Leguizamón-Caicedo J. 2010. “La muerte descendente del Cafeto”. CENICAFÉ, Avances Tec. 278.
- Gomzhina, M., Gasich E., Khlopunova L., and Gannibal P. 2020. New species and new findings of phoma-like fungi (Didymellaceae) associated with some Asteraceae in Russia. *Nova Hedwigia*. 111.
DOI:10.1127/nova_hedwigia/2020/0586.
- Hou, L.W., Groenewald, J.Z., Pfenning, L.H., Yarden, O., Crous, P.W., Cai, L. 2020. The phoma-like dilemma. *Studies in Mycology*, Volume 96, Number 1, 1 June 2020, pp. 309-396(88). DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.001>
- Jayasiri SC, Hyde K.D., Jones E.B., Jeewon R, Ariyawansa H.A., Bhat J.D., Camporesi E. and Kang J.C. 2017. Taxonomy and multigene phylogenetic evaluation of novel species in *Boeremia* and *Epicoccum* with new records of *Ascochyta* and *Didymella* (Didymellaceae). *Mycosphere* 8(8): 1080–1101 (2017) www.mycosphere.org. Doi 10.5943/mycosphere/8/8/9.
- Kallol D., Leonid N. T., Jae-Ho B., Seunug-Yeol L. and Hee-Young J. 2021. *Boeremia parva* sp. nov., a novel species of the family Didymellaceae isolated from soil. *Phytotaxa*, Vol. 518 No. 1: 31 August 2021. DOI:
<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.518.1.3>
- Koike, S.T., Subbarao, K.V., Verkley, G.J., Fogle, D. & O’Neil, T.M. 2006. Phoma basal rot of Romaine lettuce in California caused by *Phoma exigua*: Occurrence, characterization, and control. *Plant Disease* 90 (10): 1268–1275.
<https://doi.org/10.1094/PD-90-1268>

- Kowalski, T., Kraj, W., Bednarz, B. Rossa R. 2019. The association of *Boeremia lilacis* with necrotic lesions on shoots and leaf petioles and its pathogenicity towards *Fraxinus excelsior*. *Eur J Plant Pathol* 154, 961–974 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01715-0>
- MIDA. 2011. Caracterización del Sistema Productivo de café en Tierras Altas de la provincia de Chiriquí. PRONAZA.
- Murga-Orillo H., Manuel F., Abanto-Rodriguez C., De Almeida F. 2021. Gradiente altitudinal y su influencia en las características edafoclimáticas de los bosques tropicales. *Madera y bosques*, vol. 27, núm. 3, e2732271, 2021. DOI: <https://doi.org/10.21829/myb.2021.2732271>
- Rai, M.K., Tiwari, V.V., Irinyi, L. 2014. Advances in Taxonomy of Genus *Phoma*: Polyphyletic Nature and Role of Phenotypic Traits and Molecular Systematics. *Indian J Microbiol* 54, 123–128. <https://doi.org/10.1007/s12088-013-0442-8>
- Rayner R.W., 1970. *Mycological color chart*. Commonwealth Mycological Institute (Great Britain); British Mycological Society.
- Redacción mi diario. Tomado el 18 de septiembre de 2020 ‘Café Panameño rompe récord de ventas’.
- Rhiney, K., Guido, Z., Knudson, C., Avelino, J., Bacon, C. M., Leclerc, G., Aime, M. C., & Bebbler, D. P. (2021). Epidemics and the future of coffee production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(27), e2023212118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2023212118>

- Seifert A. Keith. Barcoding Fungi, Progres toward DNA Barcoding of fungi. 2009. *Molecular Ecology Resources* (2009) 9 (Suppl. 1), 83–89. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02635.x
- Senasica. 2014. Ficha Técnica No.47 Quema o derrite del cafeto. Dirección general de sanidad vegetal. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. ISBN: 978-607-715-245-3
- Vilgalys, R., & M. Hester. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of bacteriology*, 172(8), 4238-4246.
- White T. J, T. Bruns, S. Lee & J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.
- Zimouska B., Krol E.D., Furmanczyk A., Abramczyk B., Okon S. 2018. Molecular characterization of *Boeremia strasseri* the causal agent of black stems and rhizomes rot of peppermint. *Journal of plant pathology*. 100:13-24. DOI: 10.1007/s42161-018-0003-4

ANEXOS

Tabla 02. Lista de los especímenes usados en los análisis filogenéticos en este trabajo

Espece	Cepa	LSU	ITS	Hospedero/Substrato	Pais
<i>Boeremia coffeae</i>	CBS 109183	GU237943	GU237748	Rubiaceae	Cameroon
<i>B. crinicola</i>	CBS 109.79	GU237927	GU237737	<i>Crinum powellii</i>	Netherlands
<i>B. diversispora</i>	CBS 102.80	GU237930	GU237725	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Kenya
<i>B. exigua</i>	CBS 431.74	EU754183	FJ427001	<i>Solanum tuberosum</i>	Netherlands
<i>B. foveata</i>	CBS 109176	GU237946	GU237742	Solanaceae	Bulgaria
<i>B. galiicola</i>	MFLUCC 15-0771*	KX698026	KX698037	dead stem of <i>Galium</i>	Italy
<i>B. gilvescens</i>	CBS 101150*	EU754182	GU237715	<i>Cichorium intybus</i>	Netherlands
<i>B. hedericola</i>	CBS 367.91*	GU237949	GU237842	Araliaceae	Netherlands
<i>B. heteromorpha</i>	CBS 443.94*	GU237935	GU237866	<i>Nerium oleander</i>	Italy
<i>B. inoxydabilis</i>	CBS 372.75	MH872672	KY484656	<i>Vinca minor and Vinca major</i>	Europe and North America
<i>B. lilacis</i>	CBS 569.79	GU237936	GU237892	<i>Syringa vulgaris</i>	Netherlands
<i>B. linicola</i>	CBS 114.28	GU237937	GU237752	<i>Linum usitatissimum</i>	Netherlands
<i>B. linicola</i>	CBS 116.76*	GU237938	GU237754	<i>Linum usitatissimum</i>	Russian Federation
<i>B. lycopersici</i>	CBS 378.67	GU237950	GU237848	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Netherlands
<i>B. noackiana</i>	CBS 101203	GU237953	GU237720	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Colombia
<i>B. noackiana</i>	CBS 100353	GU237952	GU237710	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Guatemala
<i>B. opuli</i>	LC 8117*	KY742199	KY742045	Caprifoliaceae	USA
<i>B. parva</i>	KNU-NL4		LC557019	Soil	Korea
<i>B. parva</i>	KNU-OL2		LC557020	Soil	Korea
<i>B. populi</i>	CBS 100167	GU237939	GU237707	Salicaceae	Netherlands
<i>B. pseudolilacis</i>	CBS 101207*	GU237941	GU237721	<i>Syringa vulgaris</i>	Netherlands
<i>B. rhapontica</i>	CBS 113651*		KY484662	<i>Rhaponticum repens</i>	Turkey
<i>B. sambuci-nigrae</i>	CBS 629.68*	GU237955	GU237897	<i>Sambucus nigra</i>	Netherlands
<i>Boeremia</i> sp.	CBS 119730	GU237942	GU237759	<i>Coffea arabica</i>	Brazil
<i>Boeremia</i> sp.	DE46		MH931264.1	<i>C. arabica</i> var. Geisha	Panama
<i>Boeremia</i> sp.	DE86		MN540289.1	<i>C. arabica</i> var. Geisha	Panama
<i>B. strasseri</i>	CBS 126.93	GU237956	GU237773	<i>Mentha</i> sp.	Netherlands
<i>B. telephii</i>	CBS 760.73	GU237959	GU237905	<i>Sedum telephium</i>	Netherlands
<i>B. telephii</i>	CBS 109175	GU237958	GU237741	<i>Sedum telephium</i>	Netherlands
<i>B. trachelospermi</i>	CGMCC 3.18222*	KY064032	KY064028	<i>Trachelospermum jasminoides</i>	USA
<i>Phoma herbarum</i>	CBS 615.75	KT389753	KT389535	<i>Delphinium</i> sp.	Netherlands

Las cepas en negrita son cepas de referencia o ex-tipo (ex-epitipo) si están en negrita y marcadas con*

Tabla 03. Comparación morfológica de especies de *Boeremia*.

Especie	Descripción morfológica de cultivo y conidias	Talla		Hospedero/Sustrato	País	Número de acceso	Fecha de aislamiento/Colector
		Largo	Ancho				
<i>B. lilacis</i>	exudado conidial salmón o melocotón de colores. Conidios aseptados $5,0-8,0 \times 2,5-3,5 \mu\text{m}$, rara vez 1-septados $8,0-10,0 \times 3,0-4,0 \mu\text{m}$, elipsoidales, generalmente con pequeñas gutículas	5.0-8.0	2.5-3.5	<i>Syringa vulgaris</i>	Holanda	GU237892	1880. Saccardo
<i>B. sambucini-grae</i>		6.0-8.0	3.0-3.5	<i>Sambucus nigra</i>	Holanda	GU237897	1884. Saccardo
<i>B. hedericola</i>	las conidias son epífilas y tienen un borde oscuro alrededor de la abertura; las conidias miden $2-4,5 \times 4-9 \mu\text{m}$.	4.0-9.0	2.0-4.5	Araliaceae	Holanda	GU237842	1849. Durieu & Mont.
<i>B. diversispora</i>	Esporas de formas muy diferentes, cilíndricas, oblongas, elipsoidales, ovalados, en forma de galleta o frijol, en los extremos redondeados, cónicos o expandidos, con 2 gotas polares o más dispersas de aceite, $4,5-8$, más raramente $9 \mu\text{m}$ de largo, $2,0-3,5$ de ancho, hialinas.	4.5-8.0	2.0-3.5	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Kenya	GU237725	1905. Bubák
<i>B. crinicola</i>	Conidias de elipsoidales a cilíndricas, sin o con 2 o más pequeñas gutículas, generalmente polares.	3.8-6.4	1.8-2.8	<i>Crinum powellii</i>	Holanda	GU237737	1923. Siemasko.
<i>B. strasseri</i>	Conidios elipsoidales a cilíndricos, hialinos, de paredes delgadas, lisos, aseptados, $4-7 \times 2-3 \mu\text{m}$, con 2-4 gutículas polares	4.0-7.0	2.0-3.0	<i>Mentha</i> sp.	Holanda	GU237773	1924. Moesz
<i>B. Nockiana</i>	Conidias elipsoidales a oblongas, a veces alantoideas, hialinas, de paredes delgadas, lisas, principalmente aseptadas, de $4,5$ a $8,5 \times 2$ a $3 \mu\text{m}$, pero ocasionalmente 1 septadas, de 8 a $13 \times 3,5$ a $5 \mu\text{m}$, con pequeñas gutículas. Matriz conidial amarillenta.	4.5-8.5	2.0-3.0	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Colombia	GU237710	1898. Allesch
<i>B. parasitica</i> sp. nov. Nom	Las conidias son de forma variable, ovoides a predominantemente oblongas y hialinas, con una medida de $6.81-2.95 \mu\text{m}$ de largo y $1.1-2.0 \mu\text{m}$ de ancho. El crecimiento en OA a los 15 días a 22°C fue de forma redondeada, micelio elevado, con margen ciliado	2.9-6.8	1.1-1.9	<i>Coffea arabica</i> var. Geisha	Panamá	MN540289.1	2019 - Marlon J. Núñez & Luis C. Mejía

Dimensiones de diferentes cepas del género *Boeremia*, en dónde nuestra nueva cepa aislada, *Boeremia* sp. resalta por tener las conidias más pequeñas.

Tabla 04. Concentraciones de ADN

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor	Taxonomia ITS BLAST
1	DE04	NANODROP2000	12/1/2019 3:27:35 PM	10.9	ng/μl	0.217	0.113	1.93	1.13	DNA	50	Colletotrichum escovillei
2	DE07	NANODROP2000	11/16/2019 4:49:40 PM	183.1	ng/μl	3.661	1.922	1.9	1.12	DNA	50	
3	DE40	NANODROP2000	12/1/2019 3:28:25 PM	35.6	ng/μl	0.713	0.394	1.81	0.9	DNA	50	Didymella sp. strain HFS3-7-MA
4	DE46	NANODROP2000	11/16/2019 4:50:27 PM	224.7	ng/μl	4.494	2.388	1.88	0.98	DNA	50	Boeremia sp. isolate m9
5	DE60	NANODROP2000	11/16/2019 4:51:12 PM	128.4	ng/μl	2.568	1.299	1.98	1.35	DNA	50	Boeremia sp. isolate m9
6	DE62	NANODROP2000	11/16/2019 4:51:48 PM	2.5	ng/μl	0.051	0.015	3.37	-0.79	DNA	50	
7	DE70	NANODROP2000	11/16/2019 4:52:23 PM	-20.6	ng/μl	-0.411	-0.036	11.32	0.2	DNA	50	
8	DE74	NANODROP2000	11/16/2019 4:52:59 PM	97.7	ng/μl	1.954	0.937	2.08	1.61	DNA	50	
9	DE75	NANODROP2000	11/16/2019 4:53:35 PM	149.2	ng/μl	2.985	1.411	2.12	1.74	DNA	50	Fusarium lateritium strain LCM 866.01
10	DE79	NANODROP2000	11/16/2019 4:53:59 PM	238.8	ng/μl	4.776	2.298	2.08	1.8	DNA	50	Colletotrichum gloeosporioides voucher ZH01
11	DE81	NANODROP2000	11/16/2019 4:54:39 PM	485.1	ng/μl	9.702	5.268	1.84	1.09	DNA	50	Colletotrichum gloeosporioides voucher ZH01
12	DE82	NANODROP2000	11/16/2019 4:55:10 PM	252.2	ng/μl	5.043	2.518	2	1.44	DNA	50	
13	DE84	NANODROP2000	11/16/2019 4:55:42 PM	93	ng/μl	1.859	0.897	2.07	1.83	DNA	50	Colletotrichum boninense strain M76
14	DE86	NANODROP2000	12/1/2019 3:29:03 PM	35.6	ng/μl	0.713	0.353	2.02	1.37	DNA	50	Boeremia exigua var. exigua
15	DE90	NANODROP2000	12/1/2019 3:29:44 PM	121.3	ng/μl	2.426	1.396	1.74	0.77	DNA	50	Boeremia exigua var. exigua
16	DE94	NANODROP2000	12/1/2019 3:30:24 PM	180.7	ng/μl	3.614	2.058	1.76	0.92	DNA	50	Boeremia exigua var. exigua

Mediciones de ADN en equipo NanoDrop 2000, de hongos aislados en una primera preselección de trabajo. Los individuos DE46 y DE86 utilizados en el estudio, presentan una buena concentración y calidad.