



Artículo Científico

Bipolaris oryzae agente asociado a la mancha foliar en *Cocos nucifera* híbrido “Enano Verde de Brasil”

Oscar Guillermo Rebolledo-Prudencio¹, Wilberth Chan-Cupul^{1*}, Guadalupe Moreno-Zúñiga¹, Carlos Adrián Cruz-Jiménez¹, Juan Carlos Sánchez-Rangel¹. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima, Autopista Colima-Manzanillo, Tecoman, Colima, México, C.P. 28934.

RESUMEN

Antecedentes/Objetivo. En Tecoman, Colima, México, se detectó una mancha foliar (MF) con incidencia del 92.0% en *Cocos nucifera* híbrido “Enano Verde de Brasil” (EVB). El objetivo fue caracterizar morfológica, molecular y bioquímicamente al hongo asociado a la MF en palma de coco EVB y evaluar su susceptibilidad a fungicidas biológicos comerciales.

Materiales y métodos. El aislado se caracterizó morfológica y molecularmente. Se evaluó su crecimiento, esporulación y producción de lacasa en diferentes medios de cultivo. Se determinó la inhibición micelial *in vitro* y dosis letal media (DL₅₀) de fungicidas biológicos comerciales a base de hongos antagonistas (*Trichoderma harzianum* y *T. viride*), bacterias (*Bacillus subtilis* y *B. amyloliquefaciens*) y actinobacterias (*Streptomyces lydicus* y *S. jofer*).

Resultados. *Bipolaris oryzae* fue el agente asociado a la MF, produjo 25.54 y 22.17 U mg de proteína⁻¹ de actividad lacasa en los medios Sivakumar y salvado de trigo (ST). El medio ST permitió la mayor esporulación. *T. harzianum* inhibió al 100% a *B. oryzae* en las cuatro dosis evaluadas. *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* inhibieron al 100% a *B. oryzae* en la dosis más alta evaluada (20 mL L⁻¹).

Conclusión. *Bipolaris oryzae* es el agente asociado a la MF, produjo la mayor actividad lacasa en Sivakumar y ST. La mayor esporulación y crecimiento diario fue en ST. *T. harzianum* destacó sobre *T. viride* al inhibir en 100% el crecimiento de *B. oryzae*. *Bacillus subtilis*, *S. lydicus* y *B. amyloliquefaciens* fueron más efectivas contra *B. oryzae* comparado con *S. jofer*.

Palabras clave: Antagonismo, *Bipolaris*, actinobacterias, bacterias, cocotero, Colima.

*Autor de
correspondencia:
Wilberth Chan-Cupul
wchan@ucol.mx

Sección:
Número Especial

Recibido:
15 Noviembre, 2024
Aceptado:
08 Febrero, 2025
Publicado:
21 Febrero, 2025

Cita:
Rebolledo-Prudencio OG,
Chan-Cupul W, Moreno-
Zúñiga G, Cruz-Jiménez
CA y Sánchez-Rangel JC.
2025. *Bipolaris oryzae*
agente asociado a la
mancha foliar en *Cocos*
nucifera híbrido “Enano
Verde de Brasil”.
Revista Mexicana de
Fitopatología 43(4): 55.
[https://doi.org/10.18781/R.
MEX.FIT.2024-09](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2024-09)



INTRODUCCIÓN

En México, el cocotero (*Cocos nucifera*) es un cultivo cultural y económicamente importante para el estado de Colima, el cual obtuvo el segundo lugar en producción nacional de cocotero con 19, 587.6 ha cosechadas y una producción total de 20, 195.61 t, con un rendimiento de 1.03 t ha⁻¹ (SIAP, 2024). En tanto al ámbito fitosanitario del cocotero, la principal plaga en el pacífico de México es el picudo negro de la palma (*Rhynchophorus palmarum*), vector principal de *Bursaphelenchus cocophilus*, agente causal del anillo rojo, y *Phytophthora palmivora*, causante de la pudrición del cogollo (De la Mora *et al.*, 2022), estas enfermedades pueden ser detectadas en diversos germoplasmas de cocotero, especialmente en los producidos en Colima: “Alto Pacífico” “Ecotipo 4” y “Enano Verde de Brasil” (EVB); sin embargo, no solo nematodos y oomicetos generan afecciones en cocotero, también se pueden encontrar hongos fitopatógenos que pueden inducir diferentes enfermedades (Gemaque *et al.*, 2009).

El híbrido EVB es el germoplasma de cocotero más recientemente cultivado en Colima. Se introdujo en el 2017 y desde entonces, debido a sus características, ha ganado popularidad entre los productores y empresas relacionadas al cocotero en el Valle de Tecomán, al tener una producción precoz a los dos años, ofrecer una productividad de hasta más de 150 drupas por planta y una altura de entre 4 a 6 m, lo cual facilita las labores culturales y la cosecha, en comparación con variedades altas, y principalmente, se utiliza para el consumo de su agua (Benassi *et al.*, 2013). Recientemente, se encontró una sintomatología de fitopatología en el híbrido EVB en un vivero de producción de planta al aire libre en la localidad de Caleras, Tecomán, Colima. La enfermedad corresponde a una mancha foliar (MF), la cual presenta pequeñas manchas ovaladas de apariencia necrótica de color marrón oscuro-rojizo en su inicio y con el tiempo adquieren un matiz marrón claro, con presencia de un anillamiento de tonalidad amarilla (halo) en el borde de estas durante ambas etapas, lo cual coincide con una enfermedad fúngica de acuerdo con los parámetros evaluados por Gemaque *et al.* (2009).

El principal manejo de las enfermedades fúngicas, incluida la mancha foliar en palmas de cocotero en vivero, es la aplicación de fungicidas químicos, principalmente con ingredientes activos como benomilo (Benlate), clorotalonil (Daconil) (Palomar y Betonio, 1982), tebuconazole, propiconazole, carbendazin, picoxystrobin, pyraclostrobin, mancozeb, propineb, entre otros (Ushamalini *et al.*, 2019), a pesar de los inconvenientes ambientales que conlleva el uso de estas moléculas y la resistencia que genera en los hongos fitopatógenos.

Una alternativa ecológica que previene la resistencia de los patógenos fúngicos a los fungicidas químicos es el control biológico mediante el uso de biofungicidas a base de microorganismos benéficos, como por ejemplo bacterias y/u hongos

filamentosos, que a menudo se encuentran de manera natural en el suelo y controlan hongos y bacterias que causan enfermedades en plantas (Ehiobu *et al.*, 2022). Los biofungicidas actúan por competencia directa (exclusión), antibiosis, parasitismo o depredación, inducción de resistencia a la planta hospedante y promoción del crecimiento vegetal (Fenta y Mekonnen, 2024).

Debido a la introducción de la variedad de cocotero EVB a Colima, se desconocen los patógenos que pueden llegar a ser de importancia económica para este germoplasma. En consecuencia, no se conoce al agente asociado a la MF. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue caracterizar morfológica, molecular y bioquímicamente al hongo asociado a la MF en palmas de cocotero EVB y evaluar su susceptibilidad a fungicidas biológicos comerciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen del material vegetal. En septiembre del 2022 se colectaron al azar hojas con síntomas de MF en palma de cocotero var. EVB en el vivero del rancho “La Ceiba”, en la localidad de Caleras, Tecomán, Colima (18°59’31” N y 103°53’19 O). El clima predominante es cálido subhúmedo (Aw) con lluvias en verano (600 a 1, 100 mm año⁻¹) y 80 msnm. Las hojas se depositaron en bolsas de plástico y en una hielera con geles fríos para su transporte inmediato al laboratorio para el aislamiento del hongo. Al momento del muestreo la incidencia de la enfermedad en palmas del vivero fue del 92.0%.

Aislamiento del agente asociado. Se cortó el área foliar infectada en trozos de 4×4 cm, para su desinfección superficial se realizaron tres lavados de tres minutos cada uno con NaClO al 2.0% + Tween 20® (500 µL L⁻¹), alcohol al 70.0% y agua destilada estéril, después, se eliminó el exceso de humedad con toallas de papel estériles; y se sembraron en cajas de Petri con agar-agua para la proliferación de hifas y estructuras fúngicas. A los siete días, se observaron hifas, conidióforos y conidios, estos fueron purificados a través de punta de hifas en Papa Dextrosa Agar (PDA). Las condiciones de incubación y aislamiento fueron de 25.0±3.0 °C, 75.0±5.0% de humedad relativa (HR) y foto periodo de 14:10 h luz: oscuridad (Conde *et al.*, 2008).

Caracterización morfológica. Bajo condiciones estériles se prepararon cultivos puros del hongo aislado con la metodología del microcultivo de Riddell (1950). Los microcultivos se observaron en microscopio invertido (Axiovert 40 CFL Zeiss, Alemania) con los objetivos 5, 10 y 40×; se tomaron en cuenta características culturales y morfológicas tales como hifas septadas o lisas, aspecto micelial, forma

de borde de la colonia, coloración de colonias en medio PDA, ausencia o presencia de conidios, tamaño y forma de los conidios. La descripción de estructuras reproductivas se realizó de acuerdo con Crous *et al.* (2009), Manamgoda *et al.* (2014) y Valarmathi y Ladhalakshmi (2018).

Caracterización molecular. Se eligió un aislamiento representativo para la identificación molecular y el ADN genómico se extrajo mediante el protocolo (Miller *et al.*, 1999). Se maceró el tejido fúngico con nitrógeno líquido y se empleó el buffer de lisis (200 mM Tris HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) para la extracción con fenol-cloroformo. Se amplificó la región D1/D2 de la subunidad 28S ribosomal utilizando los oligonucleótidos NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Voigt *et al.*, 1999). Las secuencias se inspeccionaron mediante cromatogramas utilizando el programa SnapGene Viver™ 7.2.0. La secuencia curada se utilizó para comparar con la base de datos en el GenBank de NCBI utilizando el programa Mega BLAST. Se depositó la secuencia en el GenBank con número de acceso PV034038. Adicionalmente, se descargaron las secuencias más similares relacionadas de *Bipolaris* en formato FASTA de GenBank (Cuadro 1). Estas secuencias se alinearon usando el algoritmo CLUSTALW con parámetros predeterminados (Thompson *et al.*, 2003) y se editaron manualmente utilizando el paquete de software MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021). Se realizó un análisis filogenético de Máxima Verosimilitud (ML) con el modelo Kimura de 2 parámetros G+I (Kimura, 1980). Los gaps fueron tratados

Cuadro 1. Secuencias utilizadas para la generación del árbol filogenético de *Bipolaris oryzae* agente asociado a la mancha foliar de cocotero.

Especie	Número de cepa	Hospedante	País	Gen Bank	Referencia
<i>Bipolaris incurvata</i>	CBS 127221	<i>C. nucifera</i>	India	MH875906	Kamalakaran <i>et al.</i> , 2006
<i>Bipolaris oryzae</i>	CBS 127244	No determinado	Holanda	MH875924	Vu <i>et al.</i> , 2019
<i>B. oryzae</i>	MFLUCC 100715	<i>Oryza sativa</i>	Thailandia	JX256384	Manamgoda <i>et al.</i> , 2012
<i>B. oryzae</i>	MFLUCC100716	<i>O. sativa</i>	Thailandia	JX256383	Manamgoda <i>et al.</i> , 2012
<i>B. oryzae</i>	MFLUCC 100733	<i>O. sativa</i>	Thailandia	JX256385	Manamgoda <i>et al.</i> , 2012
<i>B. oryzae</i>	AR5204	<i>Panicum virgatum</i>	USA	KM243277	Manamgoda <i>et al.</i> , 2014
<i>B. oryzae</i>	B1	No determinado	India	OQ349750	Sin publicar
<i>B. oryzae</i>	ACCC 36975	<i>O. sativa</i>	China	MK051173	Chaijuckam <i>et al.</i> , 2019
<i>B. oryzae</i>	H2-1	No determinado	Japan	KF590135	Palomares <i>et al.</i> , 2014
<i>Bipolaris secalis</i>	BRIP 14453	<i>Secale cereale</i>	Argentina	KJ415492	Tan <i>et al.</i> , 2014
<i>B. secalis</i>	UC6	<i>Vitis vinifera</i>	Italia	KU554624	Lorenzini <i>et al.</i> , 2016
<i>B. secalis</i>	K2d	<i>Sorghum bicolor</i>	Kenya	PP813561	Sin publicar
<i>B. secalis</i>	CBS 127712	No determinado	Holanda	MH876123	Vu <i>et al.</i> , 2019
<i>Curvularia oryzae</i>	CBS 169.53	<i>C. nucifera</i>	China	KM243284	Berbee <i>et al.</i> , 1999

como deleciones parciales con un 95.0% de cobertura, utilizando un método heurístico NNI (intercambio del vecino más cercano, por sus siglas en inglés) para refinar la topología del árbol con 1, 000 réplicas de arranque. Se empleó *Fusarium oxysporum* como un clado externo.

Caracterización fisiológica y bioquímica. En un experimento se evaluaron cinco medios de cultivo semisólidos: Czapek-Dox (en g L⁻¹: NaCl 0.75, K₂HPO₄ 0.25, MgSO₄ 0.125, KCl 0.125, agar bacteriológico 18.0 (Sumathi *et al.*, 2016), glucosa palma de cocotero (en g L⁻¹: glucosa 10 y hojas licuadas palma de cocotero 50), PDA, salvado de trigo-buffer citrato (en g L⁻¹: salvado de trigo 30, NaOH 2.0 y ácido cítrico 9.0 (Sumathi *et al.*, 2016) y Sivakumar (en g L⁻¹: glucosa 20, extracto de levadura 2.5, K₂HPO₄ 1.0, MgSO₄ 0.5, KCl 0.5, (NH₄)₂SO₄ 0.5, CaCl₂ 0.01, FeSO₄ 0.01, MnSO₄ 0.001, ZnSO₄ 0.001 y CuSO₄ 0.002 (Sivakumar *et al.*, 2010). Los medios de cultivo se prepararon, esterilizaron y vertieron en cajas de Petri de 100×15 mm. Como inóculo, se colocó un disco de micelio desarrollado en agar de una colonia de *Bipolaris oryzae* de 12 días de edad en jugo V8-agar en el centro de la caja de Petri. Se empleó un diseño completamente al azar.

La caracterización fisiológica se realizó cuantificando la tasa de crecimiento diaria (TCD) y esporulación. La TCD se determinó midiendo el diámetro de las colonias de *B. oryzae* durante cinco días. La TCD se calculó con la fórmula:

$$TCD = \chi \sum (C_{t1} - C_{t1-1} \dots n)$$

dónde, n = fue el número de evaluaciones y Ct = el número de días de crecimiento. Para la esporulación, en tubos Falcon® (50 mL) con 10 mL de agua destilada estéril con Tween 80® (0.005%) se depositaron 10 discos de micelio agar de siete días de edad, provenientes de los medios de cultivo evaluados, los tubos se agitaron en vórtex por 60 s, se tomaron 10 µL y se contabilizó el número de conidios disco⁻¹ mL⁻¹ en una cámara de Neubauer en microscopio (Axio Vert A1, Zeiss, Alemania) con un objetivo de 40× (Manzo-Sánchez *et al.*, 2018).

La caracterización bioquímica de *B. oryzae* incluyó la producción de lacasa (volumétrica y específica) y proteína total. A partir de discos de micelio agar obtenidos del conteo de esporulación, las muestras se filtraron con papel filtró estéril (Whatman No 1) para evitar conidios y micelio. Con el filtrado se determinó la actividad lacasa por el método de oxidación del ABTS (2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]-sal de diamonio) (Chan *et al.*, 2019) y el contenido de proteína total por el método de Bradford (Kielkopf *et al.*, 2020). La actividad lacasa se reportó en U (unidad internacional: cantidad de la lacasa que oxidó 1 µmol de ABTS mL⁻¹ min⁻¹) y la proteína en mg L⁻¹.

Sensibilidad a fungicidas biológicos a base de microorganismos. Para los bioensayos se evaluaron: Serenade ASO® (*Bacillus subtilis*, Bayer®), Badixi® (*Bacillus amyloliquefaciens* cepa MBI 600, Syngenta®), Magni-Root® (*Trichoderma harzianum*, PlantBio®), Trico® (*Trichoderma viride*, Greenfor®), Blite Free® (*Streptomyces jofer*, enriquecido con antioxidantes, medio de cultivo y agentes quelantes, AltusBio®) y Domus® (*B. subtilis*, *T. harzianum* y *Streptomyces lydicus*, CollectTara®). La selección de los productos se realizó en función de su disponibilidad en las casas agrícolas de Tecomán, Colima. Los productos biológicos fueron evaluados en dosis (concentración %) de 2.5 (0.25%), 5.0 (0.5%), 10 (1.0%) y 20 mL L⁻¹ (2.0%), las dosis (mL L⁻¹) se prepararon en agua destilada estéril (100 mL) + Tween 80® (0.05%); con una micropipeta se tomaron 1, 000 µL y se depositaron sobre la superficie del medio PDA solidificado en cajas de Petri de 100×15 mm; se realizaron cinco repeticiones por cada dosis evaluada en cada producto. La siembra del hongo fitopatógeno se realizó depositando en el centro de la caja de Petri cinco µL de una solución de esporas a una concentración de 9.2×10⁴ esporas mL⁻¹. Las cajas de Petri inoculadas se incubaron bajo condiciones de laboratorio a una temperatura de 25.0 ± 3.0 °C. 75 ± 5.0% de HR: 10:14 h luz: oscuridad durante cinco días (Chan *et al.*, 2014). Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (%ICM) con la siguiente ecuación: %ICM = [(C - T) / C] * 100, donde C es el diámetro del micelio en la caja Petri control (mm), y T es el diámetro del micelio en las cajas de tratamiento con fungicidas biológicos (mm). También se determinó la dosis letal noventa DL₉₀, que hace referencia a la cantidad de fungicida biológico necesario para inhibir el desarrollo del fitopatógeno en un 90%, se estimó empleando los valores del %ICM en cada dosis evaluada de cada producto. Esta estimación se realizó mediante un análisis Probit (Manzo-Sánchez *et al.*, 2018) utilizando el software Statistical Analysis System (SAS) ver. 8 para Windows (SAS Insti-tute Inc., 2000).

Análisis de datos. Los datos de caracterización fisiológica y bioquímica (TCD, esporulación, actividad lacasa y producción de proteína total) y efectividad *in vitro* (%ICM) se sometieron a un análisis de homogeneidad de varianzas (P < 0.05) y análisis de varianza (P < 0.05). Se encontraron diferencias significativas, se realizó una comparación de medias Tukey con un nivel de significancia al 5%. Además, se realizó un análisis de regresión lineal (Y=mX+b) entre las dosis empleadas de los productos a evaluar (X) y los porcentajes de inhibición (Y), para conocer su relación. Los análisis se realizaron con el software StatGraphics Plus 4.0 para Windows (Manzo-Sánchez *et al.*, 2018).

RESULTADOS

Caracterización morfológica y molecular. Los síntomas de la MF encontrada en plantas de coco EVB corresponden a pequeñas manchas ovaladas de color negro y marrón, las manchas crecen paulatinamente a través de un halo ligeramente amarillo, ocasionando un debilitamiento y amarillamiento generalizado de las hojas, posteriormente ocasiona la muerte de esta (Figura 1). Las principales características culturales y morfológicas del hongo se muestran en la Figura 2. Macroscópicamente el micelio fue de color blanco en sus primeros siete días de crecimiento, tornándose a una tonalidad marrón-grisáceo conforme el micelio madura al formar los conidióforos y conidios a los 12 días de edad (Figura 2I y 2J). Microscópicamente las hifas fueron septadas, color marrón claro (Figura 2A, 2B y 2H), conidios rectos (Figura 2C, 2D, 2E y 2F), distoseptados (5 – 6 septos), de color marrón, de forma elipsoidal y estrechándose hacia sus extremos en forma redondeada. Los conidióforos son septados y agrupan entre 2 a 8 conidios (Figura 2G), con un promedio de $4.0 \pm 1.4 \mu\text{m}$ (media \pm desviación estándar (DE)), asimismo las hifas también son septadas (Figura 2H). El largo de los conidióforos fue de $114.8 \pm 34.1 \mu\text{m}$ (media \pm DE $n=100$) y las dimensiones de los conidios fueron de $16.1 \pm 1.5 \mu\text{m} \times 5.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$ (media \pm DE $n=100$). Los aislamientos se identificaron como *Bipolaris oryzae* según sus características morfológicas (Manamgoda *et al.* 2014; Meghana y Hiremath 2019; Livitha y Christopher 2023).

Para confirmar la identificación morfológica del agente asociado a la MF, se eligió un aislamiento representativo para la identificación molecular y el ADN

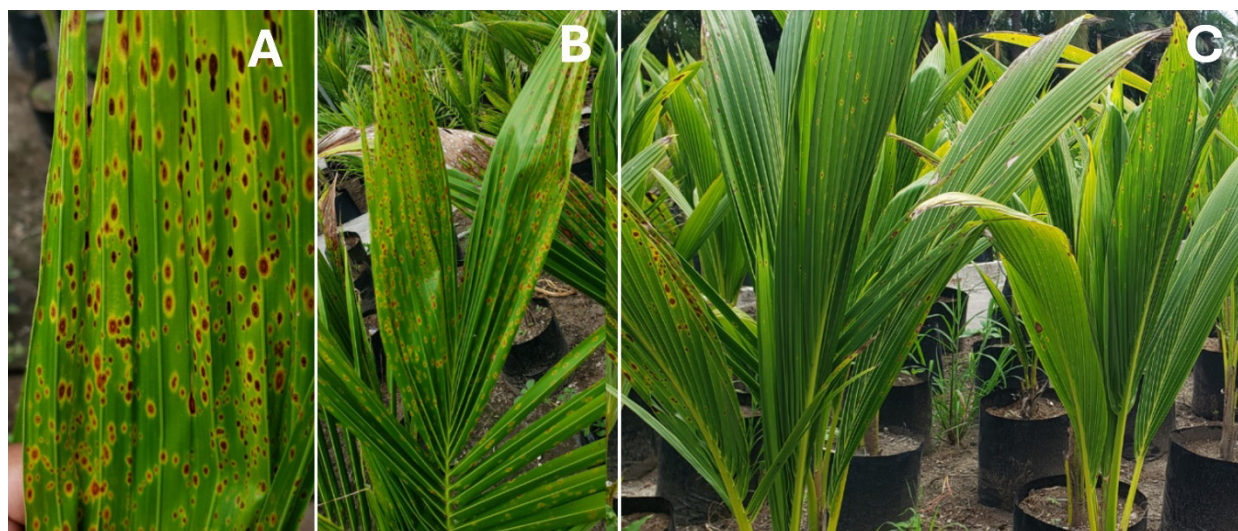


Figura 1. Hojas con síntomas de mancha foliar en palma de cocotero híbrido “Enano Verde de Brasil”. A) Manchas ovaladas color marrón y halo amarillo, B) hojas con de palma con múltiples manchas ovaladas y C) vista del vivero con plantas con síntomas de mancha foliar.

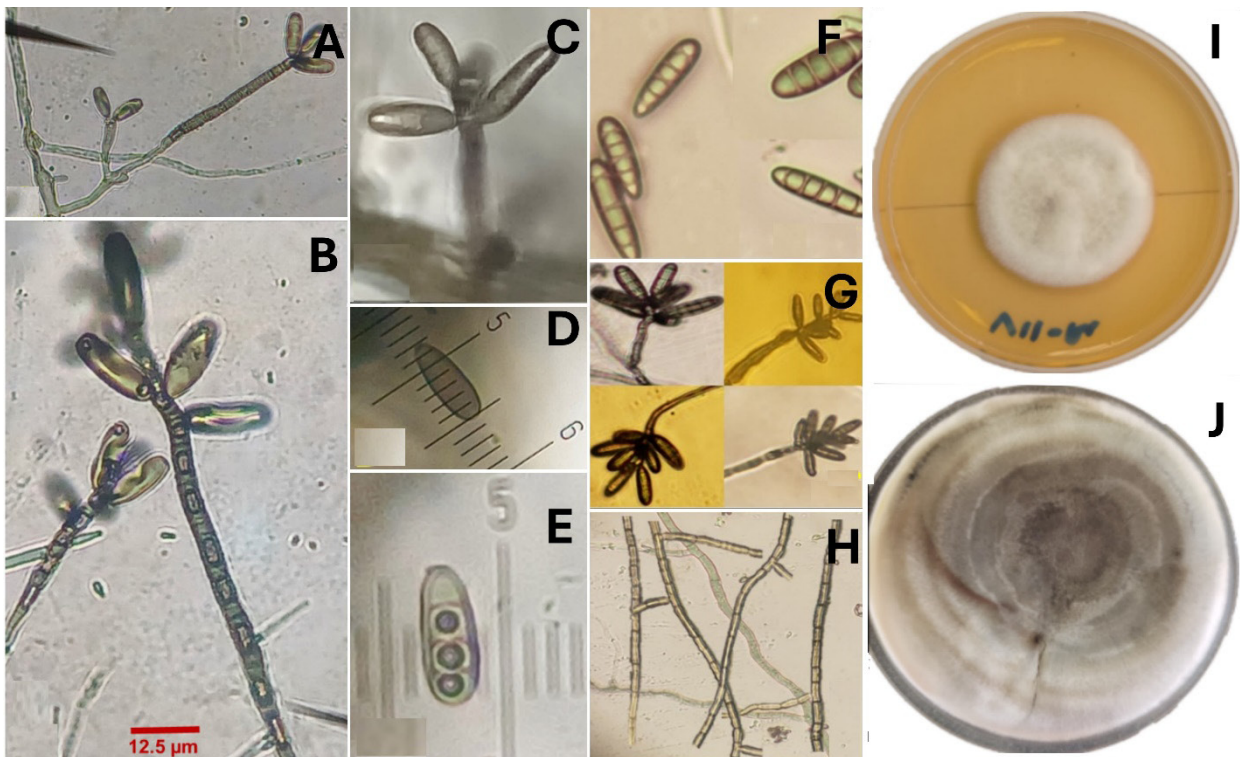


Figura 2. Características culturales y morfológicas de *Bipolaris oryzae*. A y B) Conidioforos; C a F) conidiosporas; G) agrupación de conidióforos; H) hifas septadas; I) micelio joven de cinco días de crecimiento en medio; J) micelio maduro de 20 días de crecimiento en medio PDA.

genómico se extrajo mediante el protocolo Miller et al., (1999). Se secuenció la región D1/D2 del amplicón de la subunidad mayor 28S del ARN ribosomal (Voigt et al., 1999). Las secuencias del aislamiento representativo (ACMFCnhEVB_1) se depositaron en el GenBank (PV034038). El análisis de BLAST de las secuencias parciales mostró un 98.27% de similitud con los aislados de *Bipolaris oryzae* (GenBank OQ349750.1). Para comparar el aislamiento de *B. oryzae* (agente asociado MFCnhHVB) reportado en este trabajo con otras cepas de *Bipolaris* spp., se realizó un análisis filogenético con secuencias de distintas cepas y especies relacionadas utilizando los softwares ClustalW y MEGA11 con el método Máxima Verosimilitud (Figura 3). El análisis se realizó con un total de 14 secuencias de *Bipolaris* spp., nueve reportadas como patógenas (una de *B. incurvata* y ocho de *B. oryzae*), cuatro de *B. secalis* utilizado como clado hermano, y dos secuencias correspondientes a *B. incurvata* y *Curvularia oryzae* (Berbee et al., 1999; Kamalakannan et al., 2006) reportados como patógeno de *C. nucifera* (Cuadro 1). El aislamiento MFCnhHVB reportado en este trabajo se agrupó en el Clado de *Bipolaris oryzae* cepa B1 (OQ349750.1) y H2-1 (KF590135.1). Con base en los datos de secuencia y el análisis filogenético, el hongo aislado de cocotero de MF fue identificado como *B. oryzae* (Figura 3).

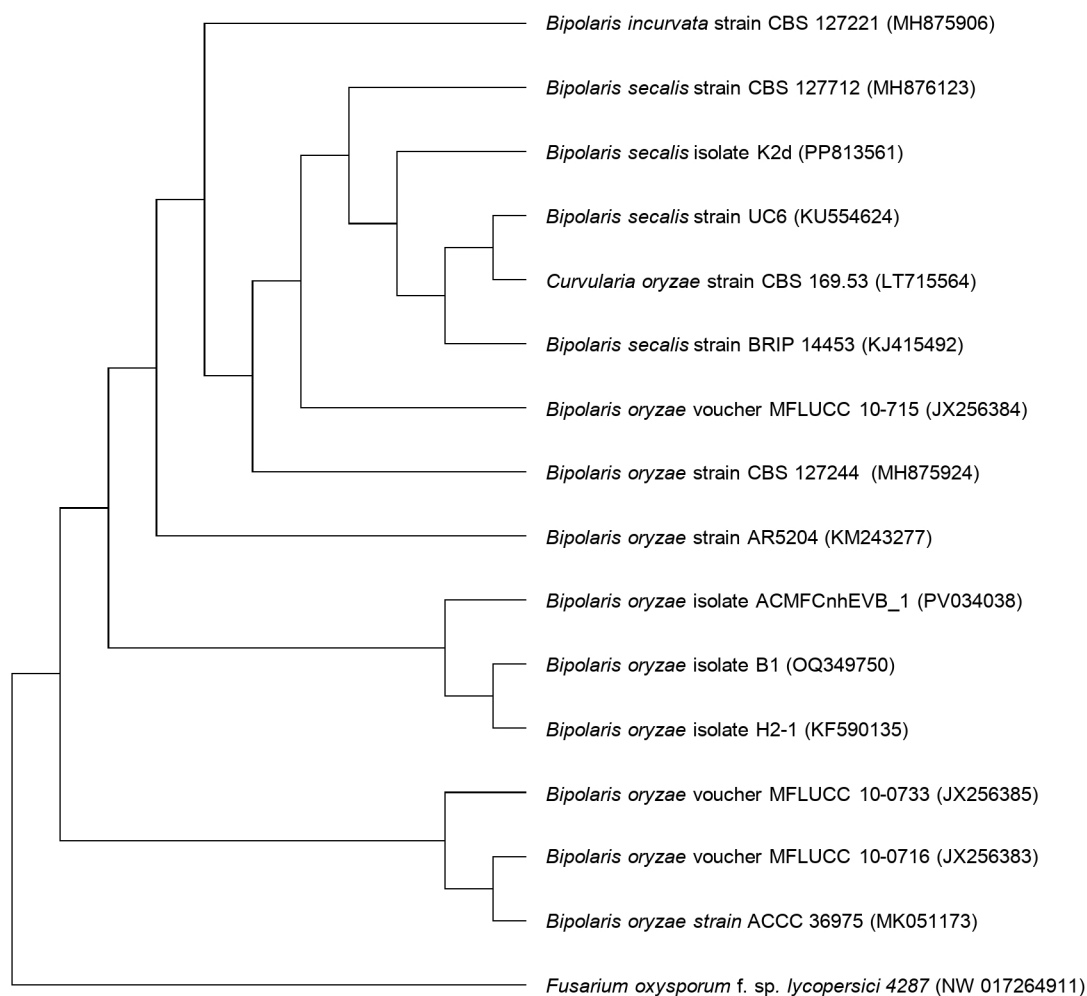


Figura 3. Análisis filogenético con base en el método de máxima verosimilitud utilizando el modelo Kimura de 2 parámetro (G+I). Árbol creado con el logaritmo de probabilidad más alto (-5759.36) de la secuencia del ADNr 28S de las cepas de *Bipolaris* similares a las del agente asociado a la MF en palma de cocotero EVB (*Bipolaris oryzae* ACMFCnhEVB_1) usando MEGA11. Es árbol se enraizó utilizando a *Fusarium oxysporum* se utilizó como grupo externo.

Caracterización bioquímica y fisiológica. *B. oryzae* produjo lacasa volumétrica en un rango de 0.66 a 15.34 U L⁻¹ en los medios de cultivo evaluados (Cuadro 2). La mayor actividad (P=0.00001) se encontró en el medio Sivakumar (15.34 U L⁻¹), seguido del ST (8.5 U L⁻¹). Para la producción de proteína total por *B. oryzae*, no se encontraron diferencias significativas (P=0.6478) entre los medios de cultivo evaluados. El rango de proteína encontrada fue de 0.40 a 0.78 mg L⁻¹ (Cuadro 2). La actividad lacasa específica fue estadísticamente mayor (P=0.0005) en los medios de cultivo Sivakumar (25.54 U mg de proteína⁻¹) y ST (22.17 U mg de proteína⁻¹). La TCD osciló entre 0.87 y 1.7 cm día⁻¹, los medios Czapek-Dox (1.75

Cuadro 2. Actividad lacasa, tasa de crecimiento diario (TCD) y esporulación de *Bipolaris oryzae* en medios semisólidos.

Medio de Cultivo	Actividad volumétrica (U L ⁻¹)	Contenido de proteína (mg L ⁻¹)	Actividad específica (U mg de proteína ⁻¹)	TCD (cm día ⁻¹)	Esporulación (conidiosporas mL ⁻¹ disco ⁻¹)
Cz-D	2.42±1.51 c	0.72±0.14	3.38±2.37 b	1.75±0.23 a	42.0±7.3 b
GAC	0.66±0.12 c	0.69±0.19	1.44±0.60 b	1.67±0.17 a	31.0±5.7 b
APD	2.87±0.15 c	0.70±0.23	5.03±0.97 b	0.87±0.18 b	-
ST	8.5±0.64 b	0.40±0.04	22.17±3.15 a	1.32±0.02 ab	329.0±36.5 a
Sivakumar	15.34±2.19 a	0.78±0.24	25.54±7.19 a	1.2±0.13 ab	37.0±5.8 b
F=	23.93	0.63	9.46	4.66	63.37
P=	0.00001	0.6478	0.0005	0.0121	0.00001

Medias (± error estándar) con diferente literal son estadísticamente diferentes entre sí, de acuerdo con la comparación de medias Tukey (P=0.05). Cz-D=czapek-Dox, GAC=glucosa agua de coco, PDA=papa dextrosa agar, ST=salvado de trigo.

cm día⁻¹) y GAC (1.67 cm día⁻¹) permitieron una mayor TCD a comparación del PDA (0.87 cm día⁻¹). El medio ST permitió una mayor esporulación de *B. oryzae* (329 conidio mL⁻¹ disco⁻¹) (P=0.00001), en comparación con los medios Czapek-Dox, GAC y Sivakumar que presentaron 42.0, 31.0, 37.0 conidios mL⁻¹ disco⁻¹, respectivamente (Cuadro 2).

Efectividad *in vitro* de fungicidas biológicos. El biofungicida Magni-Root® (*T. harzianum*) inhibió al 100% el crecimiento micelial de *B. oryzae* en las cuatro dosis evaluadas (Cuadro 3, Figura 4). Trico® (*T. viride*) causó una inhibición del 100% de *B. oryzae* en el primer muestreo; sin embargo, a partir del segundo día, el porcentaje disminuyó hasta valores de 4.1±2.6 y 0.4±0.2 % a una dosis de 20 mL L⁻¹ y 10 mL L⁻¹, respectivamente. Al final de la evaluación (5 días de interacción), los porcentajes oscilaron entre 43.2 y 55.2%, a una dosis de 2.5 y 20 mL L⁻¹, respectivamente. Domus® (*B. subtilis*, *T. harzianum* y *S. lydicus*) ocasionó inhibiciones del crecimiento de *B. oryzae* del 100%; con la dosis del 20 mL L⁻¹ durante los cinco días de evaluación, mientras que la dosis de 10 mL L⁻¹ mantuvo inhibiciones del crecimiento de 85.9, 89.7 y de 91.9% a los tres, cuatro y cinco días de evaluación, respectivamente. Badixi® (*B. amyloliquefaciens*) y Serenade ASO® (*B. subtilis*) inhibieron el crecimiento de *B. oryzae* al 100% en las dosis de 20, 10 y 2.5 mL L⁻¹ a los cinco días de evaluación. La dosis de 5.0 mL L⁻¹ obtuvo la menor inhibición con los productos Badixi®=90.7% y Serenade ASO®=94.2%. BliteFree® (*Streptomyces jofer*) presentó 100% de inhibición contra *B. oryzae* en las cuatro dosis evaluadas, pero al segundo día, este porcentaje bajó a valores

Cuadro 3. Inhibición del crecimiento micelial (%) de *Bipolaris oryzae* por diferentes dosis de fungicidas biológicos comerciales.

Producto	Dosis (mL L ⁻¹)	Días de evaluación				
		1	2	3	4	5
Magni-Root®	20	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
	10	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
	5	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
	2.5	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
	F	NC	NC	NC	NC	NC
	P-valor	NC	NC	NC	NC	NC
Producto	Dosis (mL L ⁻¹)	Días de evaluación				
		1	2	3	4	5
Trico®	20	100.0±0.0 a	4.1±2.6 a	24.8±4.8 ab	44.1±4.1 a	55.2±3.7 a
	10	100.0±0.0 a	0.4±0.2 a	28.8±5.9 a	47.5±4.1 a	58.3±3.0 a
	5	100.0±0.0 a	1.4±1.4 a	6.6±6.6 b	17.4±8.9 b	35.6±7.3 b
	2.5	100.0±0.0 a	0.0±0.0 a	9.5±2.6 ab	29.6±4.8 ab	43.2±4.3 ab
	F	NC	1.59	4.46	5.67	4.71
	P-valor	NC	0.2225	0.0148	0.0056	0.0121
Producto	Dosis (mL L ⁻¹)	Días de evaluación				
		1	2	3	4	5
Domus®	20	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
	10	100.0±0.0 a	75.3±11.6 ab	85.9±6.3 ab	89.7±4.8 ab	91.9±3.8 ab
	5	100.0±0.0 a	50.6±12.0 b	71.8±6.9 b	79.4±5.0 b	83.8±4.0 b
	2.5	100.0±0.0 a	42.3±8.4 b	67.1±4.8 b	75.9±3.5 b	81.1±2.8 b
	F	NC	7.69	7.69	7.69	7.69
	P-valor	NC	0.0013	0.0013	0.0013	0.0013
Producto	Dosis (mL L ⁻¹)	Días de evaluación				
		1	2	3	4	5
Badixi®	20	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
	10	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
	5	100.0±0.0 a	83.5±11.0 a	83.9±5.7 b	88.2±4.1 b	90.7±3.3 b
	2.5	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
	F	NC	2.23	8.00	8.00	8.00
	P-valor	NC	0.1165	0.0011	0.0011	0.0011
Producto	Dosis (mL L ⁻¹)	Días de evaluación				
		1	2	3	4	5
BliteFree®	20	100.0±0.0 a	18.2±10.9 a	47.0±8.3 a	61.0±6.1 a	69.1±4.8 a
	10	100.0±0.0 a	1.8±1.3 a	35.6±3.1 a	52.2±2.4 a	61.8±2.0 a
	5	100.0±0.0 a	7.8±4.6 a	42.9±5.4 a	58.3±4.0 a	67.2±3.1 a
	2.5	100.0±0.0 a	9.8±7.2 a	38.2±4.4 a	53.2±3.7 a	61.8±3.7 a
	F	NC	0.95	0.80	0.97	1.12
	P-valor	NC	0.4336	0.5062	0.4248	0.3657
Producto	Dosis (mL L ⁻¹)	Días de evaluación				
		1	2	3	4	5
Serenade ASO®	20	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
	10	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
	5	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	89.9±4.5 b	92.6±3.3 b	94.2±2.6 b
	2.5	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
	F	NC	NC	5.00	5.00	5.00
	P-valor	NC	NC	0.0095	0.0095	0.0095

Medias (± error estándar) con diferente literal son significativamente diferentes entre sí, de acuerdo con la comparación de medias Tukey $\alpha=0.05$. NC=No calculado por el software. n= 6 se refiere a las repeticiones por dosis.

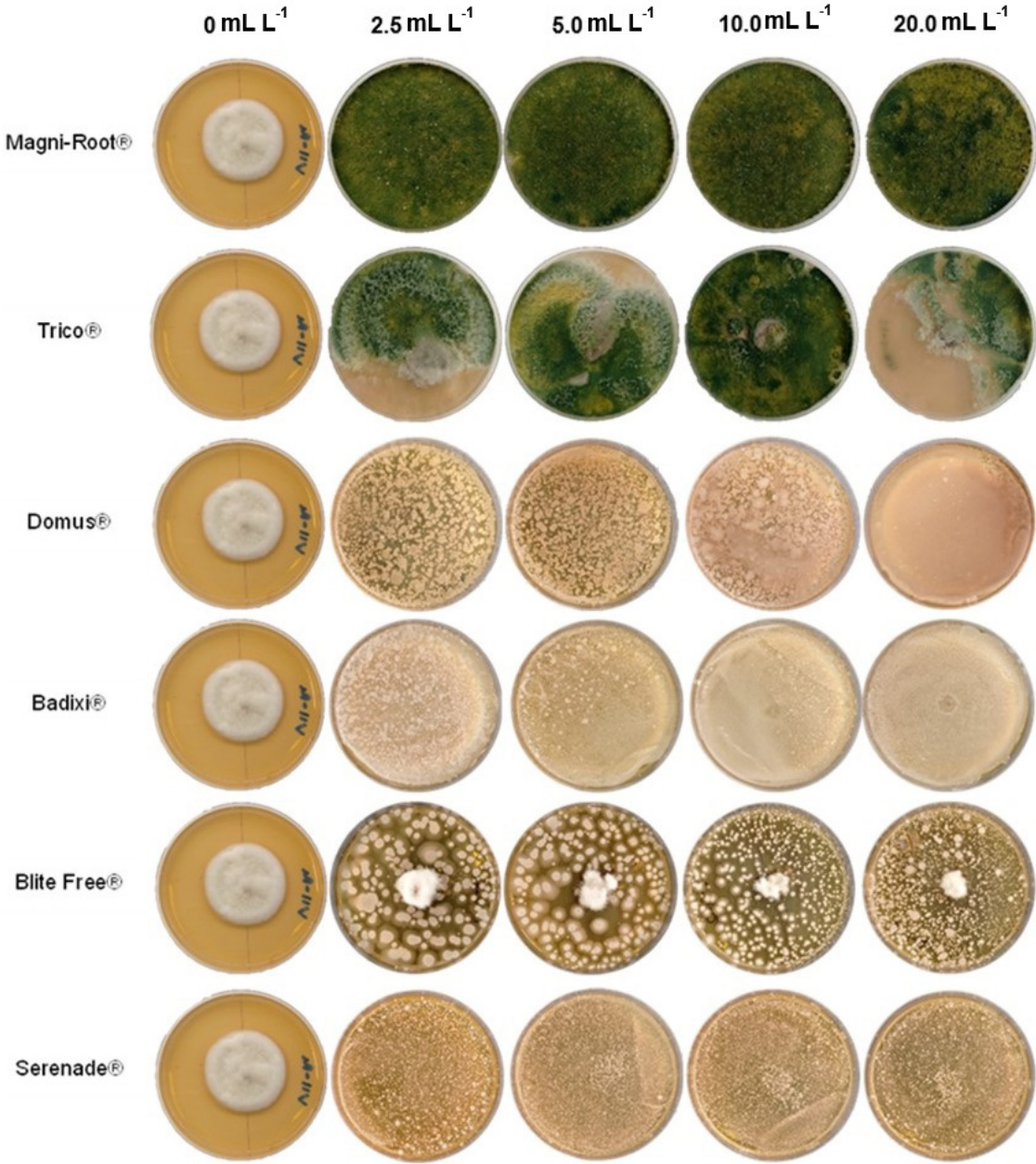


Figura 4. Crecimiento de *Bipolaris oryzae* a cinco días después de la inoculación en PDA modificado con diferentes dosis de fungicidas biológicos comerciales.

entre 18.2 y 1.8%. Conforme avanzó el experimento, la inhibición del crecimiento mostró un aumento, y para el día cuatro de estudio, el %ICM no presentó diferencias significativas entre las dosis estudiadas, inhibiendo al hongo hasta un 69% (Cuadro 3, Figura 4).

Para la DL₉₀ en Magni-Root® (*T. harzianum*) no pudo ser calculada porque inhibió al 100% el crecimiento micelial de *B. oryzae* en las cuatro dosis evaluadas (Cuadro 4). Tanto Badixi® (*Bacillus amyloliquefaciens*) y Serenade ASO® (*Bacillus subtilis*), arrojaron valores negativos; sin embargo, mostraron %ICM contra *B. oryzae* de 83.9 al 100% (Cuadro 3). Domus® (*B. subtilis*, *T. harzianum* y *S. lydicus*) presentó el valor más bajo con una DL₉₀ de 7.52 mL L⁻¹, siendo 8.64 y 16.26 veces menor respecto a Trico® (*Trichoderma viride*) y Blite Free® (*Streptomyces jofer*) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Dosis letal noventa (DL90) de seis fungicidas biológicos comerciales sobre *Bipolaris oryzae*.

Producto	DL ₉₀ (mL L ⁻¹)	IC (mL L ⁻¹)	Pendiente	Ecuación probit	χ ²	P>χ ²
Magni-Root®	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Trico®	65.04	51.5 – 91.0	0.0238	Y= 0.0238X + (-0.2699)	42.5682	0.00005
Domus®	7.52	6.7 – 8.4	0.0956	Y= 0.0956X + 0.5618	9.6654	0.00790
Badixi®	-2.89	-8.90 – -0.14	0.0717	Y= 0.0717X + 1.4891	114.8000	0.00000
BliteFree®	122.31	66.2 – 5242.4	0.0079	Y= 0.0079X + 0.3127	6.6607	0.03570
Serenade ASO®	-6.45	-19.30 – -2.12	0.0667	Y= 0.0667X + 1.7129	71.8874	0.00002

DL₉₀ = Dosis letal noventa, IC = intervalo de confianza, NC = No calculado por el software.

En la Figura 5 se muestra el análisis de regresión efectuado a cada fungicida biológico, en relación con el porcentaje de inhibición y dosis utilizada. Magni-Root® (*T. harzianum*) presentó la mayor relación entre las variables ensayadas (R²=1.00) en comparación con los demás productos evaluados, cuyos coeficientes de regresión (R²) oscilaron entre 0.05 – 0.5. Estos resultados indican una relación baja entre las mismas en los otros productos.

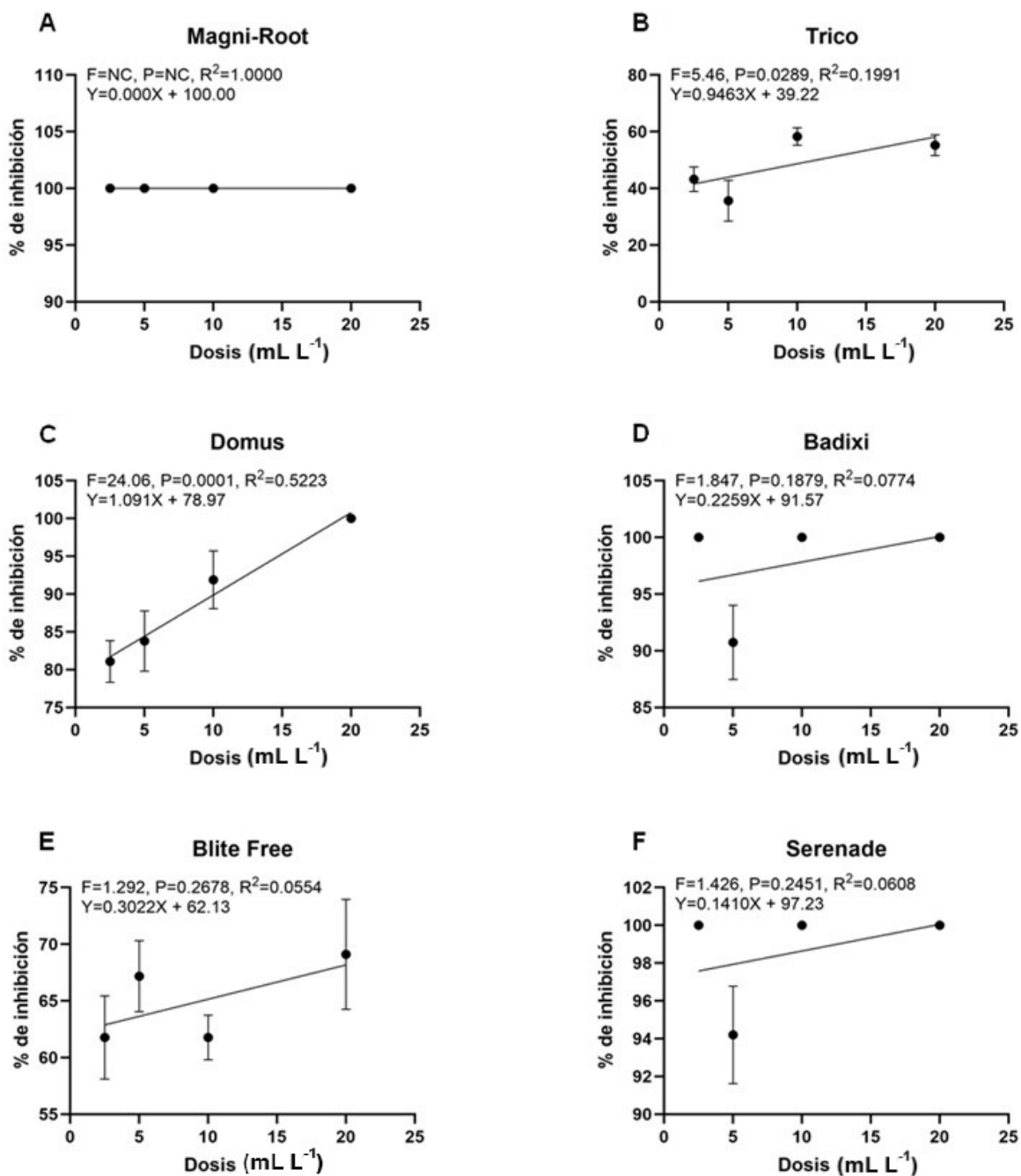


Figura 5. Regresión lineal entre la inhibición (%) del crecimiento de *Bipolaris oryzae* y las dosis utilizadas de cada fungicida biológico comercial.

DISCUSIÓN

El género *Bipolaris* posee especies versátiles ecológicamente, es decir, son de hábito saprobio, endófito y parásito (Kuan *et al.*, 2015; Bengyella *et al.*, 2019). El hábito saprobio se debe a su habilidad heterotática para prosperar en el suelo y en restos vegetales (Sun *et al.*, 2020). Su hábito endofítico se explica por su capacidad para colonizar hojas, tallos y raíces de plantas sin activar sus genes de patogenicidad, además de producir metabolitos secundarios con importantes funciones biológicas, como contribuir a la asociación con el hospedante (Schulz *et al.*, 2002). Esta habilidad endofítica le permite producir sustancia de interés biotecnológico por ejemplo ácidos orgánicos, enzimas y sideróforos (Bengyella *et al.*, 2019). En cuanto a su hábito parásito, se debe a su capacidad para parasitar plantas; la mayoría de las 100 especies descritas de *Bipolaris* (Manamgoda *et al.*, 2014; Bengyella *et al.*, 2019) son patógenos vegetales las cuales están asociadas a mancha foliar, pudrición de raíz, pudrición de plántulas y otras enfermedades en gramíneas, plantas silvestres e incluso árboles frutales. *B. oryzae*, *B. maydis* y *B. sorokiniana* son consideradas las especies más devastadoras del género (Sun *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2023).

Las especies de *Bipolaris*, han sido reportadas como patógenos de diversos géneros de palmas (*Dyopsis*, *Phoenix*, *Cocos*, *Adonia*, *Caryota*, *Elaeis*, entre otras) causando mancha foliar. En *C. nucifera* se han reportado únicamente las especies *Bipolaris incurvata* (Antes *Helminthosporium incurvatum*) (Elliott *et al.*, 2004) en Hawái e India (Kamalakkannan *et al.*, 2006); *Bipolaris setariae* (Niu *et al.*, 2014) en China y *Bipolaris* sp. en Ghana (Lekete *et al.*, 2022), por lo tanto, este es el primer reporte de *B. oryzae* como agente asociado a la mancha foliar en *C. nucifera* en México y el mundo.

Por otra parte, las lacasas (EC. 1.10.3.2) son enzimas oxidorreductasas que contienen cobre y catalizan la oxidación de un solo electrón en una amplia gama de sustratos orgánicos, como carbohidratos, compuestos aromáticos, no aromáticos, fenólicos y no fenólicos que implican la reducción de oxígeno a agua. La lacasa es una enzima importante en la degradación de lignina en la naturaleza y es sintetizada mayormente por hongos Basidiomycetos y Ascomycetos (Chan *et al.*, 2019). Los hongos fitopatógenos pueden producir varias isoenzimas de lacasa codificadas por múltiples genes. Al menos se han identificado alrededor de 10 funciones de genes de lacasa en hongos fitopatógenos (Wei *et al.*, 2017). *B. oryzae* fue capaz de producir lacasas en todos los medios de cultivo evaluados, incluso en PDA, pero su mayor actividad se encontró en el medio Sivakumar; esto se podría deber a que el medio posee mejor contenido nutrimental, especialmente CuSO_4 (0.002 g/L), inductor de la lacasa multicobre (Chan-Cupul *et al.*, 2019).

Únicamente se ha reportado la habilidad de *B. maydis* para la producción de lacasa (Joseph *et al.*, 2019), por lo tanto, el presente trabajo representa un aporte nuevo a la fisiología de *B. oryzae* en cuanto a la producción de lacasa, enzima relacionada a la patogénesis, esporulación y melanización micelial en el género *Bipolaris* (Kandan *et al.*, 2013; Lü *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2017). Las lacasas fúngicas, incluidas las producidas por *B. oryzae*, son enzimas versátiles con gran importancia en la agricultura y en diversas industrias. Estas oxidasas que contienen cobre desempeñan un papel crucial en la síntesis de lignina, la degradación y el mantenimiento de la salud del suelo (Zhai *et al.*, 2024). Las lacasas pueden oxidar una amplia gama de compuestos fenólicos y no fenólicos, lo que las hace valiosas para aplicaciones como el procesamiento de alimentos, la biorremediación y las industrias textiles (Upadhyay *et al.*, 2016).

Por otra parte, en el género *Bipolaris* la esporulación es una etapa fisiológica importante; los conidios son más infectivos en plantas que el propio micelio (Hau y Rush, 1980), por lo tanto, conocer la tasa de crecimiento y esporulación de *B. oryzae* en diferentes medios de cultivo es una actividad preponderante en el estudio de la patogénesis del hongo en su hospedante. La esporulación de *B. oryzae* fue mayor en el medio salvado de trigo, un medio básico y económico; esto coincide con lo reportado por Hau y Rush (1980) al emplear agar con polvo de arroz (15 g L⁻¹), el cual produjo en promedio 8.7×10^7 conidios por caja de Petri (100×15 mm). En cuanto a la TCD, los medios de cultivo glucosa palma de coco y Czapek-Dox permitieron la mayor velocidad de crecimiento; esto podría deberse al extracto de palma de coco el cual emula al sustrato natural del fitopatógeno; mientras que al Czapek-Dox podría favorecerle la cantidad de sales (NaCl, MgSO₄, KCl, K₂HPO₄) que contiene, ya que este medio ha sido empleado previamente para el crecimiento de *B. oryzae* (Hau y Rush, 1980). Otros medios reportados para el crecimiento de *B. oryzae* son extracto de malta agar, almidón agar, harina de maíz agar, hoja de arroz agar y polvo de arroz agar (Arshad *et al.*, 2013; Thakur *et al.*, 2023).

Los bioensayos *in vitro* revelaron la efectividad de *T. harzianum* para suprimir el crecimiento *in vitro* de *B. oryzae* al 100% en las cuatro concentraciones evaluadas. En contraste, *T. viride* solo fue capaz de inhibir a *B. oryzae* hasta un 58.3%. Es ampliamente conocido la habilidad de *T. harzianum* para el control biológico de hongos fitopatógenos, incluido *B. oryzae*, al respecto Pérez *et al.* (2013) y Pérez *et al.* (2018), reportaron la efectividad de *T. harzianum* sobre *B. oryzae*, agente causal de la mancha parda en plantas de arroz (*Oryza sativa* L.), al inhibir el crecimiento *in vitro* en 64.4% y reducir la enfermedad hasta 93.1% en evaluaciones *in vivo*. Sin embargo, no todas las cepas de *Trichoderma* resultan ser efectivas, al respecto Bedoya *et al.* (2021), reportaron porcentajes bajos de inhibición micelial en *B. oryzae* por *Trichoderma* spp., entre 6.1 y 27.5%. El principal mecanismo de supresión de *B. oryzae* por *T. harzianum* es el micoparasitismo (Abdel *et al.*,

2007). En las interacciones duales se observa como *T. harzianum* puede crecer, desplazar y parasitar a *B. oryzae*. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de otros mecanismos de acción como la producción de metabolitos y enzimas que afecten la pared celular de *B. oryzae* (Khan *et al.*, 2020).

Los productos a base de bacterias (Serenade ASO®, Badixi®, Domu® y BliteFree®) resultaron efectivos para inhibir el crecimiento micelial de *B. oryzae*. Al respecto, Zárate *et al.* (2022) sugieren que el control biológico con *B. subtilis* (Serenade ASO®) puede resultar mejor que el control químico, al reportar inhibiciones miceliales en *Bipolaris cynodontis* entre 94.7 a 100% bajo condiciones *in vitro*, valores similares a los encontrados en este estudio con *B. oryzae* (94.2-100% de IMC). En otro estudio, Chiangsin *et al.* (2018), reportaron una inhibición micelial *in vitro* de 73.5% en *B. oryzae* por efecto de *B. subtilis*, mientras que, Karan *et al.* (2022), reportaron inhibiciones *in vitro* entre 31.1 y 70.0% con diversas cepas de *B. subtilis*. Asimismo, *B. amyloliquefaciens* se ha identificado como agente de biocontrol contra *B. oryzae* al reducir su crecimiento micelial *in vitro* hasta 78.6% y reducir la incidencia de la enfermedad en plantas de arroz en 72.6% (Prabhukarthikeyan *et al.*, 2019).

Las actinobacterias, entre ellas *Streptomyces*, son capaces de inhibir el crecimiento de fitopatógenos de importancia económica (Sánchez *et al.*, 2022). Para *B. oryzae* se han reportado inhibiciones menores al 50% y una concentración mínima inhibitoria de 1.25 mg mL⁻¹ de filtrado de *Streptomyces* sp. cepa G, aislado de suelos iraníes (Nejad *et al.*, 2014). En otro estudio, Fathi *et al.* (2019), reportaron la habilidad *in vitro* de diversas cepas de *Streptomyces* para inhibir el crecimiento micelial de *B. oryzae*, las inhibiciones más altas fueron del 50.0%. Este valor fue superado por el porcentaje de inhibición micelial que mostró *S. lydicus* (Domus®, 81.1-100%) y *S. jofer* (BlireFree®, 69.1%), empleados en este estudio. En *B. maydis* se han reportado porcentajes de inhibición micelial del 80.0% por efecto de lactonas producidas por *Streptomyces* sp. SN5431 en experimentos *in vitro* (Wang *et al.*, 2023), este porcentaje fue similar al encontrado en este estudio con *S. lydicus* (Domus®, 81.1-100%) y *S. jofer* (BlireFree®, 69.1%).

El presente trabajo aporta al conocimiento fitopatológico del cultivo de cocotero, específicamente del híbrido EVB, recientemente introducido en el pacífico de México. Se reporta por primera vez a *Bipolaris oryzae* como el agente asociado a la mancha foliar del cocotero, y se propone el uso de agentes de control biológico a base de *T. harzianum*, *T. viride*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *S. lydicus*, *S. jofer*. Sin embargo, es fundamental realizar estudios bajo condiciones de campo (*in situ*) o vivero para entender la epidemiología de la enfermedad bajo aplicaciones de los fungicidas biológicos comerciales más efectivos en este estudio.

CONCLUSIONES

De acuerdo con la caracterización morfológica e identificación molecular, se confirmó que *Bipolaris oryzae* es el agente asociado a la mancha foliar en palma de cocotero híbrido “Enano Verde de Brasil”. *B. oryzae* es capaz de producir lacasa, una enzima implicada en la patogénesis. Los medios de cultivo Sivakumar y salvado de trigo fueron los que permitieron mayor actividad lacasa de *B. oryzae*. Además, el medio salvado de trigo permitió la mayor esporulación (329.0 conidiosporas/mL/disco) y adecuada tasa de crecimiento diaria (1.32 cm día⁻¹). En los bioensayos con fungicidas biológicos comerciales, *T. harzianum* destacó sobre *T. viride* al inhibir en 100% el crecimiento de *B. oryzae* en las cuatro dosis evaluadas. Las bacterias *B. subtilis* (100%), *S. lydicus* (100%) y *B. amyloliquefaciens* (100%) fueron más efectivas en el control *in vitro* de *B. oryzae* comparado con la actinobacteria *S. jofers* (69.1%).

REFERENCIAS

- Abdel FGM, Shabana YM, Ismail AE and Rashad YM. 2007. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. Mycopathologia 164:81–89. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9032-9>
- Arshad HMI, Hussain N, Ali S, Khan JA, Saleem K and Babar MM. 2013. Behavior of *Bipolaris oryzae* at different temperatures, culture media, fungicides, and rice germplasm for resistance. Pakistan Journal of Phytopathology 25:84-90. <http://www.pjp.pakps.com/index.php/PJP/article/view/15>
- Bedoya CDC, Pinciroli M y Sisterna M. 2021. Alternativas de biocontrol antifúngico *in vitro* para el manchado de grano/semilla en arroz. Brazilian Journal of Development 7:55457-55466. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n6-110>
- Benassi AC, Fanton CJ e Nascimento E. 2013. O cultivo do coqueiro-anão-verde: tecnologias de produção. Editorial Coordenação. Espírito Santo, Brasil. 120 p. <https://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/bitstream/item/2711/1/BRT-cultivodocoqueiroanao-benassi.pdf>
- Bengyella L, Iftikhar S, Nawaz K, Fonmboh DJ, Yekwa EL, Jones RC, Njanu YMT and Roy P. 2019. Biotechnological application of endophytic filamentous *Bipolaris* and *Curvularia*: a review on bioeconomy impact. World Journal of Microbiology and Biotechnology 35:2-14. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2644-7>
- Berbee ML, Pirseyedi M, Hubbard S. 1999. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. Mycologia 91:964–977. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061106>
- Chaijuckam P, Songkumarn P and Guerrero JJG. 2019. Genetic diversity and aggressiveness of *Bipolaris oryzae* in north-central Thailand. Applied Science and Engineering Progress 12:116–125. <https://doi.org/10.14416/j.asep.2019.03.004>
- Chan CW, Arámbula ZC, Fan Z and Heredia AG. 2019. Oxidative enzymes activity and hydrogen peroxide production in white-rot fungi and soil-borne micromycetes co-cultures. Annals of Microbiology 69:171–181. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1413-4>
- Chan CW, Heredia AG, Rodríguez VR, Arias MRM. 2014. Toxicidad *in vitro* de los herbicidas atrazina y paraquat sobre el crecimiento vegetativo y la esporulación de hongos saprobios de suelo. Revista Internacional de Contaminación Ambiental 30:393-406. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992014000400007
- Chiangsin R, Kesse C and Sangchote S. 2018. Biological control of *Bipolaris oryzae* with *Bacillus subtilis* and the development of a formulation for rice seed treatment. Thai Journal of Agricultural Science 51:139-151. <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/TJAS/article/view/246151>

- Conde FL, Grijalva AR, Raigoza FNE and James KAC. 2008. A simple method to obtain single conidium isolates directly from banana (*Musa* sp.) leaves infected with *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26:76-78. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092008000100012
- Crous PW, Verkley GJM, Groenewald JZ and Samson RA. 2009. Fungal biodiversity. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute Press, Utrecht, Netherlands. 425p.
- De la Mora CJG, Chan CW, Durán PN, González EDR, Ruíz CJA and Muñoz UA. 2022. Costo-beneficio del trampeo y fluctuación poblacional de *Rhynchophorus palmarum* L. en genotipos de coco (*Cocos nucifera* L.). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente* 28:447-463. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2022.02.010>
- Ehiobu J, Idamokoro E, Afolayan A. 2022. Biofungicides for Improvement of potato (*Solanum tuberosum* L.) Production. *Scientifica (Cairo)*. 3:1405900. <https://doi.org/10.1155/2022/1405900>
- Elliott TK, Broschat J, Uchida JY and Simone W. 2004. Compendium of ornamental palm diseases and disorders. Australasian Phytopathology Society Press, Australia, 71p. <https://my.apsnet.org/APSSStore/Product-Detail.aspx?WebsiteKey=2661527A-8D44-496C-A730-8CFEB6239BE7&iProductCode=43143>
- Fathi HF, Raof AMN and Hussein RA. 2019. Biological control of fungal brown spot disease in rice plants by *Streptomyces* spp. *Journal of Global Pharma Technology* 11:238-242. <http://www.jgpt.co.in/index.php/jgpt/article/view/2437>
- Fenta L and Mekonnen H. 2024. Microbial biofungicides as a substitute for chemical fungicides in the control of phytopathogens: Current perspectives and research directions. *Scientifica (Cairo)* 5322696. <https://doi.org/10.1155/2024/5322696>
- Gemaque BE, Savonitti V, Poltronieri LS, Nascimento MM and Silva PR. 2009. Assessment of incidence of three hybrids of coconut palm against leaf spot in the field conditions. *Revista de Ciências Agrárias* 51:161-170. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/30349/1/REVISTA-51-artigo-11.pdf>
- Hau FC and Rush MC. 1980. A system for inducing sporulation of *Bipolaris oryzae*. *Plant Disease* 64: 788-789. https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1980Articles/PlantDisease64n08_788.pdf
- Joseph JT, Mahalakshmi R, Revathy K, Panneerselvam K, Manikandan P and Shobana CS. 2019. Effectiveness of application of lignolytic fungal strains, *Cladosporium uredinicola* GRDBF21 and *Bipolaris maydis* GRDBF23 in the treatment of tannery effluent. *Journal Environmental Biology* 40:158-164. <http://doi.org/10.22438/jeb/40/2/MRN-771>
- Kamalakaran A, Valluvaparidasan V, Rabindran R, Salaheddin K and Ladhakshmi D. 2006. First report of *Bipolaris* leaf blight of coconut (*Cocos nucifera*) caused by *Bipolaris incurvata* in mainland India. *Plant Pathology* 55:579-579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01431.x>
- Kandan A, Akhtar J, Singh B, Dixit D, Chand D, Agarwal PC, Roy A and Rajkumar S. 2013. Population genetic diversity analysis of *Bipolaris oryzae* fungi infecting *Oryza sativa* in India using URP markers. *International Biannual Journal of Environmental Science* 7:123-128. https://www.researchgate.net/publication/264233842_Population_genetic_diversity_analysis_of_Bipolaris_oryzae_fungi_infecting_Oryza_sativa_in_India_using_URP_markers
- Karan R, Kalaimathi D, Renganathan P and Balabaskar P. 2022. Isolation and characterization of phylloplane associated bacteria and its *in vitro* antagonistic activity against *Bipolaris oryzae*. *Agricultural Science Digest* 5452: 1-4. <https://doi.org/10.18805/ag.D-5452>.
- Khan NA, Asaf S, Ahmad W, Jan R, Bilal S, Khan I, Khan AL, Kyung-Min K and Al-Harrasi A. 2023. Diversity, lifestyle, genomics, and their functional role of *Cochliobolus*, *Bipolaris*, and *Curvularia* species in environmental remediation and plant growth promotion under biotic and abiotic stressors. *Journal of Fungi* 9(254):1-29. <http://dx.doi.org/10.3390/jof9020254>
- Khan RAA, Najeeb S, Hussain S, Xie B and Li Y. 2020. Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic fungi. *Microorganisms* 8:1-22. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060817>
- Kielkopf CL, Bauer W and Urbatsch IL. 2020. Bradford assay for determining protein concentration. *Cold Spring Harbor Protocols* 4:102269. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot102269>
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kuan CS, Yew SM, Toh YF, Chan CL, Ngeow YF, Lee KW, Na SL, Yee WY, Hoh CC and Ng KP. 2015. Dissecting the fungal biology of *Bipolaris papendorffii*: from phylogenetic to comparative genomic analysis. *DNA Research*. 22:219-32. <http://dx.doi.org/10.1093/dnares/dsv007>

- Lekete E, Osekre EA, Andoh-Mensah E. 2022. First report of *Curvularia pseudobranchyspora* causing leaf spot disease on coconut (*Cocos nucifera* L.) seedlings in Ghana. *American Journal of Plant Science* 13:972-983. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2022.137064>
- Livitha R and Christopher J. 2023. Morphological and molecular characterization of *Bipolaris oryzae* causing brown leaf spot of rice in Cauvery delta region of Tamil Nadu. *The Pharma Innovation Journal* 12:1011-1016. <https://www.thepharmajournal.com/archives/2023/vol12issue10/PartM/12-9-340-290.pdf>
- Lorenzini M, Cappello MS, Logrieco A and Zapparoli G. 2016. Polymorphism and phylogenetic species delimitation in filamentous fungi from predominant mycobiota in withered grapes. *International Journal of Food Microbiology* 238:56–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.039>
- Lü Z, Kang X, Xiang Z and He N. 2017. Laccase gene *Sh-lac* is involved in the growth and melanin biosynthesis of *Sclerotium shiraiana*. *Phytopathology* 107:353-361. <http://doi.org/10.1094/PHYTO-04-16-0180-R>
- Manamgoda DS, Cai L, McKenzie EHC, Crous PW, Madrid H, Chukeatirote E and Shivas RG, Tan YP, Hyde KD. 2012. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* - *Cochliobolus* - *Curvularia* Complex. *Fungal Diversity* 56:131–144. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0189-2>
- Manamgoda DS, Rossman AY, Castlebury LA, Crous PW, Madrid H, Chukeatirote E and Hyde KD. 2014. The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology* 79:221-288. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.10.002>
- Manzo-Sánchez G, Pérez-Ocón R, Chan-Cupul W, Silva-Jiménez E, Sánchez-Rangel JA, Ayala-Zermeño MA and Galindo-Velasco E. 2018. Antifungal activity of ethanolic extracts of propolis against *Mycosphaerella fijiensis*: an *in vitro* study. *Scientia Fungorum* 47(1): 13- 24. <https://doi.org/10.33885/sf.2018.47.1189>
- Meghana SN and Hiremath SV. 2019. Cultural morphological and molecular characterization of *Bipolaris oryzae* causing brown leaf spot of rice in Northern Karnataka. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 8:1235-1239. <https://www.phytojournal.com/archives/2019/vol8issue2/PartT/8-1-548-759.pdf>
- Miller, D.N., J.E. Bryant, E.L. Madsen, and W.C. Ghiorse. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology* 65:4715-4724. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.11.4715-4724.1999>
- Nejad MS, Shahidi-Bonjar GH and Dehkaei FP. 2014. Control of *Bipolaris oryzae* the causal agent of rice brown spot disease via soil *Streptomyces* sp. isolate G. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research* 4:310-317. https://www.ijabbr.com/article_9089.html
- Niu XQ, Yu FY, Zhu H and Qin WQ. 2014. First report of leaf spot disease in coconut seedling caused by *Bipolaris setariae* in China. *Plant Disease* 98:1742. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-14-0522-PDN>
- Palomar MK and Betonio PA. 1982. Control of gray leaf spot disease of coconut with fungicides and potassium chloride. *Philippine Journal of Crop Science* 7:166-169. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20093019541>
- Palomares JE, Hirooka Y, Tsai IJ, Masuya H, Hino A, Kanzaki N, Jones JT and Kikuchi T. 2014. Distribution and evolution of glycoside hydrolase family 45 cellulases in nematodes and fungi. *BMC Evolutionary Biology* 14:1-12. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-69>
- Pérez TE, Bernal CA, Milanés VP, Sierra RY, Leiva MM, Marín GS y Monteagudo HO 2018. Eficacia de *Trichoderma harzianum* (Cepa A-34) y sus filtrados en el control de tres enfermedades fúngicas foliares en arroz. *Bioagro* 30:17-26. http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1316-33612018000100002&script=sci_abstract
- Pérez TEJ, Milanés VP, Bernal CA, Leiva MM, García RG, Lobato CLP, Cañar ALM, Sierra RY y Mena CO. 2013. Antagonismo “*in vitro*” de *Trichoderma harzianum* sobre aislados camagueyanos de *Bipolaris oryzae* y *Sarocladium oryzae*. *Centro Agrícola* 40:29-36. <http://cagricola.uclv.edu.cu/index.php/es/volumen-40-2013/numero-3-2013/169-antagonismo-in-vitro-de-trichoderma-harzianum-sobre-aislados-camagueeyanos-de-bipolaris-oryzae-y-sarocladium-oryzae>
- Prabhukarthikeyan SR, Manoj K, Yadav A, Anandan S, Aravindan U, Keerthana S, Raghu MS, Baite C, Parameswaran P, Panneerselvam and Rath PC. 2019. Bio-protection of brown spot disease of rice and insight into the molecular basis of interaction between *Oryza sativa*, *Bipolaris oryzae* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Biological Control* 137:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104018>

- Riddell RW. 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia* 42:265-270. <https://doi.org/10.1080/00275514.1950.12017830>
- Sánchez GBM, Ramírez PJG, Rodríguez GR, Guevara ALP, Raya PJC, Covarrubias PJ and Mora AMA. 2022. Molecular identification and antagonistic potential of three strains of *Streptomyces* against phytopathogenic fungi. *Agrociencia* 56:1-13. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i5.2793>
- Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert AK, Krohn K. 2002. Endophytic fungi: A source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* 106:996–1004. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006342>
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2024. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Recuperado de: https://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/ (Consulta enero 2025).
- Sivakumar R, Rajedran R, Balakumar C and Tamilvendan M. 2010. Isolation, screening and optimization of production medium for thermostable laccase production from *Ganoderma* sp. *International Journal of Engineering Science and Technology* 2:7133-7141. https://www.researchgate.net/publication/50384268_Isolation_Screening_and_Optimization_of_Production_Medium_for_Thermostable_Laccase_Production_from_Ganoderma_sp
- Sumathi T, Viswanath B, Sri Lakshmi A and SaiGopal DV. Production of laccase by *Cochliobolus* sp. isolated from plastic dumped soils and their ability to degrade low molecular weight PVC. *Biochemistry Research International* 9519527. <https://doi.org/10.1155/2016/9519527>
- Sun X, Qi X, Wang W, Liu X, Zhao H, Wu C, Chang X, Zhang M, Chen H and Gong G. 2020. Etiology and symptoms of maize leaf spot caused by *Bipolaris* spp. in Sichuan, China. *Pathogens* 9:1-8. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030229>
- Tamura K, Stecher G and Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tan YP, Madrid H, Crous PW and Shivas RG. 2014. *Johncornia* gen. et. comb. nov., and nine new combinations in *Curvularia* based on molecular phylogenetic analysis. *Australasian Plant Pathology* 43:589–603. <https://doi.org/10.1007/s13313-014-0315-6>
- Thakur K, Neta RS, Kerketta A, Thakur AK, Singh DP, Sing A, Pujari D, Yadu S, Kale S and Sai K. 2023. Effect of temperature, pH and media on growth and sporulation of *Helminthosporium oryzae*. *The Pharma Innovation Journal* 12:582-588. <https://www.thepharmajournal.com/archives/2023/vol12issue9/PartE/12-8-149-369.pdf>
- Thompson JD, Gibson TJ and Higgins DG. 2003. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current Protocols in Bioinformatics* 2:1-22. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0203s>
- Upadhyay P, Shrivastava R, Agrawal PK. 2016. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech* 6:1-12. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0316-3>
- Ushamali C, Ashok KP and Parthasarathy S. 2019. Efficacy of fungicides for the management of coconut leaf blight. *Research in Plant Disease* 34:29-35. <https://doi.org/10.5958/2249-8788.2019.00005.2>
- Valarmathi P and Ladhakshmi D. 2018. Morphological characterization of *Bipolaris oryzae* causing brown spot disease of Rice. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science* 7:161-170. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.702.021>
- Voigt K, Cigelnik E and O'donnell K. 1999. Phylogeny and PCR identification of clinically important zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *Journal of Clinical Microbiology* 37:3957-3964. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.12.3957-3964.1999>
- Vu D, Groenewald M, de Vries M, Gehrmann T, Stielow B, Eberhardt U, Al-Hatmi A, Groenewald JZ, Cardinali G, Houbraken J, Boekhout T, Crous PW, Robert V and Verkley GJM. 2019. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in Mycology* 92:135–154. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.05.001>
- Wang Y, Yang D and Zhiguo Y. 2023. New lactones produced by *Streptomyces* sp. SN5431 and their antifungal activity against *Bipolaris maydis*. *Microorganisms* 11:616. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030616>
- Wei Y, Pu J, Zhang H, Liu Y, Zhou Y, Zhang K and Liu X. 2017. The laccase gene (LAC1) is essential for *Colletotrichum gloeosporioides* development and virulence on mango leaves and fruits. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 99:55-64. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.03.005>

Zárate RA, Quero CAR, Miranda JL and Nava DC. 2022. Fungicides and *Bacillus subtilis* against fungi from commercial seed of side oats grama (*Bouteloua curtipendula*). Revista Mexicana de Fitopatología 40:103-115. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2104-4>

Zhai T, Wang H, Dong X, Wang S, Xin X, Du J, Guan Q, Jiao H, Yang W and Dong R. 2024. Laccase: a green biocatalyst offers immense potential for food industrial and biotechnological applications. Journal of Agricultural and Food Chemistry 72:24158-24169. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c06669>