



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

INSTITUTO DE HORTICULTURA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

CONTRIBUCIÓN A LA SUSTENTABILIDAD: COLÉMBOLOS PARA EL CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN CAFÉ

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA:

ABIGAIL ORTIZ MENDOZA

**BAJO LA SUPERVISIÓN DE: DRA. MA. TERESA MARTÍNEZ
DAMIÁN**

CHAPINGO, MÉXICO, DICIEMBRE 2016

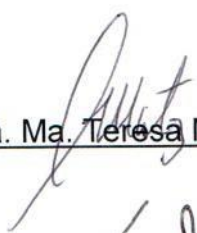


DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

CONTRIBUCIÓN A LA SUSTENTABILIDAD: COLÉMBOLOS PARA EL CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN CAFÉ

Tesis realizada por Ortiz Mendoza Abigail bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA



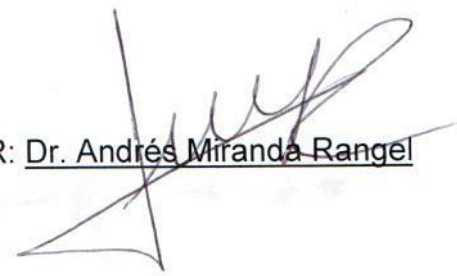
DIRECTOR: Dra. Ma. Teresa Martínez Damián



ASESOR: Dr. Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez



ASESOR: Dra. H. Gloria Calyecac Cortero



ASESOR: Dr. Andrés Miranda Rangel

CONTENIDO

CONTENIDO	III
LISTA DE CUADROS	V
LISTA DE FIGURAS	VI
AGRADECIMIENTOS	VII
DATOS BIOGRÁFICOS	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1 Centro de origen del café	2
2.2 Historia de su cultivo	2
2.3 Cultivo	3
2.4 Causas de las enfermedades en café	3
2.5 Enfermedades más importantes en café	4
2.5.2 Ojo de gallo: <i>Mycena citricolor</i>	4
2.6 Aspectos generales de las infecciones fungosas	5
2.7 Colémbolos	6
2.8 Morfología de los colémbolos	6
2.9 Condiciones de vida de los colémbolos	8
2.10 Importancia de los colémbolos	9
2.11 Hábitos alimenticios de los colémbolos	9
2.12 Estudios realizados sobre la selectividad de los colémbolos en su alimentación	10
3. LITERATURA CITADA	11
4. INTERACCIÓN BIOLÓGICA ENTRE <i>Orchesella bifasciata</i> Bourlet y HONGOS EN PLANTAS DE CAFÉ	16
4.1 RESUMEN	16
4.2 ABSTRACT	16
4.3 INTRODUCCIÓN	17

4.4 MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.4.1 Colecta de hojas de café para deducir área foliar total y afectada ..	18
4.4.2 Colecta de hojas para aislamiento de hongos fitopatógenos.....	18
4.4.3 Colecta de colémbolos.....	18
4.4.4 Fase de Laboratorio.....	19
4.4.5 Preparación del material y medio de cultivo	19
4.4.6 Tratamiento a hojas	19
4.4.7 Tratamiento a hojarasca	20
4.4.8 Aislamiento de hongos.....	20
4.4.9 Pruebas de preferencia.....	21
4.4.10 Tratamientos	21
4.4.11 Colémbolos con <i>Hemileia vastatrix</i>	22
4.4.12 Montaje de colémbolos en líquido Hoyer	23
4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
4.5.1 Cultivos asociados a las plantas de café en las parcelas de Santiago Ecatlán.....	23
4.5.2 Análisis de área foliar afectada.....	24
4.5.3 Colémbolos colectados.....	24
4.5.4 Identificación de <i>Orchesella bifasciata</i>	25
4.5.5 Hongos aislados y pruebas de preferencia.....	25
4. 6 CONCLUSIONES.....	30
4.7 LITERATURA CITADA	30

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Análisis de área foliar y afectada	24
Cuadro 2. Porcentaje de germinación de esporas en los tratamientos.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología general de colémbolos.....	7
Figura 2. Colémbolos colectados durante 2015 y 2016.	24
Figura 3. Preferencia alimenticia en cada una de las cepas.....	27
Figura 4. Porcentaje de mortalidad de individuos durante la prueba.....	29

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Instituto de Horticultura, por darme la oportunidad de estudiar en una Institución con tanto prestigio.

A las familias Totonacas que me brindaron su hospitalidad mientras se desarrolló este proyecto.

A mis amigos, hermanos, que siempre me apoyaron en este tiempo, Rodrigo, Arely, Rubí, Christian, Chucho, Lulú, Angelito, Diego.

Al Dr. Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez, por todo su apoyo, consejos, en la realización de este proyecto y por encaminarme en el camino de la etnobiología.

A la Dra. Teresa Martínez Damián, Dra. H. Gloria Calyecac Cortero y al Dr. Andrés Miranda por formar parte de mi comité, y por su asesoría.

Al M. en C. Eduardo Santiago Elena, por todo su apoyo brindado, consejos, asesoría, y disposición que tuvo para ayudarme, en todo momento y ala M. en C. Victoria Ayala y al M. en C. Juan Valdés por sus valiosos aportes a esta investigación.

A la Dra. María Sol Robledo y Monterrubio, por compartir su conocimiento, a su esposo y el técnico de laboratorio: Iván, de Histología y Citología Gral.

DATOS BIOGRÁFICOS

La autora de la presente, nació el 26 de Diciembre de 1989 en el municipio de Actopan, en el Estado de Hidalgo, realizó sus estudios de una telesecundaria y posteriormente siguió en el Colegio de Bachilleres del estado de Hidalgo en donde obtuvo un título técnico de especialista en informática. En el año 2008 ingresó a la Universidad Politécnica de Pachuca, en donde se graduó como Ingeniera en Biotecnología, posteriormente trabajo como control de calidad en una empresa exportadora de hortalizas en el estado de Querétaro, y en el año 2015, ingresó a la Maestría en Ciencias en Horticultura en la Universidad Autónoma Chapingo.

A mi mamá: Claudia Mendoza Mayorga

1. INTRODUCCIÓN

En México, el cultivo de café es muy importante; debido a esta actividad se ha logrado plantear un sistema integral de cadenas productivas, que conduce a la generación de empleos y por medio de la cual subsisten muchos pequeños productores; Alrededor del 80 % de la producción nacional de café se obtiene de los Estados de: Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Puebla, Guerrero e Hidalgo (Santoyo *et al.*, 1995; FIRA, 2003) y alrededor de 30 grupos indígenas están involucrados en esta actividad; el grano es considerado uno de los productos agrícolas de mayor importancia económica, sociocultural y ambiental en el sentido de su gran importancia ecológica (Pérez y Díaz, 2000), ya que alrededor del 90 % de la superficie cultivada con café se encuentra bajo sombra diversificada, la cual actúa considerablemente como conservadora y promotora de biodiversidad (Moguel y Toledo, 1999, Giovannucci y Juárez, 2006).

Sin embargo, al ser el café una especie introducida, con poca variabilidad genética y aunado a las grandes extensiones de monocultivo, ha desarrollado una gran sensibilidad a enfermedades fungosas principalmente, lo cual ha perjudicado en gran manera a los agricultores ya que el precio del café ha ido en declive debido a estos acontecimientos, además del gasto que implica el intentar controlar con agroquímicos como fungicidas, herbicidas y fertilizantes, dejando una importante huella ecológica negativa contaminando mantos freáticos, suelos y el aire, razón por la cual, en las últimas décadas se ha venido dando un intento por cambiar las estrategias de producción agrícola que implican el uso intensivo de energía, maquinaria y sustancias químicas (Altieri, 1998), tratando de generar opciones de manejo y aprovechamiento sustentable de la agrobiodiversidad.

En este sentido, se busca tener un sistema integrado de prácticas de producción vegetal que a largo plazo, satisfaga las necesidades humanas de alimentos, mejore la calidad ambiental y la base de recursos naturales, de los cuales depende la economía agrícola, sé le dé un uso eficiente a los recursos no renovables, y aumente la calidad de vida de los agricultores y de la sociedad (FACTA, 1990).

Una de las alternativas que ha tomado mucha importancia es el control biológico, que consiste en enfrentar plagas con el uso de organismos vivos, el cual es uno de los factores con mayor importancia dentro de las técnicas de control que se complementan entre sí para el desarrollo del sistema integral de producción, por lo cual, como contribución, para efectos del presente estudio el objetivo de este trabajo fue evaluar la interacción biológica entre *Orchesella Bifasciata* B. orden Collembola con algunos hongos fitopatógenos de café.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Los recursos fitogenéticos constituyen la base de la seguridad alimentaria en el mundo (Jackson 1997). En el caso del café, estos recursos están conformados por 125 especies descritas en el género *Coffea* familia de las *Rubiaceas* (The plant list, 2016).

2.1 Centro de origen del café

Las poblaciones silvestres de estas especies se encuentran en estado natural en África tropical o conservadas en condiciones *ex situ* en diversos bancos de germoplasma (Anthony *et al.*, 2003).

El centro de origen del café Arábico es Etiopía, país donde se inició su cultivo (Anthony *et al.*, 1999), esto se sabe gracias a que en las áreas montañosas de este país y áreas vecinas, el café Arábico crece en forma silvestre sobre los 1500 msnm (León, 2000).

2.2 Historia de su cultivo

Se estima que se inició con su cultivo a principios siglo VIII, teniéndose como un monopolio de los árabes, con una fuerte expansión hacía Yemen en el siglo XIV, y hacia el Oriente Medio durante el siglo XV. La primera introducción de café a Europa fue en 1706, a partir de la cual se originaron la mayoría de variedades cultivadas actualmente en el mundo. Las primeras plantas de café introducidas al continente Americano se dieron a inicios del siglo XVIII (Anthony *et al.*, 1999) y a inicios del siglo XIX el cultivo se extendió por toda América tropical (León, 2000). Según estos reportes es posible deducir, que los cafés de Yemen dieron

origen a dos tipos de café Arábica: 1) *C. arabica* var. *typica* (arabica), y 2) *C. arabica* var. *Bourbon*, de las cuales la primera es comúnmente conocida como café Arábigo, *Typica* o *Típica*, que constituyó la base genética de las primeras variedades cultivadas en América y Asia; es así como se concluye que, todas las variedades cultivadas en América Latina hasta mediados del siglo XX compartieron la base genética del café *Typica* (Anthony *et al.*, 1999).

2.3 Cultivo

En México, alrededor del 97% de la producción de todos los estados cafetaleros se obtiene de la especie *Coffea arabica* y sólo el 3% de la producción corresponde a las otras especies, como *Coffea canephora*, también conocida como robusta, la cual se cultiva en zonas bajas de Veracruz, Chiapas y Oaxaca. Dentro de las variedades de arábigos las que más son cultivadas en nuestro país son: *Typica*, *Caturra* y *Bourbón*, y en menor cantidad Costa Rica.

Por las características del cafeto, su producción está acotada por un límite geográfico comprendido por los Trópicos de Cáncer y de Capricornio, requiriéndose además condiciones de clima cálido a templado con altos niveles de humedad y exposición indirecta al sol (Anthony *et al.*, 1999).

2.4 Causas de las enfermedades en café

Las evidencias sobre el origen del cultivo de café en América Latina pueden explicar los procesos de erosión genética por los que han pasado las bases genéticas *Typica* y *Bourbon*, dando como consecuencia, que los cultivares actuales derivados de estos dos grupos genéticos, debido a su reducida base genética, sean altamente susceptibles a nuevas plagas y enfermedades y presenten baja adaptabilidad a nuevas condiciones de cultivo (Wilches, 1995).

Aunado a esto, según Agrios, (2005) cuando se cultivan plantas de manera más intensiva por lo general sufren gravemente de ataque por plagas y patógenos. La principal causa de las enfermedades en café son los hongos.

2.5 Enfermedades más importantes en café

2.5.1 Roya del café: *Hemileia vastatrix*

Hemileia vastatrix es el agente causal de la roya del café, una de las enfermedades más severas en América Latina (Avelino y Savary, 2002).

Se encuentra diseminada en todos los países donde es cultivado el café y puede causar pérdidas de 10% a 40% (Silva *et al.*, 2006).

H. vastatrix es un hongo parásito obligado que afecta las hojas de las especies del género *Coffea*, y se multiplica principalmente a través de uredosporas (Anthony *et al.*, 2007). Los primeros síntomas de la enfermedad, son pequeñas lesiones amarillentas, aparecen alrededor del punto de penetración en el envés de las hojas, con el tiempo se unen y producen las uredosporas que se tornan color naranja; en el haz se observa manchas cloróticas y finalmente las lesiones se vuelven necróticas, propiciando la reducción de la capacidad fotosintética así como el debilitamiento de árboles enfermos y en infecciones severas puede ocasionar muerte regresiva en ramas e incluso la muerte de la planta (Avelino *et al.*, 1999).

2.5.2 Ojo de gallo: *Mycena citricolor*

Pertenece a la clase Basidiomycetes, orden Agaricales, familia Agaricaceae. Es un hongo patógeno, presente en gran parte de la superficie de cultivo de café en América Latina es causante de la enfermedad conocida como “ojo de gallo”, la cual tiene la capacidad de infectar desde tallos, hojas, frutos hasta ramas, principalmente durante las etapas de fructificación y crecimiento vegetativo del cultivo (Muller *et al.*, 2004). Los síntomas son, en las hojas pequeñas manchas redondas hundidas, de diferente tamaño (6-10 mm) presentes en ambos lados de la hoja, las lesiones jóvenes presentan un color oscuro y las viejas un color crema, volviéndose pardo al final, lo cual corresponde al estado avanzado de la enfermedad, es entonces que el tejido afectado puede desprenderse, dejando perforaciones en las hojas (Wang y Avelino, 1999, Muller *et al.*, 2004); estas lesiones ocasionan la caída de las hojas debido al incremento del contenido de etileno, lo que trae como consecuencia la reducción considerable del área

fotosintética en las plantas (López, 2001) y consecuentemente ocasiona pérdidas de cosecha entre 13% y 35%, según los niveles de infección (Muller *et al.*, 2004).

Las condiciones ambientales favorables para la presencia de este hongo son: humedad alta, exceso de sombra (Fischersworing y Robkam, 2001), elevaciones sobre los 1200 msnm (Muller *et al.*, 2004), altas precipitaciones, altas densidades de arvenses, temperaturas bajas, aunque también los cultivos a pleno sol son sensibles debido al efecto de la desnutrición (GRDE, 2006). Los medios de transmisión son la semilla, el hombre, insectos y otros animales, y localmente es dispersada por la lluvia y el viento (Fischersworing y Robkam, 2001; GRDE, 2006). Características importantes de este hongo son la capacidad de sobrevivir en tejidos muertos y la facultad de mantenerse inactivo durante los meses de verano y volviéndose a activar cuando encuentra las condiciones favorables.

2.6 Aspectos generales de las infecciones fungosas

La planta se vuelve más susceptible al ataque de enfermedades durante la etapa de producción, debido a que la mayor parte de los compuestos fenólicos (metabolitos secundarios sintetizados para defensa) son enviados hacia los frutos; las condiciones que favorecen el desarrollo de éstas son: una fuerte intensidad lumínica y temperaturas altas, aunque también se ven involucrados factores como, la resistencia genética, el potencial hídrico del suelo y la humedad relativa, que serán determinantes para la colonización de la hoja por un hongo. En la zona tropical el desarrollo epidemiológico del hongo comprende cuatro fases: desarrollo lento, fase de crecimiento acelerado, infección máxima y descenso. La curva de desarrollo de la enfermedad está relacionada a cinco factores principales, la lluvia, la temperatura, la carga fructífera, la época de cosecha y el inóculo residual (Avelino *et al.*, 1999). La agresividad de la enfermedad se debe a la abundancia del inóculo y la rápida diseminación influenciada por los factores ambientales (Aguilar, 1995). La fuerte defoliación causada por las enfermedades se traduce en disminuciones significativas de la producción, se ha reportado que con un nivel de infección de 68 % hay pérdidas de producción de hasta 48 % (Avelino *et al.*, 1999). El control de enfermedades se basa en el uso de técnicas de erradicación, que por lo general resultan ser

medidas costosas como lo es el uso de fungicidas que además degradan el ambiente, la importancia de los patógenos, orienta hacia la búsqueda de estrategias económica y ecológicamente viables para el manejo de estas enfermedades (Muller *et al.*, 2004), por lo cual una alternativa sana y amigable con el medio la constituye el entendimiento de las interacciones biológicas dentro del agroecosistema, permitiendo el desarrollo de cada uno de sus componentes.

2.7 Colémbolos

Los colémbolos son pequeños hexápodos, con un tamaño aproximado de 2 mm de longitud (entre 200 micras y 10 mm), son muy abundantes y habitan en diferentes ambientes; con frecuencia son registradas densidades de hasta de más de 100 000 ind/ m² de suelo (Hopkin, 2002). Existen alrededor de 7800 especies (Bellinger *et al.*, 2012), agrupadas en 28 familias, que han sido registradas en todos los continentes, incluyendo la Antártica. En América han sido encontradas 1600 especies, de las cuales 900 pertenecen a la región neotropical, agrupadas en 156 géneros y a 23 familias (Vázquez y Palacios, 2004).

Estos organismos se desarrollan en diversos hábitats a diferentes elevaciones y con diferentes temperaturas, tanto en épocas de alta humedad como semisecas por lo que su presencia puede ser un indicador de que existe más de una cadena trófica (Wolter, 1963).

2.8 Morfología de los colémbolos

El cuerpo de los colémbolos está cubierto de sedas y con frecuencia de escamas y tricobotrias, se divide en tres regiones (Jordana y Baquero, 2005):

- 1) Cabeza, con un par de antenas con cuatro artejos (a veces subdivididos o anillados y con numerosas sedas y sencillas) y ocho corneolas a cada lado de la cabeza; algunas especies cavernícolas o de suelos profundos carecen por completo de ojos. Entre las corneolas y las antenas, puede existir un órgano post-antenal formado por una o numerosas vesículas. Las piezas bucales, mandíbulas

y maxilas, están dentro de la cavidad bucal y pueden estar adaptadas para masticar o picar sus alimentos.

2) Tórax, a su vez conformado por tres segmentos, cada uno lleva un par de patas; las patas están formadas por: precoxa, coxa, trocánter, fémur y tibiotarso cuyo ápice tiene un pretarso con una o dos sedas, un ungues y por lo general un apéndice empodial. El tibiotarso de muchos géneros tiene sedas capitadas llamadas “tenent hairs”.

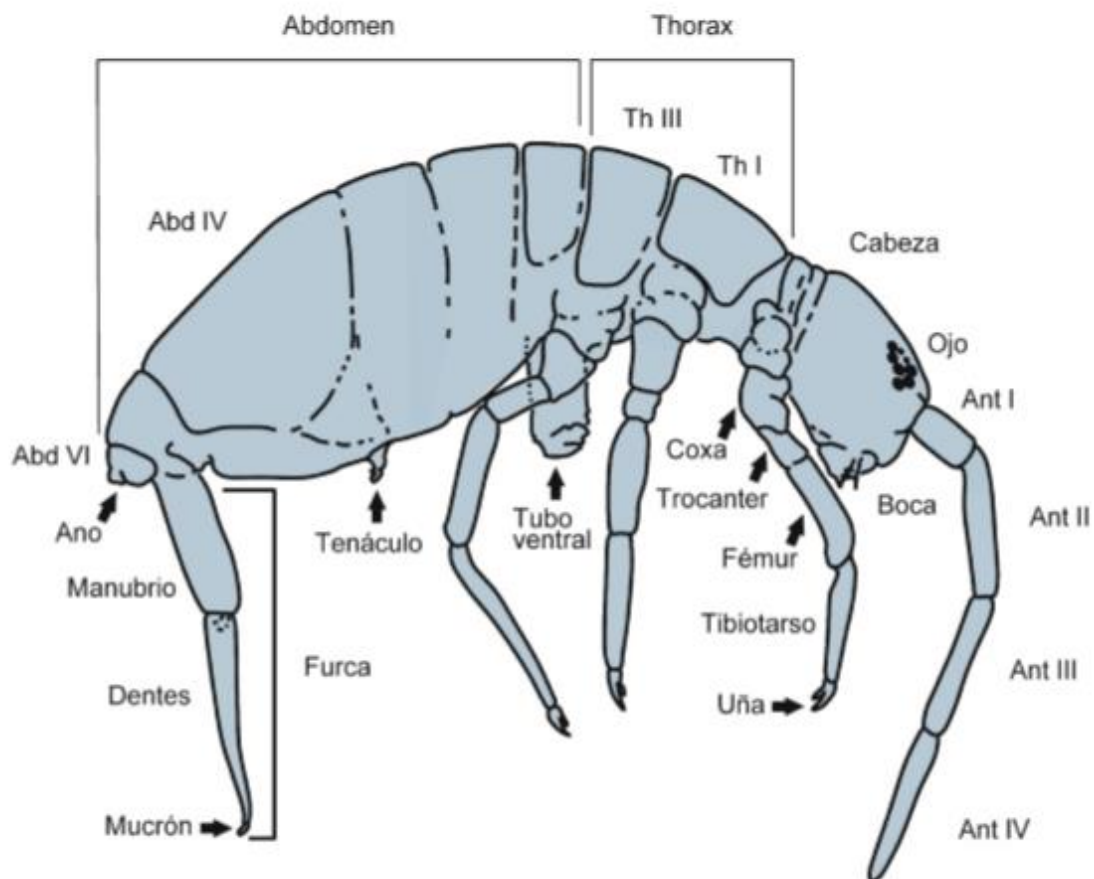


Figura 1. Morfología general de colémbolos (Entomobryidae) (Jordana y Baquero, 2005).

3) Abdomen, que puede ser deprimido, o comprimido como pequeños camarones y constituido por seis segmentos, algunos de ellos pueden estar fusionados dependiendo de las familias (Hopkin, 2002). El abdomen lleva un tubo ventral pegajoso, llamado colóforo, el cual usan para adherirse a superficies lisas y es

una de sus características más representativas, en el primer segmento también está formado por un retináculo en el tercero que le sirve para fijar la fúrcula (furca) cuando está en reposo, se encuentra en el cuarto segmento. La fúrcula está formada por una parte basal llamada manubrio, un par de dentes en cuyos ápices está un mucrón, su desarrollo varía y las especies que viven en suelos profundos han perdido la capacidad de brincar y carecen de ella, la abertura genital y la abertura anal en el quinto y sexto segmento, respectivamente.

Los colémbolos pueden ser blancos, azules, grises, rojos, amarillos y hasta multicolores. Su cuerpo puede ser alargado, o globoso, depende del grupo al que pertenecen y el ambiente en que viven. La mayoría respira por medio de la cutícula y pocas especies tienen tráquea.

2.9 Condiciones de vida de los colémbolos

Gregarismo: Algunas especies tienen, en ciertas partes de su vida, comportamiento gregario, que se cree está controlado por feromonas producidas por los adultos y puede estar influenciado por situaciones de estrés por riesgo de desecación o por presencia de depredadores (Negri, 2004).

Desarrollo: es ametábolo (o directo), diferenciándose externamente los juveniles de los adultos únicamente en el tamaño y en la ausencia de abertura genital. En caso de aparecer condiciones ambientales adversas, o simplemente unas determinadas, algunos géneros sufren ecomorfosis, que está asociada a la regresión de las piezas bucales y del sistema digestivo, con ocasionales modificaciones de la cutícula o aparición de espinas (Christiansen, 1990). Como el resto de artrópodos, mudan para poder crecer.

Reproducción: Los colémbolos tienen sexos separados y transferencia indirecta del esperma, mediante la colocación por el macho de un espermatóforo en el suelo (en este caso es recogido posteriormente por la hembra), o directamente en la abertura genital de la hembra. Algunos géneros sitúan el espermatóforo en el extremo de un pedúnculo (Hopkin, 1997). Hay especies en las que se ha

demostrado la partenogénesis, incluso del tipo geográfico (Casagnau, 1972) o producida por *Wolbachia* (Czarnetzki & Tebbe, 2004).

2.10 Importancia de los colémbolos

Su importancia radica en el papel funcional en los procesos de descomposición de la materia vegetal muerta, del ciclo de nutrientes y participación en la formación de las características del suelo (Cassagne *et al.*, 2003). Sus heces tienen influencia en los procesos húmicos, también intervienen en la dispersión de bacterias y tienen un fuerte impacto en las poblaciones de hongos, sin embargo también forman parte fundamental de la cadena alimenticia siendo presa de muchos insectos, en particular de hormigas y escarabajos, así como de numerosos ácaros depredadores, arañas y algunos vertebrados como aves, ranas y peces (Palacios-Vargas *et al.*, 2000).

Los colémbolos han mostrado tener un potencial como bioindicadores del estado del medio edáfico, produciéndose cambios cuantitativos y cualitativos en las poblaciones cuando se dan modificaciones en la situación de su ambiente o por disminución del aporte orgánico, por ejemplo (Ariño *et al.*, 1992). Se pueden relacionar con sucesiones ecológicas, e incluso en relación con la Paleontología, servir de indicadores de condiciones ambientales, relacionadas, principalmente con la temperatura y humedad (Bengtsson, 1994; Hopkin, 1997).

2.11 Hábitos alimenticios de los colémbolos

Los colémbolos son selectivos entre varias fuentes de alimentos. Los hábitos alimenticios pueden ser conocidos por la morfología de las estructuras de su aparato bucal y el análisis del contenido intestinal (Wolter, 1963).

Diversos estudios realizados, sugieren que la mayor parte de los colémbolos son principalmente de hábitos fungívoros, (Bardgett *et al.*, 1993; Hopkin, 1997; Rusek, 1998), es decir su dieta consiste mayormente de esporas y micelios de hongos, levaduras, bacterias y aunque en menos magnitud pero no despreciable, también de materia vegetal en descomposición (Castaño *et al.*, 2004) y existen

algunas especies depredadoras que se alimentan de nematodos, rotíferos y de otros colémbolos (Palacios-Vargas *et al.*, 2000). Las especies que acostumbran subir a la vegetación o que habitan permanentemente en ésta ingieren con más frecuencia granos de polen y esporas de hongos (Christiansen, 1964). Gracias a su alimentación fungívora, son capaces de influenciar fuertemente el comportamiento de poblaciones de hongos (Parkinson *et al.*, 1979; Klironomos, *et al.*, 1992). La preferencia de ciertas estructuras fúngicas, tiene efectos directos, sobre la actividad y abundancia de las colonias (Hanlon y Anderson, 1979).

Estudios *in vitro* demuestran que los colémbolos prefieren hongos saprofitos que micorrizicos (Klironomos y Kendrick, 1996; Jorgensen *et al.*, 2003), y aún más que los saprofitos tienen preferencia por los fitopatógenos, sin embargo esta búsqueda de los colémbolos hacía los hongos, se ha visto limitada por las características estructurales del suelo, ya que podría haber más oportunidad de alimentarse de los saprofitos, que de los fitopatógenos (Larsen *et al.*, 2004).

2. 12 Estudios realizados sobre la selectividad de los colémbolos en su alimentación

Bardgett y colaboradores (1993), realizaron un estudio de prueba de preferencia de *Onychiurus latus* orden Colembolla hacia el hongo *Marasmius androsaceus* y *Mycena galopus* ambos presentes en hojarasca de coníferas lo cual resultó en una reducción considerable de la actividad de *Marasmius androsaceus*, y aumento en abundancia la presencia de *Mycena galopus*.

También, se ha encontrado que el colémbolo *Folsomia candida* muestra su selectividad alimentándose sólo de hifas metabólicamente activas (Moore *et al.*, 1987) y que selecciona las regiones del talo de hongos con alto contenido de N (Leonard, 1984).

La selectividad desarrollada se debe en gran parte a que los colémbolos buscan evitar el consumo de toxinas producidas por algunos hongos (Parkinson *et al.*, 1979); ya que algunas especies de colémbolos localizan y seleccionan hongos, a partir de los compuestos volátiles que liberan estos hongos (Bengtsson *et al.*,

1988). Esto ha sido observado en los cuerpos fructíferos de los basidiomicetos, micelio y materia orgánica colonizada, los cuales producen una amplia gama de compuestos orgánicos volátiles, así como compuestos orgánicos disueltos (Rotheray *et al.*, 2009).

En otro estudio realizado por Hedlund y colaboradores, (1991), se demostró que el consumo de *Onychirus armatus* sobre el hongo *Mortierella isabellina* inducen el cambio de hifas: de un crecimiento adpreso a la esporulación de hifas en forma de abanico.

Existen muchas otras especies que se alimentan de hongos por ejemplo *Tetrodontophora bielanensis*, que tiene preferencia por un amplio espectro de hongos durante el año de acuerdo a la disponibilidad de estos en el suelo (Matic y Koledin, 1985), y ha sido encontrada en ellos actividad enzimática de amilasas, laminarinasas, xilanasas, lichenasas, celulasas, y complejo de trehalasas (Urbasek y Rusek, 1994).

3. LITERATURA CITADA

- Aguilar, V., G., J. (1995). Variedad Costa Rica 95. San José, CR, *ICAFE*. 33 p.
- Agrios, G., N. (2005). Plant Pathology. 5th ed. *Elsevier Academic Press*, Burlington, 436-439.
- Altieri, M., A. (1998). Ecological impacts of industrial agriculture and the possibilities for truly sustainable farming. *Monthly Review* 50: 60-71
- Anthony, F., Astorga, C., & Berthaud, J. (1999). Los recursos genéticos: las bases de una solución genética a los problemas de la caficultura latinoamericana. *In*: Bertrand, B., Rapidel, B. (eds) Desafíos de la caficultura en Centroamérica. San José, CR, *IICA*, 369-406.
- Anthony, F., Astorga, C., Quiros, O., Bertrand, B., Etienne, H., Topart, P., & Lashermes, L. (2003). Diversidad genética de los cafés (*Coffea arabica*) silvestres y cultivados, revelada por marcadores moleculares. *Boletín PROMECAFE*, 96, 7-12.
- Anthony, F., Bertrand, B., Astorga, C., & Lashermes, P. (2007). Characterization and assessment of *Coffea arabica* L. genetic resources conserved in the field genebank. *In*: Engelmann, F., Dulloo, E., Astorga, C., Dussert, S., Anthony, F. (eds.) Complementary strategies for ex-situ conservation of Coffee (*Coffea arabica* L.) genetic resources . A case study on CATIE, Costa Rica, Tropical reviews in Agricultural Biodiversity. Roma, IT,

Biodiversity International, 35-46.

- Ariño, A., H., Moraza, M., L., Hernández, M., A., & Jordana, R. (1992). Cambios en la Edafofauna de hayedos alterados. Actas del Congreso Internacional del Haya, *Investigación agraria*, 60–66.
- Avelino, J., Muller, R., Eskes, A., Santacreo, R., & Holguín, F. (1999). La roya anaranjada del cafeto: mito y realidad. In: Bertrand, B., Rapidel, B. (eds.) *Desafíos de la caficultura en Centroamérica*. San José, CR, *IICA*, 193-241.
- Avelino, J., & Savary, S. (2002). Rational and optimezed chemical control of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). In CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) ed. *Recherche et caféiculture. Montpellier Cedex, FR*, 135-143.
- Bardgett, R., D., Whittaker, J., B., & Frankland, J., C. (1993). The diet and food preferences of *Onychiurus procampatus* (Collembola) from upland grassland soils. *Biology and Fertility of Soils*, 16, 296–298.
- Bellinger, P., F., Christiansen, K., A., & Janssens, F. (2012). Checklist of the Collembola of the World. Obtenido de: <http://www.collembola.org>
- Bengtsson, G., Erlandsson, A., & Rundgren, S. (1988). Fungal odor attracts soil collembola. *Soil Biology & Biochemistry*, 20, 25–30.
- Bengtsson J. (1994). Temporal predictability in forest soil communities. *Journal of Animal Ecology*, 63, 653–665.
- Cassagne, N., Gers, C., & Gauquelin, T. (2003). Relationships between Collembola, soil chemistry and humus types in forest stands. *Biology and Fertility of Soils*, 37, 355--361.
- Cassagnau, P. (1972). Parthénogenèse géographique et polyploidie chez *Neanura muscorum* (Temp.), Collembola, Neanuridae. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 274: 1846-1848.
- Castañón-Meneses, G., Palacios-Vargas, J., G., & Cutz-Pool, L., Q. (2004). Feeding habits of Collembola and their ecological niche. *Anales del Instituto de Biología- Serie Zoología*, Universidad Nacional Autónoma de México, 75, 135--142.
- Christiansen K. (1964). Bionomics of Collembola. *Ann. Rev. Entomol*, 9, 147-178.
- Christiansen, K., A. (1990). *Insecta: Collembola. Soil biology guide*. John Wiley & Sons, New York, 965-995.
- Czarnetzki, A., B., & Tebbe, C., C. (2004). Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia*. *Environmental Microbiology*, 6(1), 35--44.
- FACTA (1990). Food, Agriculture, Conservation and Trade Act of 1990. Ley Pública 101-624, Título XVI, Subtítulo A, Sección 1603. Centro Nacional de Derecho Agrícola. Obtenido de: <http://www.foodinsight.org/articles/agricultura-sustentable-la-biotecnologia-puede-desempenar-un-papel%3F#sthash.igl60cKq.dpuf>

- FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura). (2003). Situación de la red café, oportunidades de desarrollo en México. México: *Banco de México. Boletín Informativo* 519 (34): 105.
- Fischersworring, B., H., & Robkamp, R., R. (2001). Guía para la caficultura ecológica. Popayán, Colombia, 133-135.
- Giovannucci, D., & Juárez, C., R. (2006). Análisis prospectivo de política cafetalera: proyecto evaluación alianza para el campo. México. 2-8.
- GRDE (Gerencia Regional de Desarrollo Económico). (2006). Principales enfermedades del cultivo de café. *Tocache*, PE. 16 p.
- Hanlon, R., D., G., & Anderson, J., M. (1979). Effects of collembola grazing on microbial activity in decomposing leaf litter. *Oecologia*, 38, 93--99.
- Hedlund, K., Boddy, L., & Preston, C. M. (1991). Mycelial responses of the soil fungus, *Mortierella isabellina*, to grazing by *Oxychilus armatus* (Collembola). *Soil Biology and Biochemistry*, 23, 361--366.
- Hopkin S., P. (1997). Biology of the Springtails (Insecta: Collembola). Oxford University Press, 330p.
- Hopkin S. P. (2002). Collembola. In: Lal, M. R. (ed.), *Encyclopedia of Soil Science*, 207--210. New York: Dekker.
- Jackson, M., T. (1997). Conservation of rice genetic resources: the role of the International Rice Genebank at IRRI. *Plant Molecular Biology* 35: 61-76.
- Jordana, R. & Baquero, E. (2005). A proposal of characters for taxonomic identification of *Entomobrya* species (Collembola, Entomobryomorpha), with description of a new species. *Abhandlungen und Berichte des Naturkundemuseums Görlitz*, 76(2): 117-134.
- Jorgensen, H., B., Elmholt, S., & Petersen, H. (2003). Collembolan dietary specialization on soil grown fungi. *Biology and Fertility of Soils*, 39, 9--15.
- Klironomos, J., N., Widden, P., & Deslandes, I. (1992). Feeding preferences of the collembolan *Folsomia candida* in relation to microfungal successions on decaying litter. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 685--692.
- Klironomos, J., N., & Kendrick, B. (1996). Palatability of microfungi to soil arthropods in relation to the functioning of arbuscular mycorrhizae. *Biology and Fertility of Soils*, 21, 43--52.
- Larsen, T., Schjonning, P., & Axelsen, J. (2004). The impact of soil compaction on euedaphic Collembola. *Applied Soil Ecology*, 26, 273--281.
- Leon A., J. (2000). Botánica de los cultivos tropicales. 3 ed. aum. y rev. San José, CR, IICA, 350-364.
- Leonard M., A. (1984). Observations on the influence of culture conditions of the fungal feeding preferences of *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae). *Pedobiologia*, 26, 361--367.
- López A., A. (2001). Caracterización molecular y morfológica de aislamientos del

- hongo *Mycena citricolor* colectados en diferentes zonas cafetaleras de Costa Rica, CR, CATIE. 68 p.
- Matic, R. & Koledin, D. (1985). Preference and feeding speciality of *Tetrodontophora bielanensis* (Collembola, Insecta) under laboratory conditions. *Ecol. Biol. Sol*, 22, 121--129.
- Moguel, P., & Toledo, V. (1999). El café en México. *Ecología, Cultura Indígena y Sustentabilidad*, 11, 3--12.
- Moore, J., C., Ingham, E., R., & Coleman, D., C. (1987). Interand intraspecific feeding selectivity of *Folsomia candida* (Collembola, Isotomidae) on fungi. *Biology and Fertility of Soils*, 5, 6--12.
- Muller, R., A., Berry, D., Avelino, J., & Bieysse, D. (2004). Coffee diseases. In: Wintgens, J., N. (ed.). Coffee: growing, processing, sustainable production: a guidebook for growers, processors, traders, and researchers. Corseaux, CH, Wiley-VCH, 491-545.
- Negri I. (2004). Spatial distribution of Collembola in presence and absence of a predator. *Pedobiologia*, 48, 585-588.
- Palacios-Vargas J., G. (2000). Los colémbolos en los ecosistemas mexicanos. *Biodiversitas*, 5, 12--15.
- Parkinson, D., Visser, A., Whittaker, & J. B. (1979). Effects of collembola grazing on fungal colonization of leaf litter. *Soil Biology & Biochemistry*, 11, 529--535.
- Pérez, P., J., R., & Díaz, C., S. (2000). El café, bebida que conquistó al mundo. México, Universidad Autónoma Chapingo. 151 p.
- Rotheray, T., D., Boddy, L., & Jones, T. H. (2009). Collembola foraging responses to interacting fungi. *Ecological Entomology*, 34, 125-132.
- Rusek J. (1998). Biodiversity of Collembola and their functional role in the ecosystem. *Biodiversity and Conservation*, 7, 1207--1219.
- Santoyo, C., V., H., Díaz, C., S., & Rodríguez, P., B. (1995). Sistema Agroindustrial café en México. Diagnóstico, problemática y alternativas México: Universidad Autónoma Chapingo. 157p.
- Silva, M., C., Várzea, V., Guerra, G., L., Gil, A., H., Fernandez, D., Petitot, A., S., Bertrand, B., Lashermes, F., & Nicole, M. (2006). Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Braz. Journal Plant Physiol.* 18(1):119.147.
- The plant list. (2016). Obtenido de <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=cofea+spp>
- Vázquez, M., M., & Palacios-Vargas, J., G. (2004). Catálogo de colémbolos (Hexápoda: Collembola) de Sian Ka'an, Quintana Roo: Universidad de Quintana Roo-CONABIO.
- Wang, A., & Avelino, J. (1999). El ojo de gallo del cafeto (*Mycena citricolor*). In:

- Bertrand, B., & Rapidel, B. (eds.) Desafíos de la caficultura en Centroamérica. San José, CR, IICA, 243-260.
- Wilches M., A., V. (1995). Uso de los marcadores moleculares RAPDs para evaluar la diversidad genética de los recursos genéticos de café *Coffea arabica*. Turrialba, CR, CATIE. 56 p.
- Wolter H. (1963). Vergleichende Untersuchungen zur Anatomie und Funktionsmorphologie der stechendsaugenden Mundwerkzeuge der Collembolen. *Zool. Jahr. Anatom*, 81, 27–100.

4. INTERACCIÓN BIOLÓGICA ENTRE *Orchesella bifasciata*

Bourlet y HONGOS EN PLANTAS DE CAFÉ

BIOLOGICAL INTERACTION BETWEEN *Orchesella bifasciata*

Bourlet and FUNGI IN COFFEE PLANTS

Abigail Ortiz Mendoza¹ y Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez²

4.1 RESUMEN

Considerando el importante rol ecológico de los colémbolos en los agroecosistemas con plantas de café, se llevó a cabo el estudio de la presencia e interacción entre *Orchesella bifasciata* B. orden Collembola y hongos aislados de las hojas de dichas plantas, en cuatro parcelas con diferentes grados de manejo: monocultivo, convencional, sin manejo y orgánico, se colectaron 831 individuos, de los cuales: 12 en la parcela de monocultivo, 239, en la de manejo convencional, 280 en la sin manejo y 300 en la de manejo orgánico. Se realizaron pruebas de preferencia con hongos aislados, los cuales fueron identificados a nivel de género como, *Penicillium*, *Gliocadium* spp 1, *Gliocadium* spp 2, *Fusarium* spp, *Alternaria* spp, *Pestalotia* spp. Se comprobó que los individuos ingieren propágulos fúngicos de éstos; posteriormente fueron sometidos a dos tratamientos con cuatro repeticiones cada uno, en el tratamiento uno, los colémbolos de la prueba de preferencia fueron pasados vivos a cajas con PDA, resultando que *O. bifasciata* transporta propágulos fúngicos en su exoesqueleto y cutícula, las cuales (aunque es poco probable) podrían germinar si encuentran las condiciones óptimas en campo, el tratamiento dos, que consistió en pasar a los colémbolos desinfestados a cajas con PDA, resultando que la mayoría de las estructuras en su tracto digestivo no fructificaron, a excepción de *Penicillium* que germinó en un 99 % en T₁ y 75 % en T₂. Respecto al tipo de manejo, los datos obtenidos demuestran que éste influye en la presencia de las familias Collembola en los agroecosistemas.

Palabras clave: *Orchesella bifasciata*, Colembolla, propágulos fúngicos.

4.2 ABSTRACT

Considering the important ecological role of springtails in agroecosystems with coffee plants, the study of the presence and interaction between *Orchesella bifasciata* B. order Collembola and fungi isolated from the leaves of these plants was carried out, in four plots with different degrees of management: monoculture, conventional, unmanaged and organic. A total of 831 individuals were collected: 12 in the monoculture plot; 239, conventional management; 280, unmanaged and 300, organic management. Preference tests were carried out with isolated fungi, which were identified at the genus level as *Penicillium*, *Gliocadium* spp 1, *Gliocadium* spp 2, *Fusarium* spp, *Alternaria* spp, *Pestalotia* spp. It was found that individuals ingest the fungal propagules; They were then subjected to two treatments with four replicates each: in treatment one, the preference test springtails were moved alive to Petri dish with PDA, proving that *O. bifasciata* transports fungal propagules in its exoskeleton and cuticle, which (although it is unlikely) could germinate if they found the optimum conditions in the field; in treatment two, disinfested springtails were moved to Petri dish with PDA, resulting in most of the structures in their digestive tract failing to fructify, except for *Penicillium* that germinated in a 99 % in T₁ and 75 % in T₂. The data obtained shows that plot management influences the presence of Collembola families in agroecosystems

Keywords: *Orchesella bifasciata*, Colembolla, fungal propagules.

4.3 INTRODUCCIÓN

En México, el café es considerado uno de los cultivos de mayor importancia económica, sociocultural y ambiental en el sentido de su gran importancia ecológica (Pérez y Díaz, 2000), ya que alrededor del 90 % de la superficie cultivada se encuentra bajo sombra diversificada, la cual actúa considerablemente como conservador de biodiversidad (Giovannucci y Juárez, 2006). Sin embargo, ha desarrollado una gran sensibilidad a enfermedades fungosas principalmente, lo cual ha perjudicado en gran manera ya que el precio del grano ha ido en declive debido a estos acontecimientos, además del gasto que implica el intentar controlar con agroquímicos como fungicidas, herbicidas, fertilizantes (Altieri, 1992; Sarandón, 2002), dejando una importante huella ecológica contaminando mantos freáticos, suelos y el aire, razón por la cual, en las últimas décadas se ha venido dando un intento por cambiar las estrategias de producción agrícola que implican el uso intensivo de energía, maquinaria y sustancias químicas (Altieri, 1998), por sistemas de manejo sustentables.

Una de estas técnicas, que tiene mucho impacto y ha tenido mucho éxito es el control biológico, el cual consiste en enfrentar plagas con el uso de organismos vivos. Se ha demostrado en diversos estudios que los colémbolos son fungívoros, debido al contenido de nitrógeno que presentan los hongos y que son capaces de degradar las paredes celulares de algunos de ellos, gracias a un complejo enzimático formado por trehalasas, celulasas y quitinasas que contienen en el tracto digestivo (Berg *et al.*, 2004), llegando a impactar fuertemente las poblaciones de hongos (Lenoir *et al.*, 2007). El presente estudio se realizó para evaluar la interacción entre *Orchesella bifasciata* B. orden Collembola, como posible consumidor de hongos fitopatógenos de café, y la influencia que tienen en ellos el manejo de la parcelas.

4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron colectas de colémbolos y hojas en parcelas de Santiago Ecatlán, perteneciente en el municipio de Jonotla, Puebla, ubicado dentro de la Sierra Norte de Puebla. Los análisis se realizaron en cuatro parcelas: 1) Monocultivo, 2) Manejo convencional, 3) Sin manejo y 4) Manejo orgánico. Las parcelas cuentan con un suelo franco-arenoso, y alta cantidad de materia orgánica, y cuentan con una superficie aproximada de 1.5 ha cada una; las variedades de cafeto utilizadas en estas parcelas son: Arábigo, Costa Rica, Caturra, ubicadas aleatoriamente.

4.4.1 Colecta de hojas de café para deducir área foliar total y afectada

Por medio del método de muestreo 5 oros, se llevó a cabo la evaluación de la severidad de ataque de hongos fitopatógenos en hojas, se tomaron al azar 10 hojas por planta, obteniendo un total de 200 hojas por parcela (SAGARPA, 2013). Las hojas colectadas fueron escaneadas, y posteriormente por medio del software GIMP 2, editadas para ser transferidas a ImageJ y poder realizar el cálculo de la superficie total y la dañada, finalmente los datos se analizaron con la ayuda del paquete de office Excel 2013.

4.4.2 Colecta de hojas para aislamiento de hongos fitopatógenos

Se tomaron hojas con síntomas visibles de enfermedad, colocándolas en bolsas de papel para evitar su pudrición; las bolsas fueron transportadas en hielera debidamente etiquetadas.

4.4.3 Colecta de colémbolos

Se realizó la colecta de colémbolos empleando las siguientes técnicas:

1. Para coleccionar los colémbolos de las hojas se utilizaron frascos de plástico, cada vez que se identificó un colémbolo en el envés de la hoja, con mucho cuidado para que no saltará, fue atrapado haciendo un corte en la hoja, de modo que sólo quedara una pequeña superficie en donde estaba el colémbolo, este frasco se selló con tela tul y ligas, y se transportó en

hielera, asperjando cada 12 horas para mantener una humedad relativa alta, así como también se alimentaron con levadura de cerveza. El tamaño de la muestra fue de 75 % de la capacidad del frasco utilizado.

2. Se colectaron hojas completas en donde se notó la presencia de colémbolos en su superficie, introduciéndolas con mucho cuidado en bolsas de plástico transparente y para evitar la pérdida de humedad fueron asperjadas y se realizaron orificios para que hubiera buena ventilación. Tamaño de muestra, 15 hojas por bolsa.
3. Para fines de corroborar si *Orchesella bifasciata* B. también se encontraba en la hojarasca, se colectó (sólo las primeras dos veces), tomando hojarasca de debajo de las plantas donde se colectaron colémbolos de las hojas, y colocándola en bolsas de plástico a las cuales se les hicieron pequeños orificios al igual que se mantenían húmedas rociando agua estéril.

Todas las muestras fueron selladas perfectamente y trasladadas en hielera, al laboratorio.

4.4.4 Fase de Laboratorio

Los análisis fueron realizados en el laboratorio de micro y meso fauna del suelo, ubicado en el Departamento de Preparatoria Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo.

4.4.5 Preparación del material y medio de cultivo

Se utilizó medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) para la realización de las pruebas con medio de cultivo, preparado bajo las indicaciones del proveedor (39 g/ L) y se esterilizó el material así como el medio de cultivo en un autoclave a 121 °C a 1 atm de presión por 15 min.

4.4.6 Tratamiento a hojas

Sólo en los casos donde fue necesario, se almacenaron las hojas colectadas en refrigerador a una temperatura promedio de 3° C por no más de dos días. La

hojas fueron vistas con ayuda de un estereoscopio marca Zeiss, modelo Discovery. V8, para detectar el tejido enfermo que presentaba síntomas de presencia de hongos, una vez identificada la parte afectada se procedió a cortar en pequeños trozos.

Se desinfestaron los trozos de hoja afectados, por medio del siguiente procedimiento: Se lavaron con hipoclorito de sodio al 3 % por tres minutos, se dieron tres enjuagues con agua destilada estéril, se pusieron a secar en papel absorbente estéril dentro de una campana de flujo laminar. Posteriormente los trozos fueron colocados en Agar Papa Dextrosa, preparado bajo las indicaciones del proveedor (39 g/ L), en cajas Petri; las cajas fueron incubadas a 20 ± 1 °C por 10 días.

4.4.7 Tratamiento a hojarasca

Se utilizaron embudos con la técnica Berlese- Tullgren, basada en fototropismo negativo, que consiste en aplicar una fuente luminosa que provea calor mientras que el embudo contenía hojarasca, debajo un frasco con alcohol 96 ° por 24 horas. El calor provoca que cualquier organismo que se encuentre ahí, busque el fondo del embudo y caiga al alcohol.

4.4.8 Aislamiento de hongos

Después de la incubación se procedió a aislar cada uno de los hongos que mostraron características visuales distintas entre si, transfiriendo un trozo de micelio en cajas nuevas con PDA, se pusieron a incubar con las condiciones antes mencionadas y se repitió dos veces más el procedimiento anterior, para asegurar que se contaba con la cepa pura.

Una vez aislados, se realizaron preparaciones semipermanentes con glicerina y lactofenol, analizados a 10x, 40x y 100x en un microscopio Axiocam ERc 5c, modelo Lab A1, marca Zeiss, las estructuras fúngicas fueron fotografiadas utilizando el software Zen 2, de la misma compañía, y posteriormente

identificados a nivel de genero por medio de las claves para hongos imperfectos de Barnett y Hunter (1987).

4.4.9 Pruebas de preferencia

Se prepararon 56 cajas Petri con medio PDA que fungieron como receptoras de los bocados extraídos de las cajas con cada uno de los hongos aislados, se intercambiaron tres bocados a cada caja receptora, teniendo en cuenta dos tratamientos, 6 hongos y un testigo con 4 repeticiones para cada uno. Se incubaron por 48 horas a 21 ± 1 °C. Mientras tanto, los colémbolos colectados, aun con los trozos de hoja, fueron introducidos al congelador a una temperatura de -5 °C por media hora, para hacer más fácil su manipulación, haciéndolos más lentos, después fueron transferidos a recipientes con yeso húmedo previamente preparados, en donde se mantuvieron en ayuno durante 48 horas.

Una vez pasado el tiempo de incubación de los hongos sustituidos en PDA y el de ayuno de los colémbolos, se procedió a llevar a cabo las pruebas alimenticias las cuales consistieron, en nuevamente aletargar a los colémbolos a -5 °C durante media hora, y transfiriendo a cada caja con hongos sustituidos, 4 individuos, haciendo observaciones, cada hora y registrando, tomando en cuenta valores como se indica a continuación: 0= no se acercan a la zona donde está el hongo, 1= pasa por encima pero no permanecen, 2= Se queda en la zona donde está el hongo, aunque no por mucho tiempo y 3= Pasa la mayoría del tiempo en la zona donde se encuentra el hongo.

4.4.10 Tratamientos

Transcurrido el tiempo de observación, se aplicaron los siguientes tratamientos con cuatro repeticiones cada uno:

Tratamiento 1: Los colémbolos contenidos en las cajas, fueron puestos en un congelador a -5 °C durante 30 minutos, después de que se encontraban lentos por el frío, se procedió a transferirlos vivos a cajas con nuevo medio PDA, en el mismo orden en que se encontraban en las cajas con medio sustituido, se dejaron

por un día a temperatura ambiente, los colémbolos fueron extraídos y colocados en alcohol al 96 % para hacer preparaciones y las cajas fueron incubadas a 21 ± 1 °C por 5 días.

Tratamiento 2: Los colémbolos contenidos en las cajas, fueron transferidos a agua destilada estéril, con el fin de que pudiesen germinar las estructuras fúngicas presentes en el tracto digestivo, luego de esto, fueron puestos en alcohol al 70 %/ 1 min, posteriormente, en hipoclorito de sodio al 5%/ 1 min, y finalmente se les dieron dos lavados con agua destilada estéril por 30 segundos cada uno. Los colémbolos fueron secados con papel filtro estéril; después de esto, fueron tomados con una pinza de disección estéril y transferidos a cajas con nuevo medio PDA, aplastándolos, para así poder liberar el contenido intestinal, las cajas se sellaron con parafilm y se incubaron a 21 ± 1 °C por 5 días.

4.4.11 Colémbolos con *Hemileia vastatrix*

Se tomaron en bolsas de plástico transparentes estériles, hojas completas que en su superficie tuvieran presencia de algún colémbolo, tomando un total de 5 individuos por bolsa, por cuatro bolsas; con mucho cuidado fueron sacadas la hojas completas procurando dejar dentro de la bolsa los individuos, donde se mantuvieron en ayuno por un día, transcurrido el tiempo las bolsas fueron sometidas a -5 °C/ 45 min y de ahí transportadas en hielera lo más rápidamente posible nuevamente a la parcela, en donde se identificaron ramas con hojas con síntomas visibles por ataque de *Hemileia vastatrix* y evitando mover a los individuos que aún se encontraban lentos por el frío, se procedió a cuidadosamente amarrar la bolsa a la rama, quedando dentro la hoja con síntomas de roya, asegurándonos de que no quedara orificios en el nudo para que los colémbolos pudieran escapar, se dejaron ahí por 24 horas, y al otro día fueron colectados en alcohol, poniendo una pequeña cantidad dentro de la bolsa sin abrirla mucho, los colémbolos fueron transportados al laboratorio de micro y mesofauna, y analizados por medio de preparaciones en líquido Hoyer.

4.4.12 Montaje de colémbolos en líquido Hoyer

1. Los colémbolos que estaban en alcohol fueron colocados en un portaobjeto cóncavo con hidróxido de potasio (KOH) al 5 % / 1 min, con el fin de que se degradara la quitina del exoesqueleto, pero sin dañarlo y así poder tener una mejor visualización del tracto digestivo.
2. Se transfirieron a otro portaobjeto cóncavo con lactofenol, y con la ayuda de una pinza tomando el porta objeto se flameó por muy pocos segundos en un mechero evitando que el lactofenol se calentara mucho, para evitar destruir a los hexápodos, cuando fue visible el tracto digestivo, fueron puestos, con la ayuda de una espátula y una aguja de disección, en un portaobjetos con líquido Hoyer, se colocó un cubreobjetos, las preparaciones fueron colocadas en una estufa a una temperatura de 40 °C durante 5 días.

4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.1 Cultivos asociados a las plantas de café en las parcelas de Santiago Ecatlán

Un ecosistema es un sistema compuesto de procesos físico-químico-biológicos que se complementan entre sí y operan como parte de una unidad, tornándose dentro de un equilibrio dinámico y estableciendo una cantidad infinita de relaciones esenciales; durante el tiempo de colectas se observó que el café se encuentra asociado con diferentes especies, las cuales coinciden con las que menciona, Martínez *et al.*, (1995), que entre algunos otros beneficios intercambiables que realizan entre sí, le proporcionan sombra, algunas de ellas, como el árbol del chalahuite (*Inga vera*), sangregado (*Cecropia obtusifolia*), piñoncillo (*Jatropha curcas*), vainilla (*Vanilla platiforme*), jonote (*Heliocarpus donnell-smithii*), chiltepín (*Capsicum annum*, var. *Glabriusculum* L.), bambú (*Bambusoideae*), mango (*Mangifera indica*), mamey (*Pouteria sapota*), mandarina (*Citrus reticulata*), pimienta (*Pimenta dioica*), caoba (*Swietenia macrophylla*), xocoyol (*Begonia heracleifolia*), Ixquihit (*Renealmia alpinia*).

Se determinó que el clima en este lugar es cálido con tendencia a ser templado,

con régimen de lluvias en verano, poco oscilante y marcha anual de la temperatura tipo Ganges (doble irradiancia máxima), es decir, A (C) (w) i'g.

4.5.2 Análisis de área foliar afectada

De la colecta con el procedimiento de muestreo 5 oros se obtuvieron un total de 200 hojas por parcela.

Cuadro 1. Análisis de área foliar total y afectada

Parcela	Área total (cm ²)	Área afectada (cm ²)	Porcentaje área afectada
Monocultivo	9826.49	0*	0*
Convencional	9343.48	156.71b	1.67
Sin manejo	8770.28	278.26a	3.17
Orgánico	9755.36	44.22c	0.45

Tukey, valores con la misma letra no son significativamente diferentes, $\alpha=0.05$.

*El área fue despreciable por lo cual se prescindió del análisis

4.5.3 Colémbolos colectados

En las colectas se obtuvieron diferentes números de individuos; éstas se llevaron a cabo durante los meses de agosto y noviembre del año 2015, y febrero, julio y noviembre del año 2016.

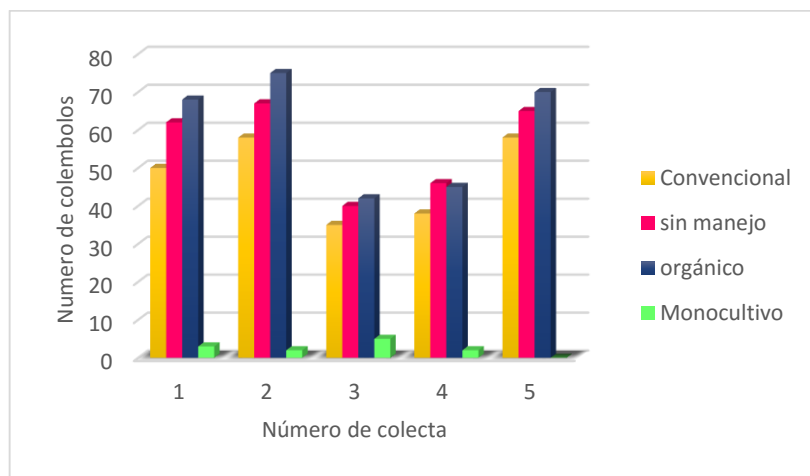


Figura 2. Colémbolos colectados durante 2015 y 2016.

Los colémbolos funcionan como indicadores biológicos, éstos, asociados a otros factores, reflejan las condiciones de un hábitat (Bettliol *et al.*, 2008), proporcionando información sobre una situación del medio y los cambios que esta comunidad sufre. En este sentido los resultados obtenidos confirman que las estrategias de manejo basadas en un alto uso de insumos químicos afectan la presencia de las familias del orden Colembola en la área foliar.

4.5.4 Identificación de *Orchesella bifasciata*

Por medio de características morfológicas visuales y después mediante el uso de claves taxonómicas para la Identificación de algunos géneros de Collembola más comunes presentes en México (modificada por Palacios, 1988), y con la ayuda de un microscopio Axiocam ERc 5c, modelo Lab A1, marca Zeiss, se identificó a *Orchesella bifasciata* B., la cual resultó ser la especie más abundante en las colectas realizadas.

La determinación taxonómica es: Reino: Animalia, Phylum: Arthropoda, Orden: Collembola, Familia: Entomobryidae, Género: Orchesella, Especie: *Orchesella bifasciata* Bourlet. La secuencia fue realizada por Santiago, (2014), obtenida mediante secuenciación del citocromo oxidasa de la subunidad , muestra que está registrada en las bases de datos del GenBank, con el número de acceso HG422626.2 la cual indicó una similitud en un 100 % con *Orchesella bifasciata*.

4.5.5 Hongos aislados y pruebas de preferencia

Utilizando un microscopio Axiocam ERc 5c, modelo Lab A1, marca Zeiss, fue posible identificar a los hongos, fotografiarlos con ayuda del software Zen 2.

Las estructuras de *Hemileia vastatrix* encontradas en las hoja infectadas, colectadas en la parcela sin manejo y convencional, no se lograron observar en el tracto digestivo de los individuos, sin embargo es muy probable que las haya consumido, ya que se visualizó el tracto digestivo lleno, y se habían mantenido por un día en ayuno, aunque, también cabe la posibilidad de que no fuera el

tiempo suficiente y se tratara de un hongo que ingirió antes de que fuera atrapado.

A pesar de que aún no existen reportes oficiales para la incidencia de algunos de los hongos aislados en café (Cuadro 1), como es el caso de *Pestalotia*, recientemente en estudios realizados en laboratorio, se ha encontrado alta incidencia de este (ANACAFE, 2016), reportado como patógeno de otros cultivos, como *Mangifera indica* y *G. augusta*, entre algunos otros, causando síntomas similares a los de antracnosis, con manchas pequeñas y abundantes, circulares sobre todo el limbo foliar, con el centro café claro, rodeado por áreas concéntricas de color café, que con el tiempo se necrosan; causando el decaimiento de la planta, notable pequeñez de las hojas, escasa y baja calidad de floración, se considera importante seguir indagando si quizá estos hongos han buscado nuevos hospederos o se trata de una acción derivada de la asociación con las otras plantas.

En el caso de las especies de *Alternaria*, la mayoría son saprofíticas, sin embargo, algunas especies han adquirido capacidades patogénicas en una gran variedad de cultivos, causando enfermedades en un amplio rango de huéspedes (Rotem, 1994) así como *Fusarium* spp, este hongo invade las raíces causando pudrición destruyéndolas progresivamente, provoca marchitamiento, clorosis y caída del follaje, el cafeto pierde su anclaje y el rendimiento baja hasta que finalmente la planta muere (ANACAFÉ, 2016).

Por otra parte algunos hongos del género *Gliocadium* están reportados como entomopatógenos (Castillo *et al.*, 2013), razón por la cual se podría explicar el bajo porcentaje de acercamiento y el alto de mortalidad durante la prueba.

Los colémbolos, pudieron consumir a los hongos gracias a que presentan un aparato bucal que les permite consumir las estructuras fúngicas (Wolter, 1963).

Las regiones jóvenes fueron las preferidas por los individuos de *O. bisasciata*, ya que según Leonard (1984) son las que contienen un nivel muy alto en N, por lo

cual podemos deducir que los colémbolos son capaces de hacer una selección de alimento, al encontrar una fuente rica de nutrientes, (Parkinson *et al.*, 1979).

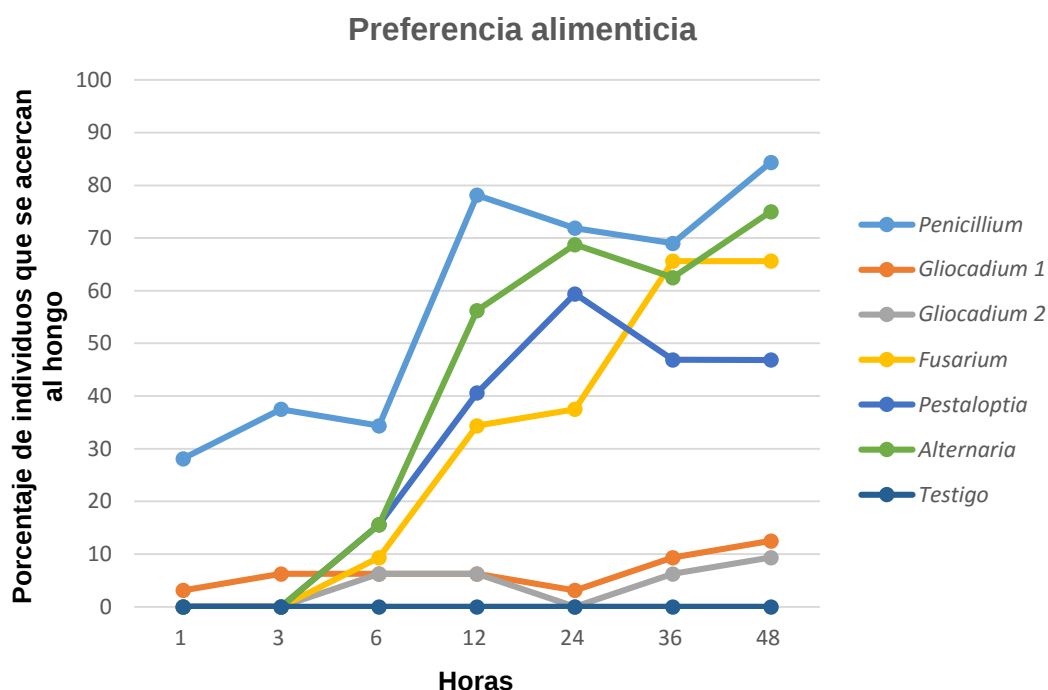


Figura 3. Preferencia alimenticia en cada una de las cepas.

Además de hongos saprófitos *O. bifasciata*, demostró en pruebas *in vitro* en este estudio, que también consume fitopatógenos (Cuadro 3) tal como lo mencionan Bardgett *et al.*, (1993); Hopkin, (1997); Rusek, (1998). Lo cual confirma que presenta una amplia preferencia alimenticia (Christiansen, 1964) y que la dieta de los colémbolos que habitan el follaje, es variable y consiste en su mayoría en esporas de hongos y levaduras e incluso Lartey *et al.*, (1989) menciona que cuando se presenta una mezcla de hongos fitopatógenos y simbióticos, los colémbolos prefieren a los patógenos.

La mayoría de las estructuras que se encontraron en el tracto digestivo, no germinaron. La viabilidad de las esporas es reducida considerablemente, cuando pasa por los fluidos intestinales, ya que estos pueden dañarlas, de modo tal que cuando son expulsadas en las heces fecales se encuentran inactivas (Moody *et al.*, 1996).

Cuadro 2. Porcentaje de germinación de esporas en los tratamientos.

Porcentaje de individuos con el tracto digestivo lleno	Cepa	T1	T2
		Porcentaje de germinación de esporas (%)	
0	<i>Testigo</i>	0	0
96.87	<i>Penicillium</i>	99	75
	<i>Gliocadium spp</i>		
25	1	50	0
	<i>Gliocadium spp</i>		
18.75	2	50	0
68.75	<i>Pestaloptia</i>	45	16
77	<i>Fusarium spp</i>	50	14
75	<i>Alternaria spp</i>	10	0

Estos resultados coinciden con lo reportado por Urbasek y Rusek (1994) quienes mencionan que cuando un hongo, ingresa en el tracto digestivo de un colémbolo, la mayoría de las estructuras fúngicas son dañadas careciendo de contenido citoplasmático. Las estructuras fúngicas son fragmentadas al ser expuestas a grandes concentraciones de enzimas como trehalasa, celulasas y quitinasas presentes en el intestino de los individuos (Siepel, 1996) (Berg *et al.*, 2004), según un estudio realizado por los mismo autores la enzima con mayor incidencia es la quitinasa, lo cual explica por qué los colémbolos son capaces de digerir las paredes celulares de hongos.

Sin embargo también existe, aunque más bajo, pero no despreciable, un bajo porcentaje de las cajas que mostraron germinación de esporas, esto puede deberse a que no todos los hongos tienen el mismo grosor en la pared celular y puede resultar más difícil degradar una pared más gruesa. Según lo reportado por Urbasek y Rusek, (1994), la germinación de algunos hongos del tracto digestivo se debe principalmente a que, no todo el alimento ingerido por *O. bifasciata* es degradado completamente, algunas pocas esporas, principalmente las más pequeñas pueden pasar intactas (Kilbertus *et al.*, 1981). Aunque, en

laboratorio tuvieron las condiciones óptimas para germinar que quizá no habrían encontrado en campo.

El porcentaje de mortalidad durante la prueba se debe a diferentes factores: la edad del individuo al ser colectado, y también el ayuno al que fueron sometidos los colémbolos, esto último porque quizá se vio obligado a comer del hongo ofrecido para intentar sobrevivir, ya que aquí solo se ofreció un hongo a la vez, en cambio en campo, tienen la posibilidad de elegir y alimentarse del hongo más conveniente para su desarrollo y reproducción (Bengtsson *et al.*, 1991).

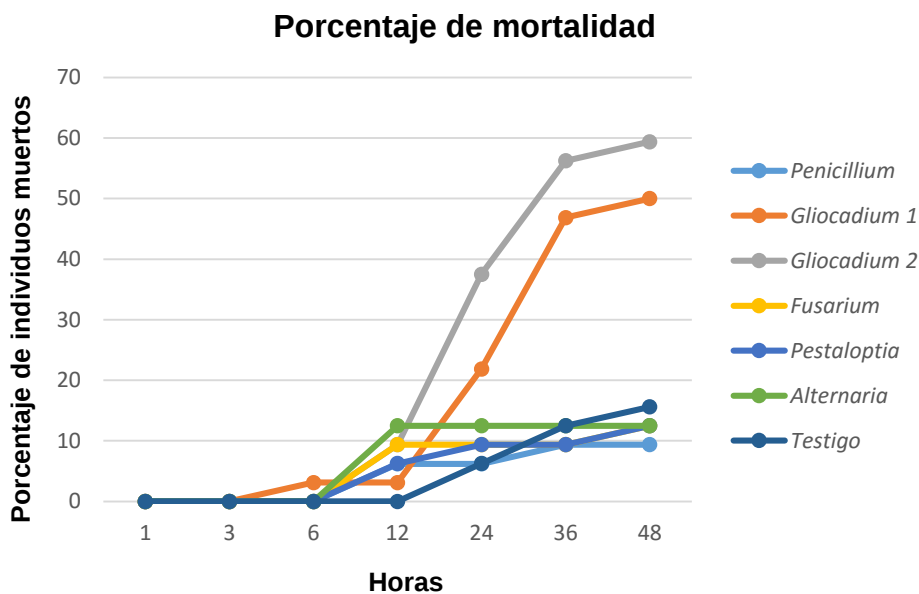


Figura 4. Mortalidad de individuos durante la prueba de preferencia

Gliocadium no fue consumido por *O. Bifasciata* sin embargo, este hongo termino por colonizar el exoesqueleto de los individuos en un tiempo menor a las 48 horas.

El rechazo de *O. bifasciata* al hongo ofrecido pudo deberse a la detección de metabolitos secundarios producidos por la cepa detectados por estímulos químicos emitidos por los individuos (Chapman y Boer, 1995).

La preferencia de ciertas estructuras fúngicas, tiene efectos directos, sobre la actividad y abundancia de las colonias (Hanlon y Anderson, 1979).

Con respecto al tratamiento dos, los individuos mostraron estructuras fúngicas en su exoesqueleto, sin embargo muy pocas de ellas fueron viables, ya que no son suficientes para propagar la enfermedad.

4. 6 CONCLUSIONES

1. *Orchesella Bifasciata* consume hongos presentes en parcelas de café, incluso es un predador de los hongos fitopatógenos; y destruye la mayoría de los propágulos fúngicos, al pasar por su intestino quedando inactivas; pudiendo así modular la presencia de las enfermedades causadas por estos.

2. Hay mayor presencia de colémbolos en agroecosistemas con un uso de agroquímicos bajo o nulo; debido a la conservación de la diversidad de especies aunada a prácticas de manejo ecológicas que permiten la presencia de enemigos naturales como lo son los colémbolos, contribuyendo a disminuir el problema de plagas, a través de promover los mecanismos de regulación biótica y la autorregulación del sistema.

Los resultados de esta investigación muestran, por un lado, la necesidad de seguir realizando estudios para incrementar los conocimientos sobre el comportamiento de los colémbolos en los agroecosistemas, ya que, promover su presencia en los agroecosistemas, podrían ayudar potencialmente a la reducción de plagas, y por el otro, la influencia de las prácticas de manejo y las condiciones microambientales sobre la presencia o ausencia de los mismos.

4.7 LITERATURA CITADA

- Altieri, M., A. (1992). Agroecological foundations of alternative agriculture in California. *Agriculture, cosystems and Environment* 39: 23-53.
- Altieri, M., A. (1998). Ecological impacts of industrial agriculture and the possibilities for truly sustainable farming. *Monthly Review* 50: 60-71
- ANACAFÉ (2016). Cafecultura y control de enfermedaes. Obtenido de: https://www.anacafe.org/glifos/index.php/Caficultura_ControlEnfermedades.

- Bardgett, R., D., Whittaker, J.B., & Frankland, J.C.(1993). The diet and food preferences of *Onychiurus procampatus* (Collembola) from upland grassland soils. *Biology and Fertility of Soils* 16, 296–298.
- Bengtsson, G., Erlandsson, A., & Rundgren, S. (1988). Fungal odor attracts soil Collembola. *Soil Biology & Biochemistry*, 20, 25–30.
- Berg, M., P., Mirjam, S., Harry, H., & Van den, H. (2004). Feeding guilds in Collembola based on digestive enzymes. *Pedobiologia*, 48, 589--601.
- Bettiol, W., Rivera, M., C., Mondino, P., Montealegre, J., R., & Colmenárez, Y., C. (2008). Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe ISBN: 978-9974-0-1091-8.
- Castillo, R., I., Gálvez, C., O., R., Torres, E., J., L., & Vázquez, M., M., G. (2013). Control de calidad en la producción del hongo *Gliocladium virens*, patógeno de *Anopheles albimanus* (Wiedemann 1820), vector del paludismo en México *Interciencia*, 38, 387-391.
- Chapman, R., F. & Boer, G. (1995). Regulatory Mechanisms in Insect Feeding. Chapman & Hall: New York. 398p.
- Christiansen, K. (1964). Bionomics of Collembola. *Entomology*, 9, 147-178.
- Giovannucci, D., & Juárez, C., R. (2006). Análisis prospectivo de política cafetalera: proyecto evaluación alianza para el campo. México. 2-8.
- Hanlon, R., D., G. & Anderson, J., M. (1979). Effects of collembola grazing on microbial activity in decomposing leaf litter. *Oecologia*, 38, 93-99.
- Hopkin S., P. (1997). Biology of the Springtails (Insecta: Collembola). Oxford University Press, 330p.
- Kilbertus, G., & Vannier, G. (1981). Relations microflore-microfaune dans la grotte de Sainte-Catherine (Pyrénées-sarriénoises). II. Le régime alimentaire de *Tomocerus minor* (Lubbock) et *Tomocerus problematicus* Cassagnau (Insectes Collembolés), *Ecology, Biology*, 319-338.
- Lartey, R., T., Curl, E., A., Peterson, C., M., & Harper, J. D. (1989). Mycophagous grazing and food preference of *Proistoma minuta* (Collembola: Isotomidae) and *Onychiurus encarpatus* (Collembola: Onychiuridae). *Environmental Entomology*, 18, 334--337.
- Lenoir, L., Persson, T., Bengtsson, J., Wallander, H., & Wiren, A. (2007). Bottomup or top-down control in forest soil microcosms? Effects of soil fauna on fungal biomass and C/N mineralization. *Biol. Fertil. Soils* 43: 228-294
- Leonard, M., A. (1984). Observations on the influence of culture conditions of the fungal feeding preferences of *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae). *Pedobiologia* 26, 361–367.
- Moody, S., A., Pearce, T., G., & Dighton, J. (1996). Effect of some fungal spores associated with wheat straw decomposition on passage through the guts of *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea longa*. *Soil Biology and*

Biochemistry, 28,533-537.

- Palacios, V., F., G. (1988). Claves para la identificación de algunos géneros de Colémbolos más comunes en México. Facultad de Ciencias. UNAM 10 p.
- Parkinson, D., Visser, A., & Whittaker, J. B. (1979). Effects of collembola grazing on fungal colonization of leaf litter. *Soil Biology & Biochemistry*, 11, 529--535.
- Pérez, P., J., R., & Díaz, C., S. (2000). El café, bebida que conquistó al mundo. México, Universidad Autónoma Chapingo. 151 p.
- Rotem, J. (1994). The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. St Paul, MN, USA: APS press. 326 p.
- Rusek, J. (1998). Biodiversity of Collembola and their functional role in the ecosystem. *Biodiversity and Conservation*. 7, 1207–1219.
- SAGARPA (2013). Protocolo para muestreo y evaluación de variables de daño, planta y manejo aplicados a la parcela centinela, 3-4.
- Santiago, E., E. (2014). Relaciones entre *Jatropha curcas* L., *Orchesella bifasciata* bourlet y hongos fitopatógenos. *Entomología Mexicana*, 2, 218-223.
- Sarandón, S., J. (2002). Agroecología: El camino hacia una agricultura sustentable. La Plata: Ediciones Científicas Americanas. 530-547.
- Siepel H. (1996). Biodiversity of soil microarthropods: the filtering of species. *Biodiversity and Conservation*, 5,251-260
- Urbasek, F. & Rusek, J. (1994). Activity of digestive enzymes in seven species of Collembola (Insecta: Entognatha). *Pedobiologia*, 38, 400--406.
- Wolter, H. (1963). Vergleichende Untersuchungen zur Anatomie und Funktionsmorphologie der stechendsaugenden Mundwerkzeuge der Collembolen. *Zool. Jahr. Anatom*, 81, 27–100.