



Universidad Autónoma Chapingo

“Enseñar la explotación de la tierra, no la del hombre”

Instituto de Horticultura



**Diversidad de endomicorrizas y hongos
filosféricos en cafetos infestados con roya
(*Hemileia vastatrix*)**

SONIA HERRERA MONROY

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

Chapingo, México, del 2020

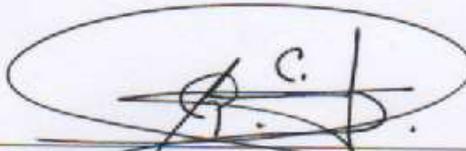


**DIVERSIDAD DE ENDOMICORRIZAS Y HONGOS FILOSFÉRICOS EN
CAFETOS INFESTADOS CON ROYA (*Hemileia vastatrix*).**

Tesis realizada por **SONIA HERRERA MONROY** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

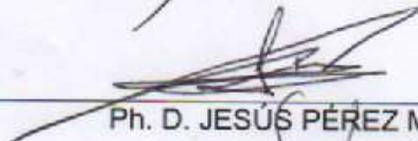
DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:



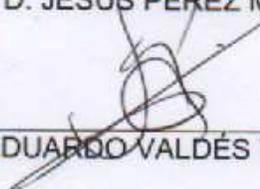
Dr. ROGELIO CASTRO BRINDIS

ASESOR:



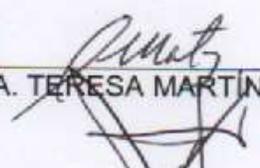
Ph. D. JESÚS PÉREZ MORENO

ASESOR:



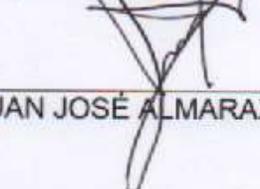
Dr. EDUARDO VALDÉS VELARDE

ASESORA:



Dra. MA. TERESA MARTÍNEZ DAMIÁN

LECTOR EXTERNO:



Dr. JUAN JOSÉ ALMARAZ SUÁREZ

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
INTRODUCCIÓN	1
I. Objetivo general.....	7
I.1 Objetivos particulares	7
CAPITULO I: ARGUMENTACIÓN TEÓRICA	8
1. Situación global de la producción de café.....	8
1.2 Problemática actual del cultivo de café en México	8
1.3. Descripción del principal agente patógeno del café: La roya (<i>Hemileia vastatrix</i>).....	10
1.3.1. Ciclo de vida de la roya de café	11
1.4. Estrategias y prácticas preventivas-correctivas	14
1.4.1. Selección de variedades resistentes y obtención de híbridos.	15
1.4.2 El uso de las relaciones Planta-microorganismos en el control de patógenos.....	17
CAPITULO II: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CONSORCIOS NATIVOS DE HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES.	30
2.1. MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.1.1. Ubicación y descripción del área de muestreo.....	31
2.1.2. Método de muestreo	32
2.2. Detección de estructuras micorrícicas	34
2.2.1 Extracción de esporas en el suelo.....	35
2.2.2 Identificación de esporas.....	35
2.2.3. Determinación de colonización y diversidad	36
2.2.4. Obtención de consorcios de hongos endomicorrícicos (multiplicación de consorcios)	38
2.2.5. Inoculación y aclimatación de consorcios micorrícicos arbusculares en semillas de café	39
2.3. RESULTADOS.....	40
2.3.1. Caracterización general de suelo.....	40
2.3.2. Inventario de especies de hongos micorrízicos por variedad de café	41

2.3.3. Colonización y diversidad de esporas.....	44
2.4. CONCLUSIONES.....	52
CAPITULO III: HONGOS FILOSFÉRICOS DE CAFÉ	53
3.1. MATERIALES Y MÉTODOS	55
3.1.1. Ubicación y descripción del área de muestreo.....	55
3.1.2. Método de muestreo	55
3.1.3. Aislamiento e Identificación de hongos filosféricos de plantas de café.....	55
3.1.4. Evaluación de la tasa de crecimiento	57
3.1.5. Pruebas de patogenicidad de hongos aislados.....	58
3.2. RESULTADOS.....	59
3.2.1. Identificación de hongos y su distribución en hojas de café	59
3.2.2. Tasa de crecimiento.....	72
3.2.3. Patogenicidad de hongos filosféricos de café	74
3.3. CONCLUSIONES.....	79
CAPITULO IV: INTERACCIÓN DE HONGOS ENDOMICORRIZICOS Y HONGOS FILOSFÉRICOS	80
4.1. MATERIALES Y MÉTODOS	81
4.1.1. Obtención de cafetos e inoculación con hongos endomicorrízicos	81
4.1.2. Inoculación con hongos filosféricos.....	83
4.1.3. Evaluación de la interacción hongo endomicorrízico/hongo filosférico	85
4.2. RESULTADOS.....	86
4.4. CONCLUSIONES.....	91
CONCUSIONES GENERALES	92
LITERATURA CITADA	93

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la roya del café (<i>Hemileia vastatrix</i>).....	11
Cuadro 2. Principales metabolitos secundarios producidos por bacterias filosféricas ...	19
Cuadro 3. Clasificación de los hongos micorrizicos arbusculares más estudiados (adaptado de Montaña et al., 2007).....	25
Cuadro 4. Características de los tipos de micorrizas más importantes.....	26
Cuadro 5. Especies de hongos endomicorrizicos arbusculares identificados en sistemas agrícolas y naturales en el estado de Veracruz y otros estados.	28
Cuadro 6. Identificación general de las parcelas muestreadas	31
Cuadro 7. Características físicas y de uso de suelos muestreados.....	40
Cuadro 8. Características químicas generales de los suelos muestreados	40
Cuadro 9. Contenido de elementos intercambiables en los suelos muestreados.	41
Cuadro 10. Géneros y especies de hongos micorrizicos arbusculares (HMA) aisladas en cuatro variedades de café cultivados en Ixhuatlán del café, Veracruz.....	42
Cuadro 11. Porcentaje de colonización transformado, en raíces de café en distintas variedades	44
Cuadro 12. Densidad y Diversidad de esporas en plantas de café variedad Typica.....	45
Cuadro 13. Número absoluto de esporas, índice de frecuencia (% IF), abundancia relativa (% RA) e índice de valor (%IV) de especies endomicorrícas presentes en huerta de café variedad Typica	47
Cuadro 14. Géneros de hongos presentes en hojas de café (<i>C. arabica</i> L.) variedad Typica con y sin signos de infección por roya (<i>H. vastatrix</i>).	60
Cuadro 15. Hongos aislados de hojas de café (<i>C. arabica</i> L.) variedad Typica.	61
Cuadro 16. Identidad y porcentaje de similitud según la base de datos del GenBank (2019) de algunos hogos filosféricos aislados de café (<i>C. arabica</i> L. var. Typica) e identificados con los marcadores ITS-1 e ITS-2.....	71
Cuadro 17. Tratamientos evaluados para hongos micorrizicos arbusculares.....	83
Cuadro 18. Descripción de tratamientos evaluados.....	85
Cuadro 19. Porcentaje de colonización y densidad de esporas antes y después de la inoculación con hongos filosféricos.	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura morfológica de <i>H. vastatrix</i> . A) Uredosporas, B) Uredia sobre hoja de café.....	11
Figura 2. Factores que afectan el ciclo de vida de <i>Hemileia vastatrix</i> (líneas continuas representan el ciclo y las punteadas los factores). Tomado de Avelino y Rivas (2013). .	13
Figura 3. Ubicación del área de estudio	32
Figura 4. Ilustración de cafeto sin síntomas de infección (A) y con síntomas severos de infección de roya (<i>H. vastatrix</i>) (B).	33
Figura 5. Dirección, profundidad y distancias radiales para la toma de submuestras.	33
Figura 6. Algunas especies de HMA identificados en cafetos veracruzanos.....	43
Figura 7. Estructura diferencial de raíces micorrizadas.....	46
Figura 8. Especies de hongos micorrízicos y su frecuencia de aparición (%) en arquetipos de cafetos variedad Typica.....	50
Figura 9. Dendrograma de análisis jerárquico de clusters basado en la similitud de frecuencias entre los géneros de hongos endomicorrízicos identificados en plantas de café var. Typica con síntomas de infección por roya (SAN) y sin síntomas (ENF).	51
Figura 10. Tasa de crecimiento de hongo filosféricos endófitos aislados de café (<i>C. arabica</i> L.) Var. Typica.....	72
Figura 11. Tasa de crecimiento de hongo filosféricos epífitos aislados de café (<i>C. arabica</i> L.) Var. Typica.	73
Figura 12. Prueba de patogenicidad en hojas de café (<i>C. arabica</i> L. var. Typica), inoculadas con diferentes especies endófitas de <i>Colletotrichum</i>	74
Figura 13. Prueba de patogenicidad en hojas de café (<i>C. arabica</i> L. var. Typica), inoculadas con diferentes especies epífitas de <i>Colletotrichum</i>	75
Figura 14. Prueba de patogenicidad en hojas de café (<i>C. arabica</i> L. var. Typica) inoculadas con diferentes especies de <i>Fusarium</i> aislados de la superficie (epífitos) y dentro de hojas (endófitos).....	76
Figura 15. Severidad observada en hojas de café (<i>C. arabica</i> L.) variedad Typica, al inocular hongos epífitos por dos métodos	77
Figura 16. Severidad observada en hojas de café (<i>C. arabica</i> L.) variedad Typica, al inocular hongos endófitos por dos métodos.....	78
Figura 17. Prueba de patogenicidad en hojas de café (<i>C. arabica</i> L. var. Typica) inoculadas con diferentes especies hongos aislados de la superficie (epífitos) y dentro de hojas (endófitos).....	78

Figura 18. Estructuras de hongos endomicorrízicos obtenidas en el primer muestreo de cafetos con cuatro hojas verdaderas (dos cruces), antes de inocular con hongos filosféricos.87

Figura 19. Tratamientos y unidades SPAD de cafetos inoculados con dos consorcios de hongos endomicorrízicos y 14 hongos filosféricos.89

Figura 20. Biomasa acumulada durante 30 días por cafetos inoculados con dos consorcios de hongos endomicorrízicos y 14 hongos filosféricos.90

DEDICATORIA

A mi amado Juan Manuel quien cada día me devuelve un poco de la seguridad que las experiencias me arrancan y me reta a ser una mejor persona.

A mis padres Rosalba y Arturo, las lecciones que su ejemplo me brinda son desconcertantes, únicas.

A mis hermanas Lili y Mariana, la distancia y el pasado nos separan pero la sangre y el amor nos unen para siempre.



AGRADECIMIENTOS

A los mexicanos (as) que pagan impuestos, quienes, a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), financiaron mis estudios de Doctorado.

A la Universidad Autónoma Chapingo, con mención especial al Instituto de Horticultura por brindarme una oportunidad de desarrollo profesional.

Al Laboratorio de Ecología, al Biólogo José Cutberto Vázquez Rodríguez, a la C. Ana Lilia Meráz Meráz por el apoyo y consejos técnicos que hicieron posible la culminación de este proyecto.

Al departamento de Parasitología Agrícola, con mención especial al Laboratorio de Micología Agrícola, por el espacio facilitado y el tiempo dedicado a mi formación profesional.

A la comunidad Zacamitla, Ixhuatlán del Café, Veracruz, especialmente a la asociación CICADES y Ocozaca, quienes a través del Ing. Mauro Chicuellar y el Ing. Nicolás Terrien me brindaron facilidades para la recolección de muestras experimentales.

Al Dr. Rogelio Castro Brindis por sus aportaciones académicas y apoyo durante el desarrollo de esta investigación

Al Dr. Jesús Pérez Moreno por sus consejos de vida y por el profundo conocimiento compartido.

Al resto del consejo particular evaluador por el tiempo dedicado a colaborar en esta investigación.



DATOS BIOGRÁFICOS

La autora es Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia por la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) y Maestra en Ciencias en Edafología por el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, además de Licenciado en Pedagogía por la Universidad Valle de Anáhuac (CUVA). Como parte de su formación doctoral curso las materias de Hongos Fitopatógenos, Bacterias y Ecología de microorganismos en los programas de Fitopatología y Edafología del Colegio de Postgraduados (COLPOS). Se ha desempeñado como docente en instituciones públicas y privadas. Sus líneas de investigación son nutrición vegetal, hongos fitopatógenos y benéficos.

DIVERSIDAD DE ENDOMICORRIZAS Y HONGOS FILOSFÉRICOS EN CAFETOS INFESTADOS CON ROYA (*Hemileia vastatrix*)

Diversity of endomycorrhiza and phyllospheric fungi in coffee trees infested with rust (*Hemileia vastatrix*)

¹Sonia Herrera Monroy, Rogelio Castro Brindis²

RESUMEN GENERAL

El café es un cultivo que permite la integración de cadenas productivas, además contribuye a la preservación de flora y fauna endémica gracias a su modo de cultivo. La problemática con la roya anaranjada (*H. vastatrix* Berkeley & Broome) en México inició en el año 2000 donde se registró un declive del 70 % en la producción de café verde debido a la falta de prácticas de control. Actualmente las prácticas más efectivas consisten en renovación de huertas y aplicación de productos preventivos, por ello en este trabajo se aborda la problemática general del café mexicano además de las principales alternativas que han mostrado resultados en el control de roya. También se presenta el inventario diferencial entre microorganismos fúngicos rizosféricos y filosféricos de cafetos infestados con roya y sin infección visible. Finalmente se exponen los resultados obtenidos al inocular artificialmente consorcios endomicorrízicos y hongos filosféricos en el desarrollo de cafetos criollos (*Coffea arabica* Variedad Tyica).

Palabras clave: Rizosfera, filosfera, endomicorizas, café criollo.

GENERAL ABSTRACT

Coffee is a crop that allows the integration of productive chains, it also contributes to the preservation of endemic flora and fauna thanks to its cultivation mode. The problem with orange rust (*H. vastatrix* Berkeley & Broome) in México began in 2000 where there was a 70% decline in green coffee production due to the lack of control practices. Currently, the most effective practices consist of renovating orchards and applying preventive products, for that reason this work addresses the general problem of mexican coffee in addition to the main alternatives that have shown results in rust control. The differential inventory between rhizospheric and phyllospheric fungal microorganisms of coffee trees infested with rust and without visible infection is also presented. Finally, the results obtained by artificially inoculating endomycorrhiza consortia and phyllospheric fungi in the development of creole coffee trees (*Coffea arabica* Variety Tyica) are exposed.

Key words: *Rhizosphere, phyllosphere, endomycorrhizal, creole coffee.*

Tesis de Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo

¹Autor

² Director de Tesis

INTRODUCCIÓN

El café es el producto más comercializado después del petróleo y es la bebida no alcohólica de mayor consumo en el mundo, después del agua. Se estima un consumo de 1, 600, 000 tazas diarias, siendo los varones quienes beben aproximadamente el 78 % del café producido. Éste se distribuye en el mercado en cuatro principales clasificaciones: arabicas suaves tipo colombiano (predominantes en Colombia, Kenya y Tanzania), otros arabicas suaves (con mayor representación en México, Perú, Venezuela, Haití, República Dominicana, Cuba, Jamaica, Ecuador, Ruanda, Burundi, Malawi, Papúa-Nueva Guinea, Zambia, Zimbawe y la India), cafés brasileños (consumidos y comercializados mayormente por Brasil, Bolivia, Paraguay y Etiopía) y Robustas (predominantes en África, Indonesia, Vietnam, Filipinas, Sri Lanka y Tailandia) (Renard-Hubert, 2016).

El consumo de café en México es de aproximadamente de 1.8 millones de sacos al año, mientras que el per cápita es de 1.3 Kg al año. Nuestro país es el onceavo productor mundial de café con 1.6 % de la producción global (824.08 miles de toneladas) y el doceavo lugar a nivel internacional como exportador (FAOSTAT, 2018). El “aromático” se cultiva en 12 estados, pero Chiapas es el principal productor con 39 % del volumen nacional, seguido de Veracruz con el 30 % y Oaxaca con el 13 %. Otros importantes estados productores de café son Puebla, Guerrero, Hidalgo, Nayarit, San Luis Potosí, Colima, Jalisco, Tabasco y Querétaro (CEDRSSA, 2018).

En México el cultivo de café (*Coffea* spp.) es considerado como una actividad agrícola estratégica fundamental puesto que permite la integración de cadenas productivas, genera empleos temporales y es el modo de subsistencia de pequeños productores así como de aproximadamente 30 grupos indígenas (CEDRSSA, 2018). Desde el sexenio pasado, la importancia del cultivo de café en México pasó de ser únicamente económica a tomar relevancia ecológica pues provee servicios ambientales a la sociedad ya que el 90 % de la superficie establecida con este cultivo se encuentra bajo sombra diversificada, lo cual implica una contribución en la preservación de la biodiversidad vegetal, animal así como de micro flora y fauna, además la permanente cubierta vegetal permite la captura de gases de efecto invernadero, la reposición de nutrimentos en suelo y de agua en mantos acuíferos (Hruska, 2015).

La problemática con la roya anaranjada (*Hemileia vastarix* Berkeley & Broome) en México inicia en el año 2000, sin embargo fue hasta el año 2012 cuando se registró un declive del 70 % en la producción de café verde o lo que equivale a pasar de un ingreso de \$ 8 647 580 349.05 en el año 2012 a \$ 4 523 893.44 para el 2016, según datos del SIAP-SAGARPA, 2016. Ésta pérdida en rendimiento y posteriormente en valor monetario fue causada por intensificación de infestaciones de cafetales del estado de Chiapas y posteriormente de Veracruz debido a la susceptibilidad de la variedad del cultivo establecida en ese momento (*Coffea arabica* L.), la edad de las plantaciones (mayor de 10 años) y los periodos atípicos de temporal acontecidos en el periodo 2000-2002 (Hernández-Martínez y Velázquez-Premio, 2016; FIRA, 2015).

Debido a esta severa crisis junto con el desplome de exportaciones, así como el aumento de importaciones, en 2016 la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) dio a conocer la reactivación del Instituto Mexicano del Café (INMECAFÉ) para apoyar al Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Ambas instituciones actualmente tienen la tarea de incentivar la producción del aromático por medio del mejoramiento de programas que permitan monitorear y prevenir plagas, brindar apoyos para renovación de huertos y capacitar a los productores en la aplicación de pesticidas y fertilizantes (CEDRSSA, 2018). Sin embargo, el plan estratégico del INMECAFÉ no contempla la regulación de precios ni interviene en la comercialización del grano, a pesar de ello pretende aumentar la calidad y productividad a través de programas de capacitación (CEDRRSA, 2019).

Uno de estos programas impulsados por el INMECAFÉ-IICA está contenido en el Plan Integral de Atención al Café (PIAC), donde en el año 2018 se establecieron metas de producción en el sector cafetalero de 4.5 millones de sacos (60 kg c/u) para la cosecha 2018-2019 la cual deberá mantenerse para lograr una cosecha sostenible de 15 millones de sacos para el año 2030 (CEDRSSA, 2019).

Las estrategias propuestas por el PIAC plantean el cumplimiento de cuatro objetivos principales: 1) Fortalecimiento de la cadena productiva y desarrollo de viveros certificados donde se distribuya planta de variedades mejoradas, con pureza genética y alta demanda en el mercado, 2) implementar el modelo de gestión de asistencia técnica especializada

y transferencia de tecnología, 3) impulsar las campañas sanitarias en coordinación con SENASICA para prevenir y controlar plagas y enfermedades del café. En este objetivo también se plantean programas de renovación de plantaciones y mantenimiento de cafetales (podas, control de malezas, entre otras), 4) facilitar el acceso a crédito y capitalización de pequeños productores, sincronizando la estrategia con los incentivos de SADER y la promoción de la producción sostenible de café mexicano, en este punto se plantea fomentar además la certificación de predios cafetaleros como orgánicos, amigables con las aves, comercio justo, entre otros, así como la dotación de infraestructura y equipamiento para el manejo poscosecha (CEDRSSA, 2019).

El seguimiento y ejecución de las estrategias del PIAC han permitido el desarrollo e integración de algunas prácticas en los estados productores de café en México para aminorar las pérdidas provocadas por la infestación de roya anaranjada (*H. vastatrix*), para ejemplificar algunas de las prácticas adoptadas actualmente en cafetos del estado de Chiapas y Veracruz se listan las siguientes:

- a) Cambio de la especie *arabica* por híbridos tolerantes y resistentes a roya o que no requieren sombra, como por ejemplo el “Híbrido de Timor” (obtenido de la cruce natura de *C. arabica* X *C. robusta*) y los Catimores (obtenido de cruces de *C. caturra* X Híbrido Timor), entre los que destacan Costa Rica 95, Colombia y Oro Azteca, esta última liberada por el INIFAP (Hernández-Martínez y Velázquez-Premio, 2016). El principal problema de esta práctica es que las variedades establecidas ya se encuentran en desuso y no se ha avanzado en el mejoramiento genético del café mexicano en las últimas décadas (Carvalho *et al.*, 2011), además la calidad en taza de los híbridos es inferior a la obtenida de granos de café criollo (*C. arabica*) (Renard-Hubert, 2016).
- b) Establecimiento de variedades altamente productivas y con calidad media en taza como por ejemplo la variedad Geisha (CICADES y Fundación Malongo, 2016).
- c) Eliminación de exceso de sombra y siembra de plantas y/o variedades de café con tolerancia al patógeno a modo de barrera viva que protegen variedades de porte alto (especie *arabica*) o parcelas intercaladas.

- d) Aplicación de mezclas anti fúngicas preventivas como caldo bordelés, caldo sulfocálcico, oxiclورو de cobre y caldo visosa (a base de cobre, zinc, magnesio, boro, urea y cal) este último ha resultado el más efectivo pues además de prevenir la infección, también aporta nutrimentos, sin embargo la aplicación de estas mezclas está restringida en la agricultura orgánica y únicamente es eficaz cuando la roya no se ha presentado de forma intensa en las parcelas.
- e) Aplicación de fungicidas sistémicos, los cuales solo detienen la infección pero no evitan la caída de follaje del cafeto enfermo y no garantiza el rendimiento de la planta tratada, por lo que no se les considera efectivos (CICADES y Fundación Malongo, 2016; Hernández-Martínez y Velázquez-Premio, 2016).
- f) Manejo de fertilización nitrogenada. Esta debe ser aplicada en los meses cálidos lluviosos para fomentar la renovación de hojas y permitir la mejor asimilación del nutrimento (N), además la aplicación durante esta época permitirá al cafeto madurar lo suficiente y después, cuando la temperatura descienda pero la humedad permanezca, resistirá mejor los ataques de roya (CICADES y Fundación Malongo, 2016).
- g) Podas, saneamiento y renovación de huerta. Se recomienda cambiar el cafeto por plantas jóvenes cada cinco u ocho años (según la intensidad de la explotación), eliminar material de poda y residuos de cosecha para evitar reservorios de plagas y enfermedades dentro del huerto.
- h) Control biológico. Algunos ejemplos de la aplicación de una o más especies de microorganismos para el biocontrol en el cultivo de café, son el uso de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del cafeto (Montilla *et. al.*, 2016), la inoculación con *Lecanicillum lecanii* y *Pseudomonas* sp. (Rivera *et. al.*, 2013; Silva, Tozzi, Terrasan, & Bettiol, 2012) para la supresión de roya, inoculación con hongos endomicorrizicos para la tolerancia a nematodos y mejorar condiciones edáficas

así como para mejorar la nutrición de plantas y hacerlas menos susceptibles a enfermedades y plagas (Andrade, Mazzafera, Schiavinato, & Silveira, 2009).

Este último punto es el más acogido por los productores de café orgánico y los de pequeña escala, quienes también son los mayormente afectados, pues la producción bajo el régimen de *agricultura orgánica* restringe el uso de pesticidas químicos para la prevención o control de patógenos y la segunda tiende a favorecer el cultivo de cafetos no híbridos y bajo sombra diversificada, ambas formas de producción, a pesar de sus rendimientos bajos, requieren de una menor cantidad de insumos (por lo que también se le considera de “baja tecnología”), pero alberga inoculo de la enfermedad y requiere mayor prevención.

Numerosas investigaciones se han desarrollado en el campo del control biológico de plagas y enfermedades del cafeto, observándose en los últimos años a la roya anaranjada y la infestación de nematodos como puntos focales de dichos trabajos. Los logros más notables radican en los mecanismos y efectos de la interacción entre planta- micorriza (s) o planta- microorganismo (s) filosférico (s), que aumentan la resistencia contra patógenos específicos, generando un cambio positivo en la morfología del hospedante, así como incrementos en la producción de biomasa.

Por ejemplo, la inoculación con hongos endomicorrízicos como *Glomus clarum* y *Acaulospora mellea* establecidos durante el semillero o en plantas obtenidas *in vitro*, han mostrado tener buenos resultados en la aclimatación y establecimiento de plántulas en el huerto, pues se reporta un incremento del 50 % en la biomasa de plántulas de café (*Coffea arabica* L.) obtenidas *in vitro* y trasplantadas a suelo deficiente en fósforo, comparadas con las que no fueron inoculadas (Vaast *et al.*, 1997).

A pesar de los buenos resultados obtenidos en esta investigación, los productores tradicionales de café carecen de la tecnología y el recurso económico necesario para obtener planta de café *in vitro* e inocularlas con las cepas recomendadas, sin embargo, si es posible la inoculación con otras cepas que confieren a la planta resistencia al ataque de patógenos edáficos; por ejemplo, en otra investigación realizada en el año 2003 por Trejo-Aguilar, se llevó a cabo el aislamiento de siete consorcios micorrícicos en agroecosistemas forestales del estado de Veracruz y se evaluó el desarrollo de plantas

inoculadas así como su interacción con nemátodos causantes de corchosis en campo e invernadero. Los resultados fueron una mejor respuesta de desarrollo en plantas inoculadas que se establecieron en campo y aunque el volumen aéreo en estas fue menor, mantuvieron apariencia vigorosa y buen desarrollo.

También se han realizado estudios en el aislamiento y selección de microorganismos antagónicos a *H. vastatrix*, donde se ha encontrado que *Lecanicillium lecanii* (Jackson *et al.*, 2012), *Brevibacullius megaterium* (Silva, Tozzi, Terrasan, & Bettiol, 2012), *Bacillus* spp, *Penicillium* spp., *Aspergillus* sp., *Acremonium* sp. y *Cladosporium* sp. (Haddad, Saraiva, Mizubuti, Romeiro, & Maffia, 2014) reducen la severidad del ataque de roya en cafetos cuando se aplican 24 o 72 horas después de la inoculación con el patógeno.

Como puede apreciarse, son variados los estudios donde se prueba la eficacia de la búsqueda, aislamiento e inoculación de microorganismos, tanto rizosféricos como filosféricos, para el control de roya y nemátodos en café, sin embargo las investigaciones donde se prueben las interacciones establecidas por ambos tipos de microorganismos son escasas, además tampoco se considera el efecto de la inoculación con microorganismos sobre la diversidad y desarrollo de organismos benéficos y patógenos, que podrían mantener sano a un cultivo o tener el efecto contrario.

Por esta razón en el presente documento se aborda una revisión bibliográfica que pretende familiarizar al lector con los conocimientos básicos sobre la interacción Planta-Hongo micorrízico- Hongo filosférico que genera salud a plantas, posteriormente se describe el estudio de diversidad de microorganismos en variedades de café, sanos e infectados con roya. Finalmente se presenta la descripción de la selección de microorganismos supresores de roya y el establecimiento de bioensayos para corroborar su efectividad bajo condiciones de laboratorio y a nivel invernadero.

Es importante mencionar que las plantas muestreadas para la realización de la fase experimental, se obtuvieron de fincas de café con manejo tradicional, en el municipio de Ixhutlán del Café, Veracruz.

Se tiene la hipótesis de que la asociación cafeto-hongo micorrízico (HM)-hongo filosférico (HF) cambia cuando la planta es infectada con roya (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome), brindando un desempeño agronómico diferencial, según los organismos que

participen en las asociaciones. Debido a esta hipótesis se plantean los objetivos presentados a continuación.

I. Objetivo general

Caracterizar morfológicamente los consorcios de HM y las poblaciones ecológicas de HF presentes en cafetos de variedad Typica, infestados con roya anaranjada (*H. vastatrix*) así como en plantas visiblemente sanas. Además de seleccionar, inocular y evaluar el desarrollo de los microorganismos asilados en plantas de cafeto.

I.1 Objetivos particulares

- Caracterizar consorcios nativos de HM, así como HF en cafetos provenientes del municipio de Ixhuatlán del Café, Veracruz.
- Seleccionar HF reportados por investigaciones anteriores como potenciales antagonistas de roya (*Hemileia vastatrix*).
- Establecer bioensayos para evaluar la capacidad de crecimiento y reinfección de los HF seleccionados y multiplicados bajo condiciones axénicas, así como su interacción con hongos endomicorrizicos inoculados en plantas de café.

CAPITULO I: ARGUMENTACIÓN TEÓRICA

1. Situación global de la producción de café

El café es uno de los productos agrícolas más importantes en el mundo, ya que más de 56 países se dedican a su cultivo y es el principal commodity agrícola (Talbot, 2011) desde las negociaciones llevadas a cabo por los principales países productores y consumidores en el periodo 1962-1989 (Renard-Hubert, 2016).

En 2007 existían en promedio 25 millones de productores de café distribuidos en el continente Americano, Asiático y Africano, siendo el continente Americano donde desde entonces se genera el mayor volumen de café de la especie *arabica* (Felipe-Felipe, 2007).

Los países con mayor volumen de producción de este cultivo son Brasil con 35 % del total de la producción mundial, seguido por Vietnam con 19.3 %, Colombia (8.5 %), Indonesia (6 %), Honduras (4.8 %), Etiopía (4.4 %), India (3.7 %), Uganda (2.7 %) Perú (1.7 %), México y otros (12.3 %) (Organización internacional del café, 2019). México ocupa el lugar número nueve con 1.6 % de la producción global (equivalente a 3 385 552 sacos de café verde) (SAGARPA, 2017).

La superficie total cultivada con café en nuestro país es de 737 000 ha distribuida en 15 estados (FND, 2014), los principales productores son Chiapas, Veracruz y Oaxaca (SAGARPA, 2017), donde la producción decreció un 20 % en el periodo 2014-2016 debido a factores climáticos y a la infestación de roya (*H. vastatrix*) (Almudena, 2016), logrando recuperarse para el siguiente periodo gracias a la implementación de prácticas preventivas (CEDRSSA, 2018).

1.2 Problemática actual del cultivo de café en México

La principal especie de café producida en México es la *arabica* (también conocida como Criolla o Typica) cuyas características organolépticas le han conferido calidad de taza mundialmente reconocida, puesto que posee grandes matices de sabor, suaves notas perfumadas con toques dulces y ligeramente ácidas, así como menor contenido de cafeína; sin embargo, debido a la susceptibilidad de esta especie a patógenos como la roya (*Hemileia vastatrix*, Raza II) y nemátodos (*Meloidogyne* spp. y *Pratylenchus* spp.), durante el periodo del año 2012 y hasta el 2016 la producción disminuyó 25 %

(CEDRSSA, 2018) y de acuerdo con un estudio proyectivo realizado en Nicaragua, El Salvador, Guatemala y México, para el año 2050 las fincas cafetaleras de los países mencionados pueden perder entre el 20 y 81% de su producción actual, dependiendo de las estrategias preventivas y correctivas que apliquen contra el cambio climático y sus efectos derivados (ASIC, 2012, citado por Rivera *et al.*, 2013).

Los problemas a los que se enfrentan los cafeticultores orgánicos y los de pequeña escala en el estado de Veracruz, es el aumento de 0.1-1.5 °C en la temperatura, ocasionado por el cambio climático que ha desencadenado un decremento cíclico en la producción de café, así como mayor incidencia y severidad de roya. Según Arneson (2017) las pérdidas en rendimiento de café causadas por la roya son cíclicas y pueden variar hasta 10 veces de una temporada a la siguiente, esto ocurre porque la severidad del ataque está en función de condiciones ambientales (temperatura de 15 a 28 °C y humedad continua por 24 a 48 horas), así como de la susceptibilidad de la planta. Ambas variables se relacionan directamente con el estado nutricional, de esta manera una planta que produjo una gran cantidad de frutos en un ciclo, estará nutricionalmente “gastada” en el ciclo siguiente y por lo tanto será más susceptible al ataque por roya.

A causa de estos problemas los cafeticultores están teniendo dificultades para satisfacer la demanda nacional e internacional de café crudo o procesado, un ejemplo de las consecuencias de esto es el decremento de 75 % en los precios de los contratos a futuro presentados en el año 2011 (Infocafe.es, 2011), que desde entonces ha propiciado un cambio de cultivos y en el peor de los casos, en el uso de suelo, pues ya que no se tiene certidumbre de la cantidad de café que será cosechado de un ciclo a otro, los contratos agrícolas se pactan con menores tonelajes de café, además los agricultores no desean arriesgar su patrimonio por lo que prefieren cambiar de cultivo o bien reducir el espacio dedicado al café.

Ambos problemas pueden ser mitigados si se aplican tecnologías que permitan incrementar la eficiencia para el aprovechamiento de agua y nutrientes por los cafetos e incrementar su resistencia a plagas y enfermedades. Ejemplo de estas prácticas es la inoculación con microorganismos benéficos, tanto filosféricos como rizozféricos, pues se ha encontrado que la inoculación con estos por separado mejoran el aprovechamiento

de nutrientes y agua (Hodge y Fitter, 2010), además dan protección contra patógenos (Gianinazzi-Pearson, 1996).

En años recientes se han caracterizado microorganismos rizosféricos, como los hongos micorrízicos (HM), y filosféricos como *Bacillus* spp., *Lecanicillium lecanii*, cuya compatibilidad con cafetos y su efecto benéfico ha sido comprobada al inocular unos u otros (Rivera *et al.*, 2013; Silva, Tozzi, Terrasan, & Bettioli, 2012), sin embargo, los protocolos para una efectiva inoculación e interacción entre ellos cuando se inoculan a la par no se encuentran reportados, pero existe evidencia de que una mayor diversidad de organismos en un ambiente genera interacciones benéficas que evitan o disminuyen la patogenicidad de algunos microorganismos, tal como lo ejemplifica Arneson (2000):

Se ha demostrado que aquellas huertas de café que se establecen junto con una diversidad de especies sombra, entre las que se tienen árboles fijadores de nitrógeno, leñosas y otras especies de distinto porte, benefician el desarrollo de microorganismos que mantienen la salud del huerto, reducen la necesidad de fertilización nitrogenada, retardan la caída de lluvia evitando que se den las condiciones para la infección de roya pero además se propicia mejor hábitat para aves, mamíferos, reptiles, insectos, entre otros, que tienen un impacto ambiental que va mucho más allá de las propias fincas de café.

Por esta razón se cree que un incremento en la diversidad de poblaciones ecológicas de microorganismos, inducido por inoculación con HM y HF, generara efectos benéficos en el desarrollo de las plantas de café así como la supresión de patógenos que han aquejado la cafecultura en México y cuyo protagonista en las últimas décadas ha sido la roya anaranjada.

1.3. Descripción del principal agente patógeno del café: La roya (*Hemileia vastatrix*).

Esta enfermedad se originó en el continente asiático siendo reportada por primera vez en cafetos de Sri Lanka (antes Isla de Ceilán) en el año 1896, en ese mismo año, un especialista británico de nombre Miles Joseph Berkely la describió y llamó *Hemileia vastatrix* (Virgilio-Filho y Astorga-Domian, 2015). Años después la roya del café llegó a América, la hipótesis más aceptada es que fue dispersada desde el continente africano

por los vientos alisios (Bodwen *et al.*, 1971), generando el primer reporte en Estado de Bahía, Brasil en el año 1970 y para 1981 en México (Virgilio-Filho y Astorga-Domian, 2015).

Desde la llegada de la roya del café al continente americano, se han implementado planes para evitar grandes pérdidas económicas, sin embargo entre los años 2012 y 2013 los bajos precios del café en el mercado internacional, así como la edad de las plantaciones en ese periodo (25 años aproximadamente) contribuyeron al desarrollo de enfermedad. Promecafé-IIICA (2013) indicaron que la pérdida en el sector cafetalero en Centroamérica de ese periodo (2012-2013), fue estimado en más de 19 % de la producción; o sea, unos 3.5 millones de sacos de café de 60 kg (USD 499 millones).

1.3.1. Ciclo de vida de la roya de café

Esta enfermedad es causada por un hongo de la clase de los *Pucciniomycetes* y tal como su nombre científico lo indica, pertenece al género *Hemileia*, que se caracteriza por tener uredosporas reniformes, lisas ventralmente y ornamentaciones equinuladas en el resto de su superficie (Figura 1). La clasificación taxonómica completa se presenta en el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

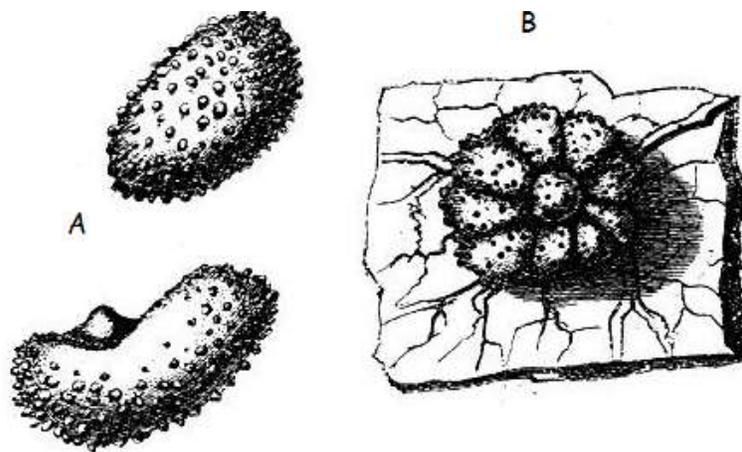


Figura 1. Estructura morfológica de *H. vastatrix*. A) Uredosporas, B) Uredia sobre hoja de café.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la roya del café (*Hemileia vastatrix*)

Dominio: Eukaryota
Reyno: Fungi
Sub-reyno: Dikarya
Phylum: *Basidiomycota*
Sub-phylum: Pucciniomycotina
Clase: *Pucciniomycetes*
Orden: *Pucciniales*
Género: *Hemileia*
Especie: *vastatrix*

Fuente: Bensch, 2016.

El *Hemileia vastatrix* es un parasito obligado; es decir que se alimenta mediante micelio que penetra y ramifica dentro de las células vivas de hojas de café, además no se ha documentado que el hongo sobreviva en el suelo o tejido vegetal muerto (Haddad, Saraiva, Mizubuti, Romeiro, & Maffia, 2014).

Las estructuras reproductivas y dispersivas del hongo son las uredosporas del ciclo sexual que puede albergar un proceso de meiosis “escondida” o criptosexualidad (Carvalho *et al.*, 2011). El ciclo de vida de la roya del café inicia con la liberación de esporas y su deposición en las hojas (principalmente en las basales), posteriormente la espora germina presentándose los primeros síntomas y signos en las plantas, es decir, manchas de color amarillo pálido que eventualmente se tornaran anaranjadas y cafés en el envés de las hojas (SAGARPA, 2013).

Cuando las condiciones ambientales se vuelven frescas (18- 15 ° C) y secas, aparecen teliosporas, las cuales mediante un proceso de cariogamia y meiosis germinan en basidiosporas haploides, estas pueden aislarse y germinar bajo condiciones *in vitro*, pero son incapaces de infectar hojas de café y aún se desconoce si existe alguna especie de planta que funcione como hospedante alternativo. Por esta razón existe la teoría de que las basidiosporas son restos de una roya macrociclica ancestral (Arneson, 2000); sin embargo, algunos autores afirman que no se necesita de un hospedero alternativo, es decir, *H. vastatrix* puede sobrevivir y reproducirse muy bien únicamente por uredosporas (Arneson, 2000; Carvalho *et al.*, 2011).

El ciclo de *Hemileia vastatrix* (de germinación de la espora hasta la aparición de nuevas esporas maduras) se completa en aproximadamente 25-30 días, si las condiciones de humedad y temperatura son favorables (Virgilio-Filho y Astorga-Domian, 2015). Para la germinación de las esporas se requiere de la presencia de agua libre por al menos

durante seis horas, temperaturas entre 21-23 °C (Haddad, Saraiva, Mizubuti, Romeiro, & Maffia, 2014). Las condiciones óptimas para la formación del apresorio (modificación de las hifas para la infección de una célula epidérmica del huésped) son oscuridad y humedad, ambas mantenidas de cinco a ocho horas, pues se ha documentado que la evapotranspiración diurna afecta el crecimiento de tubos germinativos y el proceso de germinación se detiene (SAGARPA, 2013; Avelino y Rivas, 2013).

Luego de germinar, el hongo penetra en las hojas a través de los estomas y desarrolla haustorios (estructuras que permiten la alimentación del hongo), después de 30 días se desarrollaran uredias que posteriormente producirán nuevas uredosporas (Virgilio-Filho y Astorga-Domian, 2015). Todas las condiciones descritas en párrafos anteriores se presentan en los meses de noviembre a diciembre en la región cafetalera del estado de Veracruz y en la Figura 2, tomada de Avelino y Rivas (2013), se ilustra los factores que afectan el ciclo de vida de *Hemileia vastatrix*.

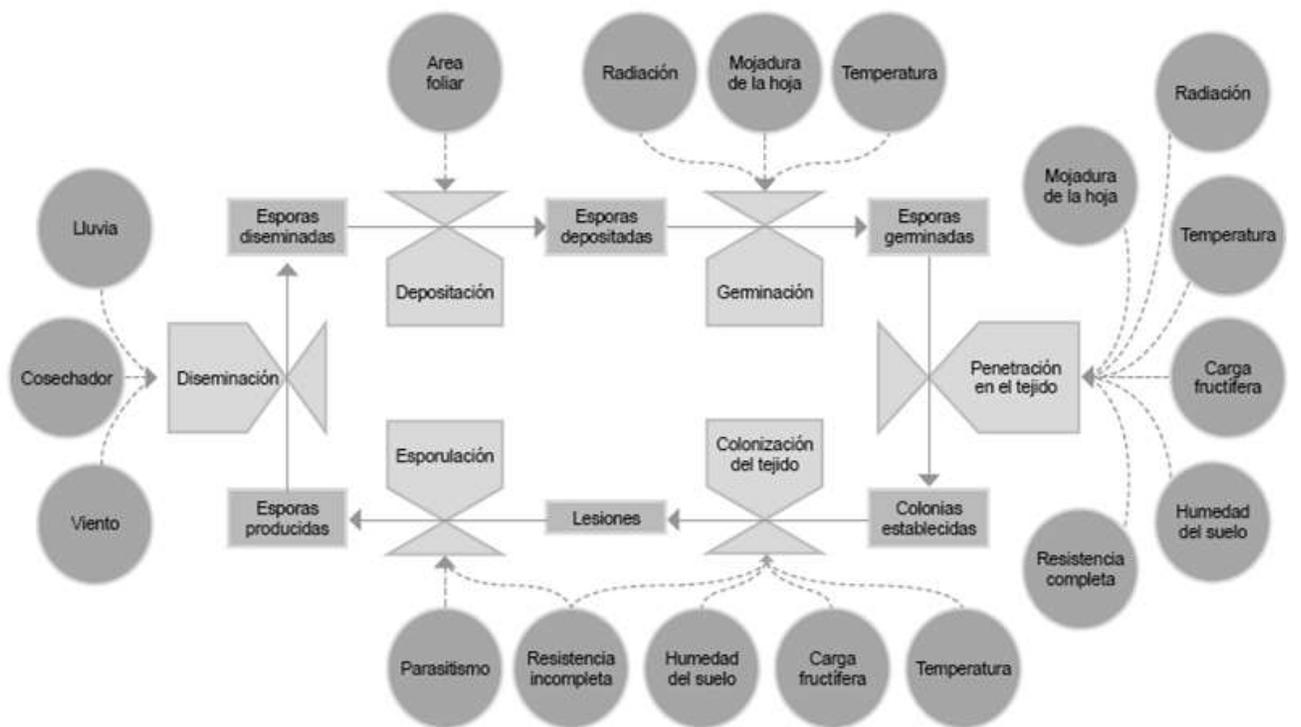


Figura 2. Factores que afectan el ciclo de vida de *Hemileia vastatrix* (líneas continuas representan el ciclo y las punteadas los factores). Tomado de Avelino y Rivas (2013).

La especie de café más susceptible al ataque de este patógeno es *arabica*, donde la variedad Typica o Criolla era comúnmente cultivada en las regiones montañosas de Veracruz por las características organolépticas del grano, sin embargo ha sido reemplazada por variedades resistentes (como catimor), sacrificando la calidad de café en taza. Para evitar esto y prevenir el ataque de roya, se han desarrollado estrategias como el mejoramiento genético a partir de cruces del cual derivan variedades como Timor (obtenida de la cruce de *C. arabica* y *C. canephora*), otra estrategia es la selección de variedades que muestran tolerancia al patógeno y calidad de grano en taza, como por ejemplo la variedad Geisha (Anzueto, 2013). También se han desarrollado variedades que no requieren sombra (como *Coffea liberica*), además se han implementado prácticas como la reducción de sombreo, aplicaciones de fungicidas correctivos y preventivos, fertilizaciones planeadas e inoculación con microorganismos promotores de la absorción de nutrimentos (biofertilizantes) y del crecimiento de raíz (bioestimuladores) o antagonicos a la roya (biocontroladores), que han permitido la conservación de plantas de la variedad Typica. A continuación, se presenta una revisión detallada de algunas de las prácticas y estrategias para la conservación de esta variedad.

1.4. Estrategias y prácticas preventivas-correctivas

Después de la crisis cafetalera del año 2012, se comenzó a poner atención en las prácticas agrícolas que hasta ese momento habían permanecido sin actualización. Las modificaciones más relevantes que se implementaron en las huertas de café fueron la inoculación de microorganismos para biocontrol / biofertilización, renovación de planta cada cinco u ocho años, la poda de formación y saneamiento, la recolección-eliminación de cerezas y otras estructuras producto de la poda para evitar reservorios de enfermedades y plagas como la broca (*Hypothenemus hampei*), así como la adopción de variedades híbridas o selecciones resistentes a factores bióticos y abióticos desfavorables.

Con estas prácticas se logró reducir el impacto de las principales plagas y de algunas enfermedades, no así su erradicación, por lo que SAGARPA, a través del Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) puso en marcha

el Programa de Vigilancia Epidemiológico Fitosanitario del Cafeto a fin de dar seguimiento al avance en el combate a las principales plagas y enfermedades, cuya prioridad de monitoreo es la roya en los estados de Veracruz, Puebla, Chiapas y Oaxaca, pues además de que estos estados son los principales estados cafeticultores, también son los que posicionan a México como segundo mayor productor de café orgánico en el mundo, solo después de Perú (FIRA, 2015; CEDRSSA, 2019).

Actualmente la opción más eficaz para librar los efectos negativos de la roya del cafeto es la conversión de huertos orgánicos a convencionales con opción de certificación de producción sustentable por el sello *Rainforest Alliance*³ y la sustitución de variedades susceptibles (como la Typica o la Bourbon) por híbridos competitivos u otras especies resistentes que requiere menos insumos agrícolas y poco o nulo sombreado; sin embargo la calidad de taza de estas variedades es mucho menor y además comprometen la diversidad ecológica de las regiones cafetaleras donde se implantan.

1.4.1. Selección de variedades resistentes y obtención de híbridos.

El café pertenece a la familia de la rubiáceas, la cual engloba más de 500 géneros y más de 6 000 especies (Jiménez, 2014), de las cuales dos son las más cultivadas en todo el mundo; la *Coffea arabica* L. y la *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, esta última también conocida como café robusta.

La especie *arabica* a diferencia de otras, es de autopolinización, tetraploide y cuenta con 44 cromosomas, además tiene dos variantes principales en América, la Typica y la Bourbon que son mundialmente preferidas por sus particularidades en taza. Ambas son susceptibles a enfermedades fungosas y a infestación por nemátodos. Debido a sus características, el mejoramiento genético de estas variedades se ha enfocado en obtener plantas competitivas en cuanto a rendimiento y con características fenotípicas que les permitan resistir condiciones ambientales como vientos fuertes, ataques de patógenos y

³ Rainforest Alliance es un programa de certificación que se rige bajo el esquema de la Norma de Agricultura Sustentable, con énfasis en la conservación de la biodiversidad, desarrollo comunitario, derechos de los trabajadores y prácticas de producción agrícola sustentable.

adaptables a distintos rangos de altura, pero conservando las características organolépticas del grano y disminuyendo la cantidad de cafeína de las variedades tradicionales (Moreno-Ruíz, 2002; García-González, 2011; Rojo-Jiménez, 2014).

El mejoramiento de café inicio en la década de los 70 's empleando técnicas como la polinización controlada y la selección-multiplicación de semilla, actualmente se siguen utilizando estos métodos junto con otros como la propagación clonal por métodos tradicionales (injertos y esquejes) o por micropropagación y embriogénesis somática (Georget *et al.*, 2017; Burgos-Araya, 2018).

A partir del mejoramiento genético se han obtenido híbridos como L13A44, L12A28, L04AB4 (García-González, 2011), que se caracterizan por provenir de padres de la especie *arabica* genéticamente distintos y por ser reproducidos únicamente por micropropagación, así como variedades locales de Etiópe o "Raza Etiópe", desarrollados en los cafetales de Etiopia mediante domesticación, y variedades de introgresión como el Catimor y el Sarchimor que poseen características genéticas de otras especies distintas a la *arabica*. En el caso de Catimor posee características de *C. canephora* y para el caso de los Sarchimor con características de Robusta, Timor, Caturra y Villa Sarchí (World Coffe Research, 2016).

La obtención e implementación de variedades de café resistentes a roya ha sido preferida por un gran número de cafecultores cuyo interés es la cantidad de café y no así la calidad, lo cual es comprensible ante el panorama de elegir entre subsistir produciendo cualquier tipo de café o perecer aferrándose a una variedad tradicional y susceptible. Sin embargo, existe una minoría que se ha inclinado por otras prácticas, que si bien implican una mayor carga de trabajo, les permiten continuar cultivando variedades de alta calidad en taza que son bien redituados en el mercado, pero susceptibles a la roya y otros patógenos.

Algunas de estas prácticas son poda, fertilización consiente (aquella que es hecha apoyada en un análisis anual de suelo, considerando las necesidades nutrimentales de la huerta), prevención mediante la aplicación de pesticidas en dosis y periodos adecuados (antes de que el patógeno se presente) y finalmente, uso de alternativas bilógicas como la inoculación con microorganismos benéficos. Esta última práctica ha

ganado más seguidores debido a que el café orgánico permite su uso y este es mejor pagado que el tradicional. A continuación se mencionan algunos detalles relevantes sobre el uso de microorganismos benéficos.

1.4.2 El uso de las relaciones Planta-microorganismos en el control de patógenos

Los microorganismos y las plantas son los dos tipos de organismos vivientes más abundantes del planeta Tierra (Mujtaba-Babar *et al.*, 2016), además que también se distribuyen y proliferan en ambientes donde los animales son incapaces de sobrevivir. Este privilegio ha sido posible gracias a las interacciones desarrolladas a través del tiempo entre ellos, aunque estas no siempre sean positivas, ambos organismos han desarrollado y perfeccionado mecanismos para mantener su homeostasis bajo condiciones de patogenicidad o ambientales desfavorables.

Entre los mecanismos desarrollados se encuentran las interacciones simbióticas mutualistas donde las plantas brindan nutrientes, protección física y condiciones adecuadas para la proliferación de microorganismos, quienes a su vez, secretan agentes específicos o metabolitos secundarios que impiden el desarrollo de otros invasores/competidores (a este proceso se le llama antibiosis). Es importante mencionar que estas interacciones requieren de una fuerte, eficiente y continúa comunicación trans-celular, así como un control inter-organismo de moléculas que aseguren la coordinación de señales para detectar, regular y “afectar” un proceso en función de un estímulo específico.

Las relaciones mutualistas y también las parasíticas (cuando solo uno de los participantes de la interacción se beneficia) se dan tanto en la rizosfera como en la filosfera y se han estudiado para generar biotecnologías de biofertilización, biocontrol, antibiosis y resistencia sistémica, todos ellos tales que permitan la supresión o control de patógenos, pero siempre cuidando que dichas biotecnologías puedan ser manipulables y seguras para incrementar la rentabilidad agrícola. Algunos ejemplos de la aplicación de microorganismos benéficos para el biocontrol de patógenos en cultivo de café son: el uso de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del cafeto (Montilla *et. al.*, 2016), la inoculación con *Lecanicillum lecanii* y *Pseudomonas* sp. (Rivera *et. al.*, 2013; Silva, Tozzi,

Terrasan, & Bettiol, 2012) para la supresión de roya, inoculación con hongos micorrízicos arbusculares para la tolerancia a nematodos y condiciones edáficas desfavorables (Andrade *et al.*, 2009).

Debido a que las interacciones que se llevan a cabo en la rizosfera y en la filosfera son distintas (pues los microorganismos de cada bioma poseen particularidades), es necesario abordar cada uno por separado pero sin perder de vista que ambos interactúan a la par en una planta.

1.4.2.1. Generalidades de microorganismos filosféricos

El concepto *Filosfera* se acuñó en 1950 y hace referencia al bioma compuesto por hojas y otros tejidos superficiales (los localizados encima del suelo) que sostienen diversas poblaciones de microorganismos (Leveau, 2015). Dichos microorganismos interactúan en este ecosistema mediante relaciones tróficas que son de interés en el proceso de producción agrícola. En esta investigación se abordarán las relaciones ecológicas de organismos endófitos y epífitos que dan protección a plantas frente a ataques de organismos patógenos en la superficie de los tejidos, además es preciso mencionar que aun cuando los microorganismos incluyen a bacterias, hongos filamentosos, levaduras, oomycetes, algas, líquenes, protistas y protozoarios, únicamente se describirán las generalidades de hongos filamentosos y bacterias.

Las bacterias son los microorganismos más abundantes en la superficie foliar de las plantas, seguidos por los hongos filamentosos, ambos poseen características evolutivas que les permiten mantener su homeostasis en el ambiente cambiante de la superficie de una hoja, por ejemplo son capaces de acumular solutos para resistir la escasa humedad que se presenta comúnmente en el follaje a lo largo del día (Leveau, 2015). Los mecanismos desarrollados por estos organismos no se reducen a su protección como colonias o individuos, sino que también son empleados para defender a su hospedante. De esta manera es conveniente describir los mecanismos de acción de los organismos filosféricos más usados en la agricultura.

1.4.2.2. Bacterias como biopesticidas

El principal mecanismo de esta relación asociativa es la antibiosis que comúnmente se ilustra con el biocontrol ejercido sobre bacterias patógenas por el antibiótico agrocin producido por *Agrobacterium*, o bien, por el efecto tóxico que posee el 2,4-diacetilphloroglucinol (DAPG) sobre bacterias y hongos, este compuesto es producido por *Pseudomonas* (este género junto con *Bacillus* son los más usados en biocontrol de bacterias y hongos por su facilidad de reproducción así como efectividad). En general las bacterias producen metabolitos secundarios (Cuadro 2) que inhiben o reducen el crecimiento e infección, además matan y repelen a otros organismos patógenos (Mujtaba-Babar *et al.*, 2016).

Cuadro 2. Principales metabolitos secundarios producidos por bacterias filamentosas

Metabolito	Efecto
Amonio	Bactericida y fungicida
Butirolactones	Fungicida
Kanosamina	Fungicida
HCN	Bactericida y fungicida
Oligomicina	Fungicida
2,4-diacetilphloroglucinol	Fungicida
Viscosinamida	Bactericida y fungicida
Zwittermicin	Bactericida y fungicida

Fuente: Mujtaba-Babar *et al.*, 2016

1.4.2.3. Organismos fúngicos como biopesticidas

Los organismos fúngicos incluyen 65,000 hongos verdaderos (*Eumycota*), 16,000 asexuales (también conocidos como mitospóricos o anamorfos), 889 organismos pertenecientes al grupo SAR (*Stramenophiles*, *Alveolata* y *Rhizaria*) y *Chromista*, así como 960 *Protozoa* y *Amoebozoa*. En total se ha estimado que existen 2.5 millones de organismos fúngicos, de los cuales solo se ha identificado el 7 % y de estos 8,000 son patógenos (Kirk *et al.*, 2008); es decir, aproximadamente 8,000 especies generan

enfermedad en sus hospedantes por que se alimentan de ellos o bien porque sintetizan compuestos tóxicos que enferman a su hospedante.

Esta propiedad ha sido aprovechada en la agricultura para la supresión de otros patógenos como insectos, bacterias, nemátodos y otros hongos; por ejemplo, se ha empleado *Bauveria basiana* para el control de coleópteros, *Trichoderma* sp. para suprimir el crecimiento de *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Phityum*, *Phytophthora*, entre otros (Harman, 2005; Dominguesa *et al.*, 2000), también se tiene registro de *Lecanicillium lecanii*, un organismo entomopatógeno y micoparásito que se ha empleado para el control de *H. vastatrix* (Jackson, Skillman, & Vandermeer, 2012), al igual que *Penicillium* spp., *Aspergillus* sp. (Haddad, Saraiva, Mizubuti, Romeiro, & Maffia, 2014). La ventaja del uso de estos organismos es que únicamente se requiere brindar condiciones de humedad y temperaturas adecuadas para que desarrollen su ciclo de vida, además a diferencia de las bacterias, no es necesario alimentarlos para que sobrevivan y sean efectivos (Mishra *et al.*, 2015).

1.4.2.4 Generalidades de microorganismos Rizosféricos

El termino *Rizosfera* fue propuesto por Lorenzo Hilter, quien lo definió como “el compartimento del suelo influenciado por las raíces de las plantas”, de este modo, la rizosfera es una capa del suelo de apenas unos milímetros de espesor, que posee gran variedad y cantidad de microorganismos (es de 10-100 veces más rico en microorganismos que el resto de los estratos), en ella se lleva a cabo la liberación del 6-21 % del carbono fijado y secretado por las raíces, además es el lugar del suelo donde ocurre la mayor parte de ciclos de nutrimentos así como interacciones tróficas (Lugtenberg, 2015).

La extensión y naturaleza de la rizosfera se ve influenciada por agentes abióticos como pH, temperatura, tipo de suelo, humedad, concentración de nutrimentos, entre otros, y bióticos donde la interacción hongo micorrízico-planta tiene particular importancia, pues permite a las raíces mayor área de exploración en busca de nutrientes, brinda tolerancia ante algunos agentes abióticos y genera interacciones con otros microorganismos, transformado a la rizosfera en *mico-rizosfera* (Lugtenberg, 2015). Los beneficios

proporcionados al suelo por la *mico-rizosfera*, así como la interacción entre planta-microorganismos han sido aprovechados por el hombre en la obtención de alimentos, regeneración o remediación de suelos contaminados con metales, explotación forestal, producción de ornamentales y adaptación de cultivos a ambientes con condiciones edáficas y climáticas desfavorables.

El ejemplo más conocido de la aplicación biotecnológica de esta interacción es la inoculación de microorganismos rizosféricos (tanto hongos como bacterias) promotores de crecimiento radical, así como de absorción de nutrimentos (fósforo y nitrógeno principalmente). Esta última práctica es considerada como biofertilización, pues se compara el efecto en las plantas inoculadas con la fertilización; es decir, las plantas que establecen asociaciones con organismos fungosos o bacterianos benéficos presentan mayor crecimiento y desarrollo que aquellas que no lo hacen, tal como sucede cuando una planta es fertilizada.

Específicamente en el cultivo de café, la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares ha mostrado tener mayor aceptación entre los productores pues la colonización de estos hongos induce un cambio relativamente rápido y evidente en el microambiente de las raíces, de tal forma que se modifica el nicho ecológico de los patógenos que pueden atacar a la planta hospedera. Además, la colonización favorece la lignificación de las raíces incrementando su volumen y resistencia, así como la activación de mecanismos de defensa del huésped (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007). Guzmán y Ferrera-Cerrato (1990) mencionan que este comportamiento es debido a que la simbiosis establecida propicia un incremento de la absorción de carácter físico y esto tiene como consecuencia mayor capacidad de las raíces para absorber fósforo así como otros iones poco móviles.

En los siguientes apartados se presenta una revisión sobre hongos micorrícicos arbusculares cuya finalidad es ambientar al lector sobre los pormenores de estos organismos y su forma de interactuar con las plantas en general.

1.4.2.5. Los Hongos micorrícicos arbusculares (HMA)

Se define como *micorriza* a la relación mutualista y trófica establecida entre hongos y plantas inferiores clorofíticas y aclorofíticas (como la araucaria albina). Los hongos micorrícicos establecen relaciones con raíces y otros órganos vegetales como rizomas, en el caso de plantas inferiores (orquídeas por ejemplo) que carecen de raíz (Honrubia, 2009).

Estos organismos aparecieron en el mundo hace 462-353 millones de años y comenzaron a emplearse junto con cultivos nitrificantes por los Romanos en el año 300 a. de C., pero fue hasta el año 1881 que el patólogo forestal Albert Bernard Frank acuñó el término *micorriza* a partir del vocablo griego *myco*, que significa hongo y del latín *rhiza*, que quiere decir raíz (Felix, 2007). Para 1900, el botánico francés Bernard resaltó su importancia al estudiarlas en orquídeas (Camargo-Ricalde *et al.*, 2012).

Existen diferentes tipos de micorrizas en función de las especies fúngicas y vegetales que establecen la asociación y en función de su estrategia nutricional, por lo que se tiene dos grandes grupos de micorrizas (Smith y Read, 2008):

- a) Las que forman manto fúngico: referidas a aquellas que no tienen la posibilidad de penetrar las células corticales de la raíz y por ende forman una *capa* en la superficie de las raíces jóvenes donde se anclan. Teniendo esto en consideración, las estructuras de diagnóstico para este tipo de micorrizas son el manto fúngico o red de Hartig y el micelio externo vegetativo que emerge a partir de las raíces (Pérez-Moreno y Red, 2004). Dentro de este grupo encontramos a las ectomicorrizas, ectendomicorriza, micorriza arbutoide y micorriza monotropoide (Camargo- Ricalde *et al.*, 2012; Smith y Read, 2008).
- b) Las que no forman manto fúngico: Esta son capaces de penetrar en las células corticales de las raíces por lo que no se observa la formación de mantos fúngicos, en este grupo encontramos a las micorrizas arbusculares, micorriza ericoide y orquideoide (Camargo-Ricalde *et al.*, 2012).

Los hongos micorrícicos arbusculares son los objetos de estudio de esta investigación puesto que son las más ampliamente adaptadas con 150 especies identificadas (Bolaños *et al.*, 2000), se distribuyen principalmente en lugares con suelos arenosos, clima cálido

seco, cálido húmedo, y templado frío (Smith y Read, 1998, citados por Camargo-Ricalde *et al.*, 2012). En México los hongos micorrízicos están presentes en todos los ecosistemas, pero son más abundantes en regiones boscosas o cultivos perennes.

A pesar de las diferentes clasificaciones y de su amplia distribución, todos los hongos micorrízicos establecen asociaciones con las raíces vegetales donde se observa una interface de contacto entre hifas y células vegetales, es en esta región donde se lleva a cabo el intercambio de nutrientes (Honrubia, 2009) y se da una protección contra patógenos edáficos (Camarena-Gutiérrez, 2012). Debido a la asociación mutualista que se establece, las especies vegetales que forman asociaciones con hongos micorrízicos presentan una fisiología y una ecología diferentes de aquéllas que no forman esta asociación, siendo el mayor desarrollo radical un punto clave para la supervivencia de una gran diversidad de especies vegetales en ecosistemas variados (Van der Heijden, 2002).

Los hongos que forman micorriza arbuscular, se ubican en el filum *Glomeromycota*, subfilum *Glomeromycotina* y la clase *Glomeromycetes*. Hasta 2008 comprendía cuatro órdenes, 11 familias y 25 géneros con alrededor de 240 especies (Rosendahl, 2008); sin embargo para 2010 Arthur Schüßler y Christopher Walker realizaron una reclasificación de las especies, apoyándose en la filogenia molecular combinada con una evidencia morfológica, por lo que hasta 2017 se considera aun cuatro órdenes (*Glomerales*, *Diversisporales*, *Paraglomerales* y *Archaeosporales*), 11 familias (*Glomeraceae*, *Claroideoglomeraceae*, *Gigasporaceae*, *Acaulosparaceae*, *Entrophosporaceae*, *Pacisporaceae*, *Diversispraceae*, *Paraglomeraceae*, *Geosiphonaceae*, *Ambisporaceae* y *Archaeosporaceae*) y 25 géneros definidos más 9 que comprenden especies con clasificaciones inciertas (Schüßler y Walker, 2010). En el Cuadro 3 se presenta la clasificación de los géneros más estudiados, según Montaña *et al.* (2007).

Como se puede observar los *Glomerales* es uno de los grupos más estudiado. Estos se caracterizan por tener esporas asexuales grandes e hifas cenocíticas distribuidas en el suelo, además se desconoce la diversidad genética de estas estructuras pues son multinucleadas (Smith y Read, 2008). Su clasificación se apoya en herramientas moleculares y en la morfología de las esporas, además los principales criterios para la

delimitación de especies son estructura de la pared, tamaño, forma, color, ornamentación de la hifa de sostén y de su oclusión. Para identificar adecuadamente a estos hongos es necesario su propagación en condiciones controladas, pues las esporas recolectadas directamente de campo pueden estar dañadas por parásitos y tener un aspecto físico variable (Varela y Trejo, 2001), en el Cuadro 4 se presentan las principales características morfológicas de los tipos de micorrizas más importantes.

Cuadro 3. Clasificación de los hongos micorrízicos arbusculares más estudiados (adaptado de Montaña et al., 2007).

Orden	Suborden	Familia	Géneros	Suborden actual	Familia Actual	Género actual	
Glomerales	<i>Glomineae</i>	<i>Glomeraceae</i>	<i>Glomus</i>	<i>Glomerales</i>	<i>Glomeraceae</i>	<i>Glomus</i> <i>Rhizoglomus</i> <i>Rhizophagus</i>	
		<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Sclerocystis</i>	<i>Paraglomerales</i>	<i>Paraglomeraceae</i>	<i>Paraglomus</i>	
			<i>Acaulospora</i> <i>Entrophospora</i>		<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Acaulospora</i>	
	Sin información	<i>Paraglomaceae</i>	<i>Paraglomus</i>	<i>Diversisporales</i>	<i>Diversisporaceae</i>	<i>Diversispora</i>	
			<i>Gigaspora</i>		<i>Entrophosporaceae</i>	<i>Entrophosporaceae</i>	
	<i>Gigasporineae</i>	<i>Gigasporaceae</i>	<i>Scutellospora</i>	<i>Archasporales</i>	<i>Gigasporaceae</i>	<i>Gigaspora</i> <i>Scutellospora</i>	
			Sin información		<i>Archaeosporaceae</i>	<i>Pacisporaceae</i>	<i>Pacispora</i>
						<i>Ambisporaceae</i>	<i>Ambispora</i>
			<i>Archaeospora</i>	<i>Archaeosporaceae</i>	<i>Arcahespora</i>		

Cuadro 4. Características de los tipos de micorrizas más importantes

Hongo	Reino de micorriza						
	Micorriza Arbuscular	Ectomicorriza	Ectendomicorriza	Arbutroide	Monotropoide	Ericoide	Orqueoide
Con septo	-	+	+	+	+	+	+
Sin septo	+	-	-	-	-	-	-
Colonización intercelular	+	-	+	+	+	+	+
Sabana fúngica	-	+	+ ó -	+ ó -	+	-	-
Red de Hartig	-	+	+	+	+	-	-
Vesículas	+ ó -	-	-	-	-	-	-
Aclorofilada	-	-	-	-	-	-	(excepto en etapa adulta)
Taxa del hongo	Zigomycete	Basidiomycete Ascomycete	Basidiomycete Ascomycete	Basidiomycete	Basidiomycete	Ascomycete	Basidiomycete
Taxa de la planta	Bryofita Pterofita Gimnospermae Angiospermae	Gimnospermae Angiospermae	Gimnospermae Angiospermae	Erycales	Monotropaceae	Erycales Bryofita	Orchidaceae

(+) Presencia; (-) ausencia; (+ ó -) presencia en algunas especies. **Fuente:** Smith y Read, 2008.

1.4.2.6 Diversidad taxonómica de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en México

La diversidad de los HMA se manifiesta a nivel morfológico, molecular, ecológico y funcional, encontrando probablemente mayor variedad en este último nivel (Sanders *et al.* 1999). Los estudios con HMA se han enfocado principalmente en determinar la respuesta de la planta al hongo micorrízico sin considerar detenidamente al endófito, dando la impresión de que estos hongos son funcionalmente equivalentes, contrario a esta suposición, se ha demostrado que tienen una gran diversidad fisiológica y adaptaciones específicas a las condiciones ambientales-edáficas en las que se desarrollan, por lo que es lógico esperar también respuestas variadas (diversidad funcional) cuando se establecen en condiciones específicas. Prueba de esto es que se ha observado que las plantas micorrizadas se benefician en diferente magnitud dependiendo de los HMA que las colonicen y las condiciones bajo las que se cultiven (Smith y Read, 2008).

En México, regidos bajo el paradigma de la clasificación por funcionalidad, se han identificado 44 especies de HMA tan solo en 11 estados del centro y sur del país, sin embargo, debido a los objetivos de esta investigación, solo nos enfocaremos en aquellos identificados en el estado de Veracruz, donde se localizan el área de estudio.

En el Cuadro 5 se han colocado los seis géneros encontrados en sistemas naturales y agrícolas de dicho estado, allí se puede apreciar que en cafetales los HMA más frecuentes son *Acaulospora mellea*, *Glomus occultum* (Bolaños *et al.*, 2000) y *Glomus clarum*.

Cuadro 5. Especies de hongos endomicorrizicos arbusculares identificados en sistemas agrícolas y naturales en el estado de Veracruz y otros estados.

Especie (Nombre actual)	Especie (Nombre anterior)	Sistema de recolección		Estado de Procedencia
		Agrícola	Natural	
<i>Acaulospora scrobiculata</i> Trappe	<i>Acaulospora scrobiculata</i> Trappe	AZ	Pastos, Dunas costeras, Bosque lluvioso	Chiapas, Edo. de México, Veracruz
<i>Acaulospora spinosa</i> Walker y Trappe	<i>Acaulospora spinosa</i> Walker y Trappe	M, H, F, A, CF		Veracruz, Tlaxcala
<i>Gigaspora gigantea</i> (T.H. Nicolson & Gerd.) Gerd. & Trappe, 1974	<i>Gigaspora gigantea</i> (Nicolson & Gerdemann) Gerdemann & Trappe	MFC, H, F, A, CF		Tlaxcala y Veracruz
<i>Gigaspora rosea</i> Nicolson & Schenck	<i>Gigaspora rosea</i> Nicolson & Schenck		Selva húmeda tropical	Veracruz
<i>Gigaspora albida</i> N.C. Schenck & G.S. Smith	<i>Gigaspora albida</i> N.C. Schenck & G.S. Smith	F, AZ	Dunas costeras	Morelos, Veracruz
<i>Rhizophagus fasciculatus</i> (Thaxter) Gerdemann & Trappe Walker & Koske,	<i>Glomus fasciculatum</i> (Thaxt.) Gerd. & Trappe	CF		Veracruz
<i>Funneliformis geosporus</i> (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schluessler 2010	<i>Glomus geosporum</i>	CF		Veracruz, Tlaxcala
<i>Corymbiglomus corymbiforme</i>	<i>Glomus globiferum</i>		Dunas costeras	Veracruz
* <i>Glomus halon</i> Rose & Trappe	* <i>Glomus halon</i> Rose & Trappe		Pastos	Veracruz
<i>Cetraspora pellucida</i> (T.H. Nicolson & N.C. Schenck) Oehl, F.A. Souza & Sieverd.)	<i>Scutellospora pellucida</i>	MFC, M		Tlaxcala y Veracruz

* Especies descritas en México. A: alverjón; AZ: caña de azúcar; CF: café; F: frijol; H: haba; M: maíz; MFC: policultivo maíz-frijol-calabaza. **Fuente:** Sanders *et al.* 1999. Modificado por Herrera, 2018 con información de The National Center for Biotechnology Information, 2018.

1.4.2.4. Cultivo y multiplicación de hongos micorrízicos arbusculares

Existe diferentes técnicas para el cultivo y multiplicación de esporas de HMA; sin embargo, la más empleada es la de secuencia de cultivos usando plantas trampa (Trejo-Aguilar *et al.*, 2008).

Esta técnica consiste en incrementar hongos micorrízicos previamente colectadas e identificados, mediante el establecimiento de muestras de suelo que contenga esporas en condiciones protegidas, utilizando cultivos trampa o plantas hospedantes que de preferencia deben ser micotróficas obligadas, como por ejemplo *Brachiaria decumbens* o *Pueraria phaseoloides* (Bolaños *et al.*, 2000); sin embargo, también se pueden usar gramíneas, leguminosas y alliáceas (Trejo-Aguilar, 1997). El tiempo para la multiplicación de MA nativas es variado pero este proceso termina cuando aparece micelio en la superficie de las unidades multiplicadoras (Trejo-Aguilar *et al.*, 2008) y en promedio se requieren de nueve a doce meses.

Durante el proceso de multiplicación es necesario monitorear la viabilidad de las esporas y el micelio mediante técnicas de tinción (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1993), además es indispensable identificar los géneros presentes en el inóculo.

El éxito de la multiplicación de hongos endomicorrizicos radica en evitar contaminación por esporas de hongos ajenos a la muestra de interés, lo que se logra cubriendo la superficie de los contenedores con películas plásticas. Además, es importante la nutrición de los organismos que se desean incrementar, por lo que Trejo-Aguilar *et al.* (2008) recomienda aplicar riegos con soluciones nutritivas deficientes en fósforo y nitrógeno. Una de estas soluciones es llamada Log Ashton, cuya composición ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) es: 80.8 KNO_3 ; 73.6 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 188.8 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 36.8 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1.69 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0.25 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0.29 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 3.10 H_3BO_3 ; 5.90 NaCl ; 0.088 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 4.9 $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$; y 4.9 $\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$. (Yépez-Hernández *et al.*, 2016).

CAPITULO II: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CONSORCIOS NATIVOS DE HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES.

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son los más ampliamente distribuidas en el mundo, tanto geográficamente como filogenéticamente. Se considera que estos organismos aparecieron aproximadamente hace 400-500 millones de años, entre el periodo Ordovícico y el Devoniano tardío, según registros fósiles. Anteriormente se pensaba que el ancestro común de estos organismos pertenecía a la familia *Glomaceae* (Filho *et al.*, 2016), sin embargo gracias a los análisis filogenéticos basados en ITS (Internal Transcriber Spacer), actualmente los hongos micorrízicos arbusculares se han reclasificado del phylum *Zygomycota*, al *Glomeromycota* (Schüßler *et al.*, 2001).

Los HMA forman simbiosis con raíces de más del 80 % de plantas terrestres y cuando se establece una buena relación simbiótica, la planta presenta cambios en su fisiología debido a alteraciones en el balance hormonal, el cual tiene impactos en el metabolismo, así como en los mecanismos de defensa ante estrés biótico y abiótico (Filho *et al.*, 2016). Debido a este efecto de la simbiosis, la micorrización es una característica deseada en cultivos agrícolas, sobre todo en aquellos que se encuentran establecidos en ambientes edáficos no favorables, ya sea por la presencia de plagas, por deficiencia de nutrimentos o por condiciones desfavorables relacionadas con alguna característica físico- química del suelo.

El café es una planta micotrófica obligada por tal motivo su asociación con HMA es indispensable, sin embargo la inoculación asistida, priorizando la asociación con ciertos géneros micorrízicos, permite controlar la incidencia o severidad de ciertos patógenos, por ejemplo se tiene registro de que la inoculación de plantas de café con el género *Rhizophagus* sp. redujo la incidencia de *Fussarium* en aislados de hojas, además al inocular plantas micorrizadas y crecidas in vitro con *Fussarium*, este hongo no se mostró como patógeno (Rêzácôvá *et al.*, 2017).

La inoculación con HMA es una práctica ampliamente estudiada y también se ha comprobado la adquisición de resistencia a infestaciones de nematodos e infecciones de la raíz, no obstante el comportamiento de plantas micorrizadas ante el ataque de

enfermedades de la filosfera como la roya, no se encuentra ampliamente documentada y tampoco existen registros de la diversidad de colonias de hongos micorrícicos arbusculares en plantas de café infestadas y no infestadas o bien de distintas variedades, por esta razón en este capítulo se abordará la metodología seguida para la caracterización de consorcios nativos de micorrizas arbusculares presentes en plantas de las variedades Typica, Bourbon, Geisha y Garnica así como el aislamiento y multiplicación de aquellos aislados en la variedad Typica para la obtención de un inóculo que será probado posteriormente (ver Capítulo V). El objetivo de este capítulo también es la comparación de la diversidad de HMA presentes en arquetipos de café variedad Typica, infectadas con roya contra la diversidad presente en las plantas tipo no infectadas.

2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1. Ubicación y descripción del área de muestreo

Se seleccionaron cuatro parcelas pertenecientes al municipio de Ixhuatlán del Café, Veracruz. La elección de estas obedeció al interés de los productores y a las variedades de café que se encontraban establecidas en ellas. La identificación de las parcelas se presenta en el Cuadro 6 y en la Figura 3.

Cuadro 6. Identificación general de las parcelas muestreadas

Localidad	Ubicación	Nombre de la parcela	Variedad de Café
Zacamitla	-96 ° 55' 7.62'' N y 19 ° 03' 24'' W	La Barranca	Garnica
Zacamitla	-96 ° 55' 41.8 '' y 19 ° 03' 58.14 ''	La Barranca	Bourbon
Zacamitla	-96 ° 54' 49.08'' N y 19 ° 05' 4.44'' W	Roja	Geisha
Zacamitla	-96° 55' 9.42'' N y 19° 03' 24'' W	El Plan	Typica

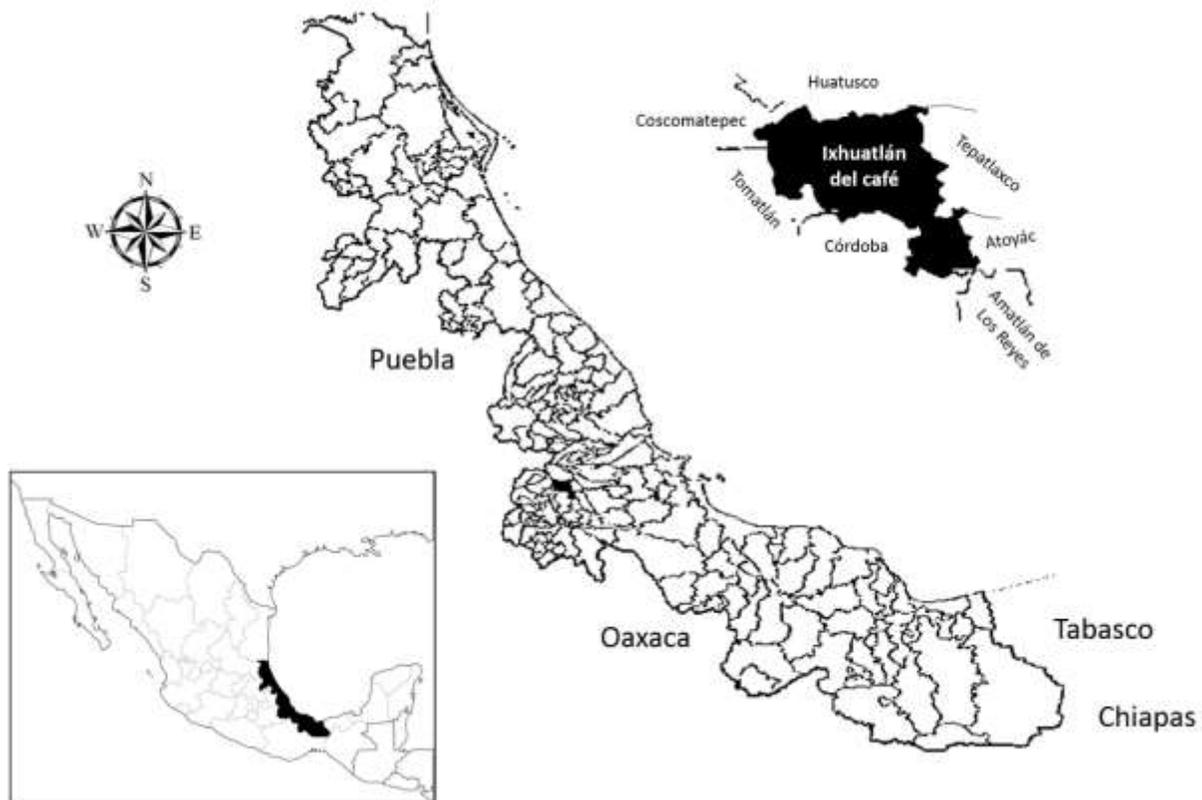


Figura 3. Ubicación del área de estudio

El área de muestreo tuvo una superficie aproximada de 100 m² por variedad de café, tomando 20 plantas por área muestreada (diez plantas sanas y diez enfermas para el caso de la variedad Typica, mientras que para las otras variedades se tomaron diez plantas sanas al azar). Estos parámetros se definieron según lo recomendado por Martínez-Pamatz y Soriano-Fajardo (2014).

2.1.2. Método de muestreo

Debido al interés de los productores por las todas las variedades de café abordadas en esta investigación y porque la Typica es la más susceptible al ataque de roya, pero al mismo tiempo la que mejor calidad taza posee, se siguieron dos métodos de muestreo, según la variedad de café y estos se describen a continuación.

De la variedad Typica, se muestrearon diez plantas tipo sin síntomas de infección por roya y diez más con síntomas severos de esta (Figura 4), esto con la finalidad, de estudiar

la diversidad de hongos endomicorrízicos presentes en plantas sanas y contrastarla con la de plantas enfermas.

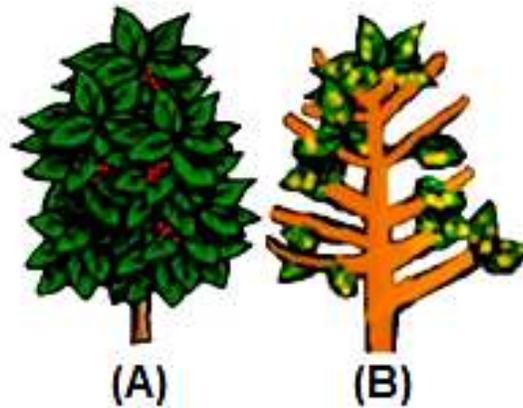


Figura 4. Ilustración de café sin síntomas de infección (A) y con síntomas severos de infección de roya (*H. vastatrix*) (B).

Las plantas muestreadas fueron seleccionadas en áreas al azar de una misma parcela donde las condiciones edáficas y de relieve eran homogéneas. De cada planta seleccionada se obtuvieron dos muestras compuestas de suelo (una a 15 cm y otra a 30 cm de distancia radial del tronco, ambas a 15 cm de profundidad), las cuales se conformaron por tres submuestras tomadas en dirección norte, sur-este y sur-oeste, teniendo como eje al tronco de la planta, tal como se representa en la Figura 5. El muestreo se diseñó de esta manera pues se reporta que el mayor número de raíces absorbentes y que forman asociación con hongos micorrízicos, se encuentran en las distancias especificadas en la metodología (Bolaños-B. *et al.*, 2000).

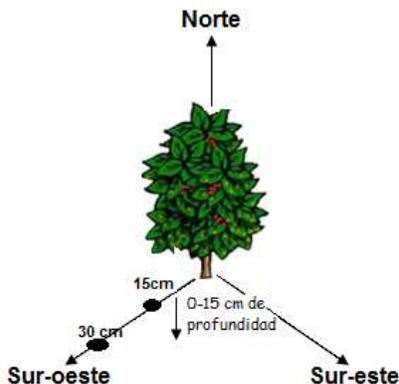


Figura 5. Dirección, profundidad y distancias radiales para la toma de submuestras.

Cada muestra compuesta pesó aproximadamente 3 Kg de suelo y 100 g de raíces en fresco, tal como lo recomienda Bolaños-B. *et al.* (2000) y Trejo-Aguilar (1997).

Para las variedades de café Bourbon, Garnica y Geisha se muestrearon diez plantas sanas al azar por variedad, siguiendo la misma metodología de orientación y profundidad con la que se obtuvieron las muestras de la variedad Typica pero con la diferencia que en esta ocasión se obtuvo una sola muestra compuesta por variedad de café y planta tipo; es decir, las muestras compuestas obtenidas de plantas de una misma variedad y planta tipo, se mezclaron, posteriormente se homogenizaron por cuarteo hasta obtener una muestra de aproximadamente 2 Kg de suelo y 80 a 100 g de raíces por variedad de café.

Para ambos métodos de muestreo, se realizó la caracterización físico-química en 500 g de suelo, en los 2.9 Kg restantes se realizó la identificación de esporas y la multiplicación de consorcios con fines de identificación morfológica. En las muestras de raíces se llevó a cabo la identificación de colonización micorrícica mediante clareo y tinción, así como la determinación del porcentaje de colonización.

2.2. Detección de estructuras micorrícicas

La detección de esporas, vesículas u otras estructuras micorrícicas se realizó en muestras de suelo y raíces obtenidas en las parcelas descritas anteriormente. Las raíces se procesaron por clareo-Tinción (técnica descrita por Bolaños, 2000 y Trejo, 1997); es decir, se separaron por variedad y sintomatología del hospedero, después se lavaron con agua corriente hasta eliminar los residuos de suelo, se eligieron las raíces más delgadas mismas que se clarearon con KOH al 10 % por tres días, cambiando el reactivo cada vez que este pasaba de un tono traslucido a café o amarillo. El KOH se retiró, se enjuagaron las raíces con agua destilada y se aplicó peróxido de hidrógeno al 10 % por cuatro horas, se enjuagaron con agua destilada y se sumergieron en HCL al 10 % por media hora más. Finalmente las raíces se colocaron en una solución de azul de tripano al 0.05 % durante una hora, se eliminó el colorante y se pasaron a lactoglicerol limpio o agua destilada para su observación en microscopio óptico.

2.2.1 Extracción de esporas en el suelo

Para esta variable se realizó un tamizado en húmedo y filtración combinado con la técnica de flotación en sacarosa, para lo cual se diluyeron 50 g de suelo de rizosfera seco (proveniente de las macetas de multiplicación) en 1000 mL de agua corriente, se agitó vigorosamente por cinco minutos, se dejó reposar por 10 segundos y el sobrenadante se tamizó en mallas de 50, 100, 250 y 750 μm , la fracción de suelo obtenida de los tamices 250 y 750 μm se recogió con agua destilada de una pisseta y se colocó en tubos para centrifuga. Se centrifugó durante 5 minutos a 2000 rpm y se retiró el sobrenadante de los tubos, al precipitado se le agregó sacarosa al 70 %, se agitó nuevamente con una varilla de vidrio y se volvió a centrifugar a 1 500 rpm durante 35 segundos. Finalmente el precipitado se recogió, se enjuagó en un tamiz de malla pequeña (750 μm de abertura) y se filtró en papel para observar al microscopio estereoscópico (Trejo-Aguilar *et al.*, 2008).

2.2.2 Identificación de esporas

La identificación se realizó a partir de 10 muestras obtenidas del suelo de plantas sanas y 10 muestras de plantas enfermas, así como de un muestreo posterior en 10 macetas de multiplicación donde se estableció suelo de plantas sanas y 10 más con suelo de plantas enfermas.

La identificación fue morfológica, separando los consorcios micorrízicos obtenidos en el tamizado húmedo, lavándolos con suficiente agua para evitar ruptura (plasmólisis). La suspensión se colocó en una caja Petri cuidando que no se desecara pero que se distinguieran las esporas en el microscopio estereoscópico.

El proceso de identificación obedeció al descrito por Trejo-Aguilar *et al.* (2008), es decir; se seleccionaron esporas que no presentaban daño mecánico posteriormente se separaron de acuerdo a su color, tamaño, forma y tipo de hifa de sostén. Finalmente se observó la ornamentación, el número y grosor de las capas que conforman la pared de la espora, así como su contenido citoplasmático (Trejo-Aguilar *et al.*, 2008).

Después de seleccionar y clasificar las esporas se fijaron de 10 a 15 de cada clase encontrada, en portaobjetos con reactivo Mezler y se observaron en el microscopio para realizar mediciones e identificaciones con base en las descripciones de la página web del

International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mychorrizal Fungi (INVAM)⁴ (Morton, 2017).

2.2.3. Determinación de colonización y diversidad

Para obtener indicadores de diversidad y distribución de especies se calculó lo siguiente en muestras provenientes de suelos de plantas sanas y enfermas, así como de macetas de multiplicación: Frecuencia de aislamiento (% IF = No. de muestras en las que se aisló una especie determinada / No. total de muestras) x 100), abundancia relativa (RA = No. de esporas de la especie *i* / No. total de esporas) x 100), valor de importancia (IV = (IF + RA)), porcentaje de colonización, densidad de esporas expresado como número de esporas/100 g de suelo, índice de diversidad de Shannon (*H*) y el índice de diversidad Simpson (*D*).

Para la determinación del porcentaje de colonización de las raíces micorrizadas, se observaron en un microscopio óptico 100 segmentos de cada tratamiento. A cada segmento donde se observó la presencia de hifas, vesículas o arbusculos, se le dio el valor de uno (a cada estructura observada) y con el conteo obtenido se estimó el porcentaje de colonización con la siguiente formula:

$$\% \text{ de colonización} = \frac{\text{No. de campos colonizados}}{\text{No. total de campos observados}} \times 100$$

Los datos obtenidos del porcentaje de colonización en raíces se transformaron utilizando la formula (% de colonización +0.5)^{0.5} (Alves *et al.*, 2010) y se procesaron con el software SAS® versión 9.0 (SAS Institute Inc. Campus Drive, Cary, North Caroline, USA) con Análisis de varianza (ANDEVA) y pruebas de comparación de medias Tukey (p=0.05).

La densidad de esporas se determinó por tamizado, centrifugación con sacarosa y conteo (método descrito en el punto 2.2.1 de este documento), el resultado se transformó mediante la ecuación $\log x + 1$ (Menezes, Silva, Queiroz, Félix, & Yano-melo, 2016) para cumplir con los supuestos de normalidad. La fórmula para el cálculo y estandarización de esta variable fue (Sieverding, 1993):

⁴ Información disponible en la página <http://fungi.invam.wvu.edu/the-fungi/species-descriptions.html>.

$$\log \left(\text{No. de esporas} = \left(\frac{\text{esporas contadas}}{\text{peso de la muestra}} \right) * \frac{P_i}{P_f} * 100 \right) + 1$$

Donde:

P_i : peso inicial de la muestra usada para determinar humedad

P_f : peso final de la muestra para determinar humedad.

Por otro lado, para muestras provenientes de macetas de multiplicación se realizaron tinciones de esporas con tetrazolio, para contar el número de esporas viables, siguiendo la metodología descrita por Trejo-Aguilar *et al.* (2008). Es resultado también se transformó como ya se ha descrito en el párrafo anterior y tanto el resultado de densidad de esporas como el de densidad de esporas viables, se procesaron por separado con el software SAS® versión 9.0 (SAS Institute Inc. Campus Drive, Cary, North Caroline, USA) con Análisis de varianza (ANDEVA) y pruebas de comparación de medias Tukey ($p=0.05$).

El índice de Shannon-Weiner y el de Simpson reflejan la diversidad de especies que se pueden encontrar en una comunidad, por lo tanto su cálculo también sirve para determinar qué tan equitativa o no es la distribución de dichas especies en una muestra. Las ecuaciones para la determinación del índice de diversidad de Shannon-Weiner y el índice de Simpson se presentan enseguida:

$$\text{Índice de Shannon-Weiner } (H) = - \sum p_i \ln(p_i)$$

Donde:

p_i : Abundancia relativa de especie i calculado como n_i/N

n_i : Número de individuos de especie $i \dots i=1, 2, 3, \dots$, número de especies

N : Número total de individuos

$$\text{Índice de Simpson } (D) = \sum p_i * p_i \text{ o bien } D = \sum p_i^2$$

Donde:

p_i : Abundancia relativa de especie i calculado como n_i/N

n_i : Número de individuos de especie $i \dots i=1, 2, 3, \dots$, número de especies

N : Número total de individuos.

Finalmente se ejecutó análisis de conglomerados sobre la frecuencia de esporas de cada género aislado para construir un dendrograma que muestra similitud entre comunidades endomicorrícicas de las plantas sanas y enfermas. La agrupación se hizo utilizando la distancia euclidiana al cuadrado haciendo uso del software SPSS, versión 20.0.

2.2.4. Obtención de consorcios de hongos endomicorrícicos (multiplicación de consorcios)

Se empleó el método descrito por Siverding (1993), para lo cual se llenaron macetas de 1 Kg, con 500 g de arena de banco lavada y estéril; en la superficie se colocó una capa de aproximadamente 300 g de suelo recolectado y se cubrió con 150 g de arena estéril. Se emplearon cinco repeticiones (cinco macetas) por muestra de suelo proveniente de plantas sanas y cinco para suelo extraído de plantas enfermas de la variedad de café Typica, y únicamente una repetición para las muestras de suelo obtenidas de variedades de café distintas a la Typica (pues de las variedades estudiadas distintas a Typica solo interesaba tener una caracterización y no un inóculo), en un diseño completamente al azar.

Como especies trampa se estableció maíz y frijol, se dejaron germinar y crecer por tres meses, regando cada seis días con 50 mL de solución nutritiva Long Asthon deficiente en fósforo (Yépez-Hernández *et al.*, 2016).

Después de tres meses, se identificaron las especies y géneros de hongos micorrízicos, se contabilizó el número de esporas viables y porcentaje de colonización en raíces de maíz y frijol, así como el conteo de nemátodos por maceta, realizando el análisis estadístico descrito en el punto 2.2.3.

Para aquellas macetas donde se observaron nemátodos, se aplicó directamente a suelo la dosis recomendada para cereales en la etiqueta de carbofuran (Furadan®), con la finalidad de controlar a dichos organismos.

2.2.5. Inoculación y aclimatación de consorcios micorrícicos arbusculares en semillas de café

Después de establecer las macetas de multiplicación y evaluarlas con los parámetros descritos en el punto 2.2.3, se seleccionaron aquellas que presentaron mayor número de esporas viables, mayor porcentaje de colonización y nulo número de nemátodos por muestra de suelo.

En las maceta seleccionadas se cortó la parte aérea de las plantas establecidas en ellas y se suspendió el riego por aproximadamente 10 días para favorecer la esporulación y obtener un inóculo.

Para el inóculo proveniente de suelo de plantas sanas, se mezcló el suelo obtenido de las macetas de multiplicación seleccionadas y se homogeneizó por cuarteo, se tomó una muestra de 100 g y se determinó la densidad de esporas para tener una idea de cuantas unidades por gramo de suelo inocularíamos a las semillas de café. Se realizó lo mismo para el inóculo obtenido de suelo de plantas enfermas.

Una vez obtenido y evaluado el inóculo se adicionó a 40 semillas de café variedad Typica (20 semillas con inóculo obtenido de suelos de plantas sanas y 20 semillas con inóculo de plantas enfermas) en un semillero dividido en dos y establecido de acuerdo con las recomendaciones del manual práctico y técnico de cafecultura orgánica (CICADES y Fundación Malongo, 2016).

Una vez que las semillas germinaron y aparecieron plántulas, estas se dejaron madurar durante dos meses, posteriormente se transfirieron a macetas que contenían 1.5 Kg arena estéril y 500 g del suelo del semillero, para conservar los consorcios de cada tratamiento.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Caracterización general de suelo

Las características físicas de los suelos muestreados corresponden con lo mencionado con los propietarios de las parcelas, en el Cuadro 7 se presenta la descripción de los suelos.

Cuadro 7. Características físicas y de uso de suelos muestreados

Ubicación	Nombre de la parcela	Variedad de Café	Tipo de suelo	Características físicas generales
Zacamitla	La Barranca	Garnica	Cambisol Háplico	Suelos poco profundos (no más de 60 cm), color café oscuro, con textura arcillosa-arenosa y densidad aparente (Dap.) de 0.77 g cm ⁻¹ .
Zacamitla	La Barranca	Bourbon	Cambisol Háplico	
Zacamitla	Roja	Geisha	Luvisol Crómico (Cutánico)	Suelo poco profundo (no más de 60 cm), color rojizo en la superficie y pardo después de los 30 cm de profundidad, textura arcillosa-limosa y Dap. de 0.76 g cm ⁻¹ .
Zacamitla	El Plan	Typica	Cambisol Crómico Vértico	Suelo profundo (más de un metro) color marrón oscuro, textura arcillosa-arenosa y Dap. de 0.84 g cm ⁻¹ .

En el Cuadro 8 y Cuadro 9 se presentan las características químicas generales, según las cuales, los suelos pertenecientes a las parcelas El Plan y La Barranca, tienen pH neutro, mientras que el de la parcela La Roja es fuertemente ácido (Litelier, 1967), según su conductividad eléctrica (C.E.) ningún suelo presenta efectos por salinidad (Richars, 1962), todos los suelos se clasifican como ricos en nitrógeno (N total) (Tavera, 1985), pobres en fósforo (P) determinado con el método Mehlich 1 (CSTPA, 1980, citado por Etchevers, 2010), medios en calcio (Ca), magnesio (Mg) y potasio (K) intercambiables extractados con acetato de amonio (Etchevers, 2010).

Cuadro 8. Características químicas generales de los suelos muestreados

Parcela	pH	C.E. dSm ⁻¹	N total (%)	P	*K	*Ca (ppm)	*Mg	*Na
El plan	6.52	0.69	0.17	1.69	35.45	580	88.7	4.1
La Barranca	6.49	0.51	0.19	1.73	27.91	328	134.87	3.46
	6.49	0.53	0.19	1.73	21.4	328	134.86	4.33
Roja	4.24	0.48	0.18	1.77	38.67	136	59.54	4.43

* Elementos solubles.

Cuadro 9. Contenido de elementos intercambiables en los suelos muestreados.

Parcela	Ca	Mg	K
	(meq g ⁻¹⁰⁰)		
El Plan	5.4	1.0	0.24
La Barranca	2	1.03	0.69
	2	0.97	0.18
Roja	4	2.0	0.25

La baja concentración de fósforo expone al suelo a erosión en caso de establecimiento de variedades de café bajo el esquema de sombra cero, pues al modificar la diversidad de cobertura vegetal hacia un monocultivo intensivo se afecta la dinámica de absorción y reposición de este elemento provocando que las características de pH y solubilidad de otros nutrimentos cambie, una vez que las características químicas del suelo se modifican también lo hacen las físicas (Etchevers, 2010) lo que implica mayor gasto por fertilización e insumos para mantener la misma productividad; sin embargo para el uso actual que tienen, son adecuados para el desarrollo de organismos benéficos, sobre todo micorrizas, las cuales favorecen la absorción de fósforo por su hospedante (Swamy *et al.*, 2016).

2.3.2. Inventario de especies de hongos micorrízicos por variedad de café

La identificación de las esporas se realizó únicamente a nivel morfológico, basado en las descripciones y artículos originales disponibles en la página web del INVAM y se reportan datos obtenidos de muestras de maceta de multiplicación.

En el Cuadro 10 se presenta un inventario de los géneros y especies encontrados en las distintas variedades de café muestreadas y en la Figura 6, los géneros más representativos.

Cuadro 10. Géneros y especies de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) aisladas en cuatro variedades de café cultivados en Ixhuatlán del café, Veracruz.

Variedad de café	Genero de MA aislado	Especies
Typica	<i>Acaulospora</i>	<i>Ac. foveata, Ac. scrobiculata, Ac. mellea, Ac. laevis, Ac. delicata, Ac. capsicula, Ac. spinosa, Ac. lacuosa, Ac. remhi, Ac. sp.</i>
	<i>Ambispora</i>	<i>Am. leptoticha</i>
	<i>Claroideoglomus</i>	<i>Cl. lamellosum, Cl., entunicatum, Cl. luteum, Cl. claroideum, Cl. sp</i>
	<i>Denticustata</i>	<i>D. biornata</i>
	<i>Diversispora</i>	<i>D. tortuosa, sp1., sp2, sp3</i>
	<i>Entrophospora</i>	<i>En. infrequens</i>
	<i>Funneliformis</i>	<i>Fu. mosseae, Fu. coronatum</i>
	<i>Gigaspora</i>	<i>Gi. sp 1 y Gi. sp2</i>
	<i>Glomus</i>	<i>Gl. sp1</i>
	<i>Paraglomus</i>	<i>Pa. sp1</i>
	<i>Racocetra</i>	<i>Ra. verruculosa</i>
	<i>Rhizophagus</i>	<i>Rh. fasciculatus, Rh. manihotis, Rh. irregularis, Rh. intraradices, Rh. clarus, Rh. sp</i>
	<i>Septoglomus</i>	<i>Se. desertícola</i>
Bourbon	<i>Sclerocystis</i>	<i>Sc. sinuosum</i>
	<i>Acaulospora</i>	<i>Ac. spinosa, Ac. scobiculata, Ac. foveata, Ac. mellea</i>
	<i>Glomus</i>	<i>Gl. hoy</i>
	<i>Rhizophagus</i>	<i>Rh. manihotis</i>
	<i>Sclerocystis</i>	<i>Sc. sinuosum</i>
	<i>Acaulospora</i>	<i>Ac. mellea, Ac. scobiculata, Ac. foveata</i>
Garnica	<i>Denticustata</i>	<i>D. sp1</i>
	<i>Glomus</i>	<i>Gl. sp 1, Gl. sp 2</i>
	<i>Rhizophagus</i>	<i>Rh. manihotis, Rh. sp 1</i>
	<i>Septoglomus</i>	<i>Se. Desertícola</i>
Geisha	<i>Acaulospora</i>	<i>Ac. foveata, Ac. spinosa, Ac. mellea</i>
	<i>Entrophospora</i>	<i>En. infrequens</i>
	<i>Glomus</i>	<i>Gl. lacteum</i>
	<i>Rhizophagus</i>	<i>Rh manihotis, Rh. sp 1</i>
	<i>Sclerocystis</i>	<i>Sc. sinuosum</i>

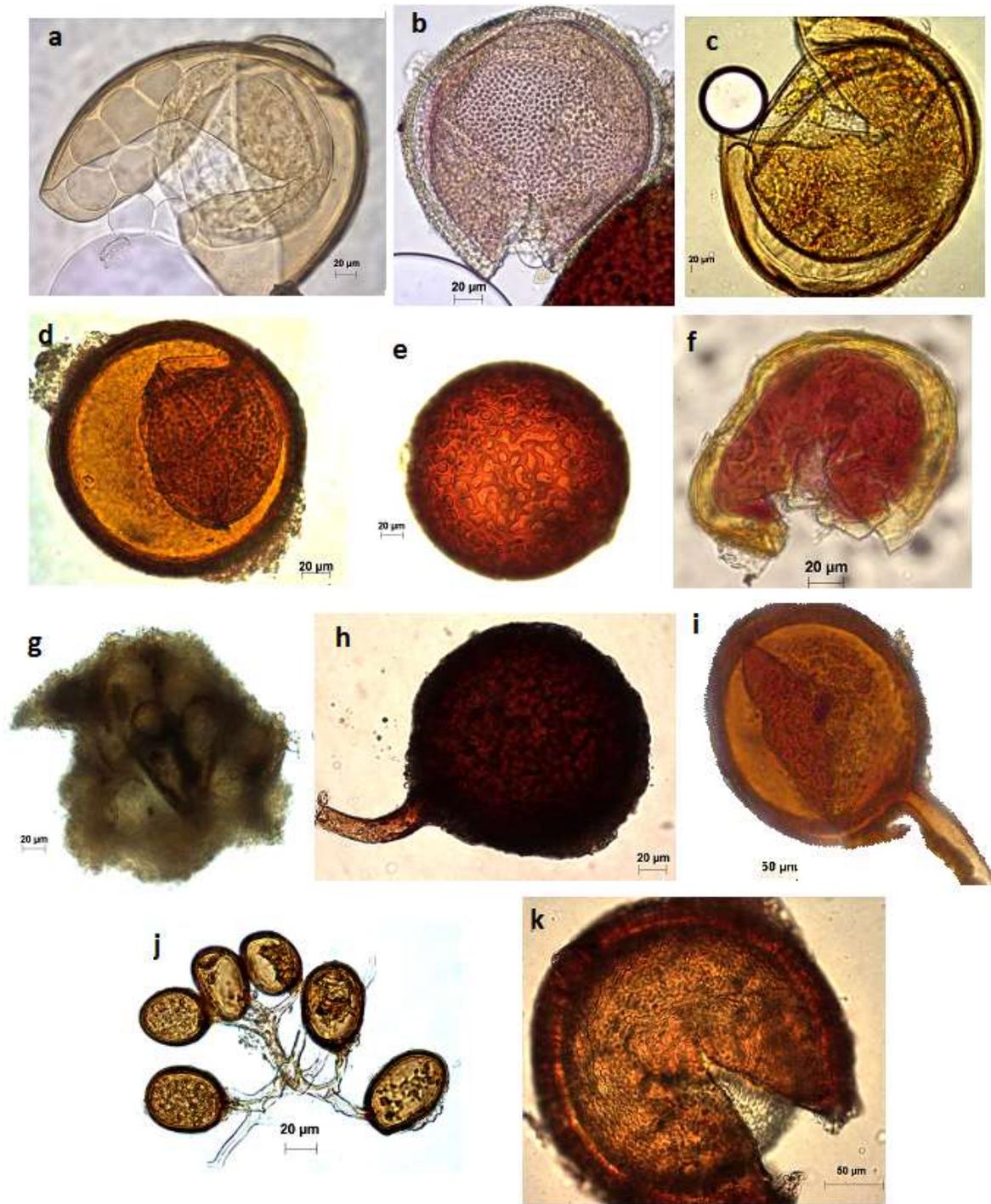


Figura 6. Algunas especies de HMA identificados en cafetos veracruzanos. **a** *Acaulospora spinosa*; **b** *A. scrobiculata*; **c** *A. laevis*; **d** *Acaulospora* sp.; **e** *A. foveata*; **f** *A. mellea*; **g** *Sclerocystis sinuosum*; **h** *Rhizophagus manihotis*; **i** *Rhizophagus* sp.; **j** *Paraglomus* sp.; **k** *Denticustata reticulata*.

2.3.3. Colonización y diversidad de esporas

Para la variable de porcentaje de colonización en raíces obtenidas a 15 cm y 30 cm de distancia radial de plantas de café, no se observan diferencias significativas (5.12 ± 0.4 y 5.31 ± 0.2 , respectivamente para plantas sin síntomas de infección, así como 4.93 ± 0.1 y 4.93 ± 0.1 para las enfermas), por lo que resulta indistinto realizar el muestreo de suelo y raíces a profundidades de 15 cm o 30 cm, tal como lo recomienda Trejo-Aguilar (2008).

No se presentan datos de porcentaje de colonización en macetas de multiplicación ni de índices de diversidad debido a la pérdida de datos generada por la huelga de la STAUACH del 2017.

Por otro lado al calcular el Índice Shannon-Weiner, cuyo valor superior a tres indica diversidad, se encontró que las poblaciones de hongos micorrízicos arbusculares presentes en plantas con síntomas y sin síntomas, no son diversas, además no se encontraron diferencias significativas ($p= 0.05$) entre ellas. Lo mismo ocurre cuando se calcula el Índice de Simpson (D), en donde un número menor indica mayor diversidad.

Sin embargo, la densidad de esporas y el porcentaje de colonización de raíz fueron superiores en plantas sin síntomas, excepto para plantas de café variedad Garnica y Geisha (en esta última no se encontraron plantas enfermas, por eso no se reporta comparación) (Cuadro 11). Específicamente para la variedad Typica, la densidad de esporas no transformada fue 186.26 superior en plantas sanas y un 1.31 % mayor en cuanto a la colonización (Cuadro 11 y Cuadro 12).

Cuadro 11. Porcentaje de colonización transformado, en raíces de café en distintas variedades

Planta sin síntomas de infestación		Planta con síntomas de infestación		DMSH
Variedad	Colonización (%)	Variedad	Colonización (%)	
Cr	7.70 a [†]	Cr	6.39 b	0.73
B	6.84 a	B	6.28 b	0.61
Ga	5.99 b	Ga	6.96 a	1.02
GE	5.99	-	-	-

Cr: Criollo o Typica; B: Bourbon; Ga: Garnica; GE: Geisha. [†]Grupos con la misma letra dentro de la misma fila no representan diferencia significativa DMSH ($p=0.05$). Test de comparación de medias Tukey.

Cuadro 12. Densidad y Diversidad de esporas en plantas de café variedad Typica

Tratamiento	No. de especies	Densidad de esporas (Esporas/100 g de suelo)	Densidad de esporas transformado	Índice de Shannon-Weiner (<i>H</i>)	Índice de Simpson (<i>D</i>)
Cr _s	21.75 a [†]	661.68	3.83 a	2.29 a	0.117 a
Cr _e	22.75 a	475.42	3.65 b	2.64 a	0.089 a
DMSH	11.04	-	0.14	1.255	0.060

Cr_s: planta sin síntomas, Cr_e: planta con síntomas. [†] Grupos con la misma letra dentro de la misma columna no representan diferencia significativa DMSH (p=0.05). Test de comparación de medias Tukey.

Resultados similares se reportaron, en cuanto a los índices de diversidad y al porcentaje de colonización, en la investigación realizada por Thagoraju (2008), quien inoculó plantas con HMA y con el patógeno *Pratylenchus coffeae*, obteniendo además mayor sobrevivencia y mejor desarrollo de plantas cuando estas habían sido inoculadas con *Rhizophagus clarus* y *Acaulospora mellea*.

De este modo el menor porcentaje de colonización en plantas con síntomas se debe posiblemente a los cambios bioquímicos que ocurren en plantas infestadas. Pues cuando el proceso de infección inicia, la abundancia de enzimas hidrolasas de azúcares y carbohidratos disminuye, alterando el flujo de carbono hacia la raíz, posterior a la infección se activan proteínas relacionadas con la defensa de la planta impidiendo la entrada de otros hongos fitopatógenos y también afectando la asociación con hongos endomicorrízicos (Talhinhas *et al.* 2017).

Los cambios bioquímicos ocurridos en una planta después de que se establece la simbiosis tienen como consecuencia una modificación de la estructura del órgano infectado, así como de la planta en general (Camarena-Gutiérrez, 2012), lo cual se corroboró en esta investigación al observar un arreglo diferencial entre las raíces de plantas micorrizadas con consorcios provenientes de plantas de café con roya en comparación de las raíces de plantas inoculadas con muestras de suelo de plantas no infectadas (Figura 7).



Figura 7. Estructura diferencial de raíces micorrizadas. **A)** Estructura de raíz de planta de café (*C. arabica* L.) var. Typica inoculada con consorcios provenientes de plantas sin síntomas de roya y **B)** Raíz de planta de café inoculada con consorcios provenientes de plantas con síntomas. **C)** y **D)** Vesículas observadas en raíces clareadas y teñidas de plantas inoculadas.

Por otro lado, cuando los datos de abundancia relativa e índice de frecuencia se calculan, se puede observar que los géneros *Acaulospora* y *Rhizophagus* son predominantes en todas las variedades de café muestreadas en esta investigación (Cuadro 13). Estos resultados fueron obtenidos de macetas de multiplicación y concuerda con lo reportado por Arias *et al.* (2011) quienes además reportaron similar diversidad de géneros micorrícicos en distintos sistemas de producción de café lo cual, según esta investigadora, sugiere que algunas prácticas agrícolas realizadas en huertas de café

influyen en la abundancia y composición de consorcios micorrícicos nativos, lo cual también modificaría su dinámica y función trófica.

Cuadro 13. Número absoluto de esporas, índice de frecuencia (% IF), abundancia relativa (% RA) e índice de valor (%IV) de especies endomicorrícicas presentes en huerta de café variedad *Typica*

Especie	No. absoluto de esporas	Arquetipo donde se aisló	IF (%)	RA (%)	IV (%)	Estatus
<i>Acaulospora</i>	651	S, E	100	32.78	66.39	DOM
<i>Ambispora</i>	40	S, E	40	2.01	21.01	COM
<i>Clareideoglossum</i>	159	S, E	80	8.01	44.00	COM
<i>Diversispora</i>	115	S, E	70	5.79	37.90	COM
<i>Denticustata</i>	10	E	10	0.50	5.25	RARA
<i>Entrophospora</i>	11	E	10	0.55	5.28	RARA
<i>Funeliformis</i>	13	E	20	0.65	10.33	COM
<i>Gigaspora</i>	20	S, E	50	1.01	25.50	COM
<i>Glomus</i>	109	S, E	60	5.49	32.74	COM
<i>Paraglossum</i>	28	S	10	1.41	5.70	RARA
<i>Racocetra</i>	78	S, E	80	3.93	41.96	COM
<i>Rhizophagus</i>	620	S, E	100	31.22	65.61	DOM
<i>Sclerocystis</i>	19	S, E	70	0.96	35.48	COM
<i>Septoglossum</i>	113	S, E	60	5.69	32.84	COM

S sin síntomas de infección; E con síntomas de infección; DOM dominante; COM común, RARA poco común.

Para el caso de las parcelas muestreadas, son comunes las aplicaciones de fungicidas cuyo ingrediente activo principal es el cobre, este elemento afecta diferencialmente a las especies de hongos micorrícicos, sin embargo los géneros *Rhizophagus* y *Acaulospora* son más resistentes a estos compuestos activos (Aleksandrowicz-Trzcinska *et al.*, 2017); esta podría ser otra razón por la que ambos géneros sean más abundantes en las huertas muestreadas, además de que una vez multiplicadas *Rhizophagus* y *Acaulospora* son las especies que mejor se adaptan a condiciones edáficas cambiantes y por lo tanto tienen mayor probabilidad de sobrevivir en comparación con otras especies de hongos micorrícicos (Aleksandrowicz-Trzcinska *et al.*, 2017) .

La dinámica y función de los hongos endomicorrizicos depende en gran medida de los elementos químicos disponibles en el suelo, por ejemplo altas concentraciones de fósforo se ha correlacionado con la disminución del establecimiento y efectividad simbiótica (Swamy *et al.*, 2016). A su vez, altas concentraciones de nitrógeno en suelo o cultivos asociados con leguminosas favorecen la presencia de poblaciones de *Acaulospora* (Muleta *et al.*, 2007), no obstante, este género también se ha relacionado con el incremento en la conductancia estomática y tasa de transpiración (Augé, 2004) lo que mejora la eficiencia de las plantas para el aprovechamiento de agua en condiciones de sequía, pero también incrementa la posibilidad de infección por patógenos vía estomática.

Los géneros *Rhizophagus*, *Paraglomus*, *Septoglomus* y *Glomus* son reconocidos en la industria de biofertilizantes por su versatilidad, gran capacidad de adaptación a distintos tipos de suelos y ambientes, así como por su persistencia en campos de cultivo durante varios ciclos agrícolas, sin embargo los compuestos específicos que permiten el establecimiento simbiótico de estos géneros con sus hospedantes no se encuentran reportados, únicamente existe la hipótesis de que son distintos a los empleados por otros géneros micorrizicos pues existe respuesta diferencial entre plantas inoculadas con ellos y otros géneros (Andrade, Mazzafera, Schiavinato, & Silveira, 2009).

Otro resultado importante en este apartado, es que a pesar de que tanto *Acaulospora* como *Rhizophagus* son predominantes en todas las variedades de café, el primero es más frecuentes en plantas con signos de infección con roya o enfermas, mientras que el

segundo en las plantas sanas (

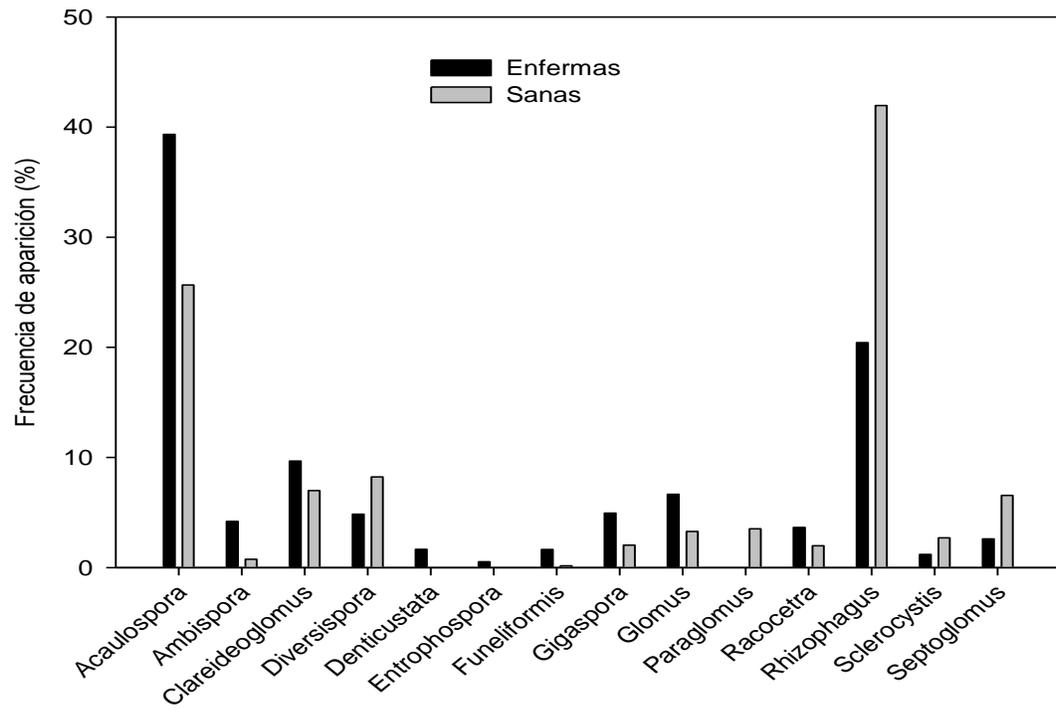


Figura 8 y Cuadro 13).

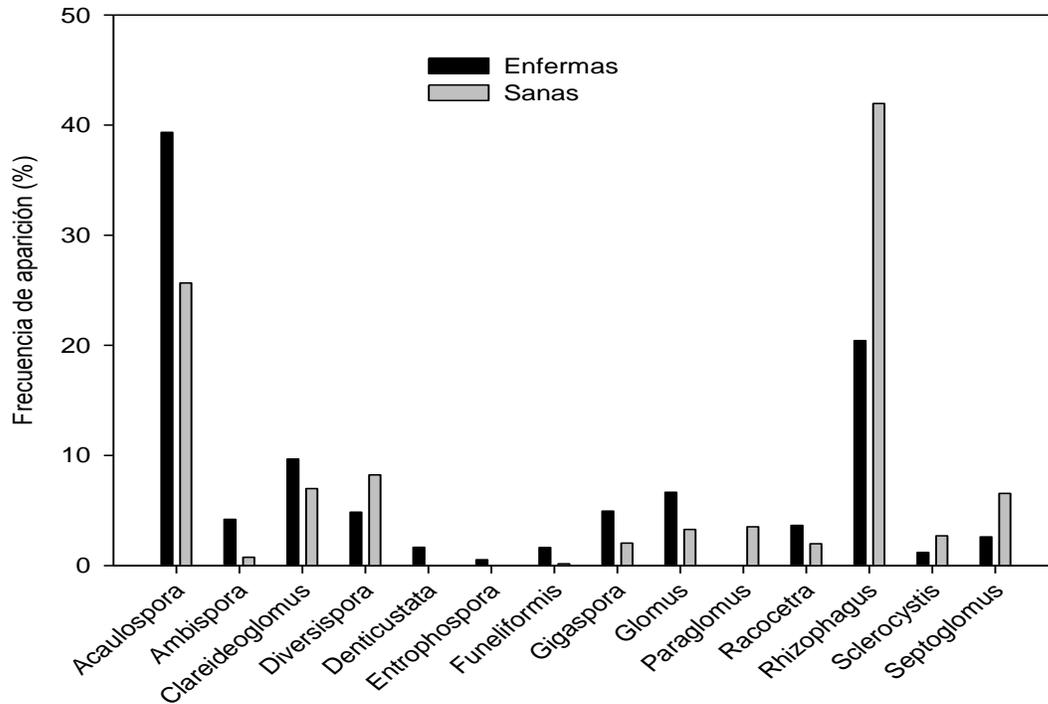


Figura 8. Especies de hongos micorrízicos y su frecuencia de aparición (%) en arquetipos de cafetos variedad Typica.

Además en el gráfico del análisis jerárquico de conglomerados que muestra la relación entre las frecuencias de los hongos endomicorrízicos aislados, se puede observar que los géneros predominantes se unieron en dos grupos (Figura 9); Grupo a y Grupo b. El primero formado por 1 (*Acaulospora* presente en planta con signos de infección con roya) y 14 (*Rhizophagus* asociado con plantas sin signos de infección), este conjunto muestra la mayor frecuencia de aparición del género endomicorrízico correspondiente y grupo b formado entre 2 (*Acaulospora* en plantas con signos de infección) y 13 (*Rhizophagus* con plantas sin signos de infección), éste último representa las menores frecuencias de aparición en cada género especificado.

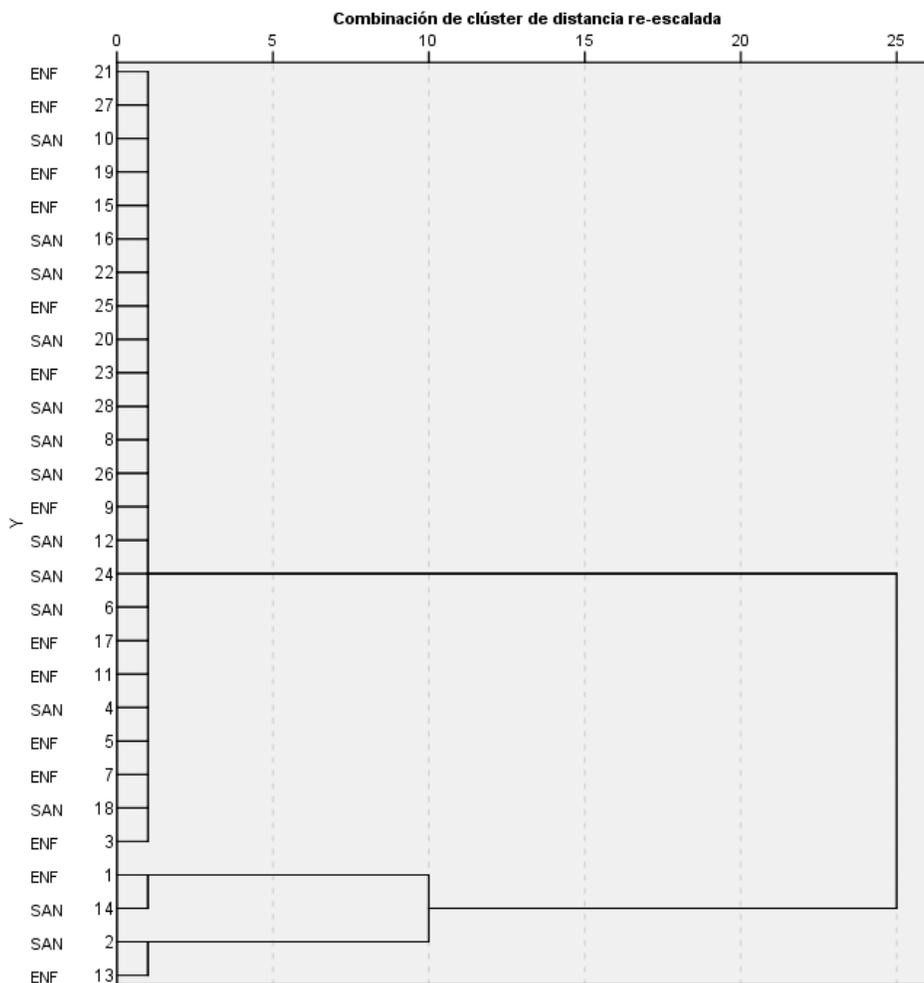


Figura 9. Dendrograma de análisis jerárquico de clusters basado en la similitud de frecuencias entre los géneros de hongos endomicorrízicos identificados en plantas de café var. Typica con síntomas de infección por roya (SAN) y sin síntomas (ENF), donde los números del eje Y indican la formación de un grupo por especie. 1 y 2 son *Acaulospora* con mayor y menor frecuencia respectivamente; 13 y 14 son *Rhizophagus* con menor y mayor frecuencia, respectivamente.

Este comportamiento también puede deberse a las diferencias de calidad y cantidad de compuestos que liberan las plantas colonizadas con cierto género de hongos endomicorrízicos, los que afectan las poblaciones microbianas del suelo, así como la susceptibilidad del hospedante al ataque de patógenos específicos. Por ejemplo la inoculación con *Rhizophagus* en melón, tomate y banano mostró brindar resistencia a patógenos como *Colletotrichum*, *Alternaria* y *Patrylenchus* (Lee *et al.*, 2005; Elsen *et al.*, 2008), sin embargo, este mismo género micorrícico manifestó tener afinidad por colonizar raíces de durazno infestadas con *Meloidogyne incognita* (del Mar Alguacil *et al.* 2011).

2.4. CONCLUSIONES

En este apartado se logró caracterizar la población de hongos endomicorrízicos presentes en café de distintas variedades tales como: Criollo (var. Typica), Bourbon, Garnica y Geisha. Para el caso de la primera variedad se encontró una baja colonización en muestras que provenían de plantas sanas y enfermas. Sin embargo el porcentaje de colonización y el número de esporas hallados en plantas sanas, fue superior por 5.58 % y 186.26 esporas/100 g, en comparación con lo encontrado en plantas enfermas.

Otro resultando fue que existen dos géneros de hongos endomicorrízicos importantes por su abundancia y posible efecto sobre la salud de las plantas. Uno de ellos es *Acaulospora*, el cual es predominante en plantas de café infestadas por roya, el otro es *Rhizophagus* abundante en plantas sin síntomas de la infección. Este resultado abre la posibilidad de seguir investigando sobre la forma de actuar y las condiciones ambientales que requieren estos organismos para brindar protección a cultivos de café; sin embargo es un inicio que da la oportunidad de generar biofertilizantes locales a partir de especies de hongos micorrízicos nativos, amigables con el ecosistema y su diversidad, que de ser exitosos permitirán la subsistencia de sistemas agrícolas tradicionales y la conservación de biodiversidad en huertos.

CAPITULO III: HONGOS FILOSFÉRICOS DE CAFÉ

La agricultura es un sistema creado y modificado por el ser humano a partir de la observación de las relaciones ecológicas que ocurren entre plantas, otros organismos (macro y micro) y agentes abióticos (clima, suelo, altitud, entre otros). Durante el desarrollo de estas interacciones, todas las entidades participantes coexisten en una estrecha asociación, desencadenando relaciones tróficas como el parasitismo, mutualismo, comensalismo, entre otros.

Desde tiempos antiguos, los seres humanos han seleccionado aquellos organismos que desarrollan relaciones mutualistas con la especie agrícola de interés, puesto que esto beneficia al cultivo, algunas veces evitando la infección de patógenos o incrementando la eficiencia para la adquisición y aprovechamiento de nutrientes. A este proceso se le conoce como biocontrol (Hakeem & Akhtar, 2016) y ha sido empleado principalmente en la agricultura orgánica, pero en años recientes ha adquirido importancia en la producción convencional debido a la ineficacia, elevado impacto ecológico y altos costos de los pesticidas.

Tanto en la agricultura orgánica como en la tradicional los principios de manejo integral buscan obtener producción de alimentos inocuos donde la aplicación de insumos sea la menor posible (Bedoussac *et al.*, 2015), pero en ocasiones esto implica una producción por debajo de la obtenida en la agricultura intensiva (Andersen *et al.*, 2015), es así que el uso de organismos para mejorar el aprovechamiento de nutrientes y reducir la incidencia de patógenos se ha estudiado ampliamente colocando a los hongos y a las bacterias como los protagonistas del biocontrol y biofertilización (Clay, 2014; Hooykaas, 2015).

A pesar de ello, los organismos fúngicos son preferidos sobre los procariontes pues su aislamiento y uso no exigen adiestramiento profundo ni grandes inversiones de mantenimiento, a diferencia de las bacterias que aun cuando poseen mayor efectividad en el control de patógenos debido a su alta tasa de multiplicación y adaptabilidad (Sousa, José, Maurício, & Mondego, 2018), se requieren condiciones específicas de nutrición, pH y humedad para su sobrevivencia (Mishra *et al.*, 2015). Para el cultivo de café (*Coffea arabica* L.) el estudio de los microorganismos con potencial para el biocontrol se centra

en aquellos que se desarrollan en la rizosfera (Caldwell *et al.*, 2015), debido a que este es el micro hábitat donde existe mayor diversidad (Mishra *et al.*, 2015), sin embargo en años recientes el aislamiento de organismos filosféricos ha sido clave para el control enfermedades importantes para el cultivo, tales como la roya anaranjada (*H. vastatrix*), antracnosis (*Colletotrichum* spp.), entre otras (Haddad, Saraiva, Mizubuti, Romeiro, & Maffia, 2014; Jackson, Skillman, & Vandermeer, 2012; Silva, Tozzi, Terrasan, & Bettiol, 2012).

Aún con esto la información disponible sobre organismos con potencial para biocontrol es insuficiente debido a la amplia variabilidad de factores que influyen sobre su dinámica ecológica. Por ejemplo la composición, diversidad y estadios de desarrollo de hongos y bacterias es fluctuante pues dependen de factores abióticos tales como humedad, incidencia e intensidad de luz solar, disponibilidad de espacio y nutrimentos para desarrollarse, temperatura, viento, entre otros. Además de bióticos como existencia de predadores, edad, temporalidad y características genéticas tanto del hospedero como del organismo en cuestión (Sousa *et al.*, 2018), condiciones bioquímicas para el establecimiento de la interacción (Beattie, 2004), entre otros. Es así que el uso de un microorganismo particular o un consorcio de estos, requiere estudios específicos que arrojen información sobre su ecología, iniciando por la diversidad e interacciones desarrolladas en ambientes controlados, pues a partir de ello es posible inferir factores que inciden en el desarrollo así como los efectos de este en el hospedero (Kawabata, 2016).

De este modo el objetivo del presente capítulo fue aislar e identificar hongos endófitos y epífitos de hojas de café (*Coffea arabica* L.) variedad Typica para contrastar el número de géneros, especies y comportamiento general de estos en hojas de cafetos infestados con roya y en hojas de plantas visiblemente sanas. La metodología seguida consistió en aislar, purificar e identificar a nivel morfológico cada hongo encontrado y únicamente a nivel molecular aquellos reportados en la literatura con posible efecto supresor. También se calculó la tasa de crecimiento de cada hongo y se realizó una prueba para verificar la fitopatogenicidad o inactividad de los organismos, con la finalidad de observar la

existencia de una relación entre periodo de crecimiento del hongo y su potencial para infectar plantas de café.

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1. Ubicación y descripción del área de muestreo

Se muestrearon plantas de café variedad Typica, establecidas en la parcela El Plan cuya ubicación se presenta en la Figura 3 del capítulo anterior.

3.1.2. Método de muestreo

El muestreo se realizó siguiendo las recomendaciones de Kawabata (2016) en un área de 100 m² con relieve y tipo de suelo visualmente homogéneo, donde se seleccionaron 20 plantas de café criollo (*Coffea arabica* L. var. Typica) por área: 10 sin signos de infección por roya (*H. vastatrix*) y 10 con síntomas severos de ésta. De cada planta seleccionada se conformó una muestra de seis hojas, las muestras recolectadas se guardaron en bolsas de papel debidamente identificadas para su transporte. Una vez en el laboratorio, las muestras que no fueron procesadas se guardaron en oscuridad a temperaturas de 4 °C ± 1 por no más de 72 horas.

3.1.3. Aislamiento e Identificación de hongos filosféricos de plantas de café.

Para el aislamiento de los microorganismos filosféricos se siguieron dos procedimientos, uno para microorganismos epífitos y otro para endófitos.

Los hongos epífitos se obtuvieron según la metodología descrita por Salas-Bastos (2010), es decir, se tomó una hoja por muestra y dos más como repetición, estas se lavaron individualmente durante tres minutos por agitación manual en vasos de precipitados conteniendo 150 mL de Buffer fosfato (6.75 g de fosfato de potasio monobásico y 8.75 g de fosfato de potasio di básico disueltos en 1 L de agua destilada) con pH de 6.8 ± 1 y esterilizado durante 15 min a 121 °C. Posteriormente cada hoja se retiró de los recipientes de lavado y se realizaron dos diluciones seriadas con la solución contenida en ellos; una

10^{-1} (100 μ L de la solución de lavado en un microtubo con 900 μ L de agua destilada estéril) y una dilución posterior 10^{-2} (100 μ L de la dilución 10^{-1} en un microtubo con 900 μ L de agua destilada estéril). De la solución concentrada así como de cada dilución se tomaron 20 μ L que se sembraron por vaciado en placas individuales de 25 mL que contenían medio de cultivo PDA + jugo de hojas de café (proporción 50/50 con respecto al volumen total del medio preparado).

Por otro lado, los hongos endófitos se obtuvieron en condiciones asépticas, a partir de las tres hojas restantes por muestra, estas se lavaron individualmente en vasos de precipitado con agua destilada estéril, después se transfirieron a otro vaso que contenía alcohol al 70%, se agitaron manualmente durante dos minutos, transcurrido este tiempo se realizó un tercer lavado en otro vaso que contenía una solución de hipoclorito de sodio al 1% por un periodo de dos minutos. Finalmente se eliminó la solución de hipoclorito y se efectuaron dos lavados con agua destilada estéril, cada uno con duración de un minuto.

Posterior a la desinfección de las hojas, se secaron con toalla de papel estéril, se eliminaron con bisturí las zonas necrosadas por el lavado y el resto se macero junto con 2 mL de Buffer PBS 1X (8 g de cloruro de sodio, 0.2 g de fosfato de potasio monobásico, 1.15 g de fosfato de potasio di básico y 0.2 g de cloruro de potasio disueltos en 1 L de agua destilada) con pH de 7.4 ± 1 y esterilizado durante 15 min a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$. Del extracto obtenido se obtuvieron dos diluciones seriadas (10^{-1} y 10^{-2}) y una alícuota concentrada (extracto sin diluir), de cada una de estas se tomaron 20 μ L que fueron sembrados por vaciado en placas individuales de 25 mL que contenían medio PDA + jugo de hojas de café, siguiendo a partir de este paso la misma metodología que en la obtención y aislamiento de hongos epífitos.

Las placas sembradas se sellaron e identificaron colocando la simbología *Cr* para la variedad *Typica*, *Ep* para cajas con hongos epífitos y *En* para los endófitos, estas letras fueron seguidas del número de muestra y repetición, después se incubaron a temperatura de $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ con iluminación natural durante cinco días, observando el crecimiento en las cajas cada 24 horas para detectar y aislar estructuras fúngicas.

El aislamiento se llevó a cabo en condiciones asépticas con ayuda de aguja hipodérmica, sembrando por separado sobre medio PDA + jugo de hojas de café estéril, una porción de cada colonia identificada visualmente por mostrar distinta coloración o patrón de crecimiento. Posterior a la siembra de aislamiento, las nuevas cajas obtenidas se incubaron a 21 ± 1 °C hasta obtener crecimiento uniforme sin contaminación por algún otro microorganismo distinto. Finalmente, se procedió a purificar mediante siembra en medio agar-agua y siguiendo la técnica de punta de hifa o cultivo monospórico cuando se encontraban esporas en el cultivo.

La identificación de los hongos aislados, se realizó con base en las características morfológicas macroscópicas de la colonia (textura, color velocidad de crecimiento, producción de exudados, pigmentos) y microscópicas (medida, forma y color de esporas, esporomas, hifas y otras estructuras observables en microscopio óptico a 40 X y 100 X, según lo recomendado por Crous *et al.*, 2009), en algunas especies fue posible identificar género y especie; sin embargo en otras únicamente se llegó hasta género. Solo los hongos reportados por la literatura como posibles supresores de roya (Haddad *et al.*, 2014; Jackson *et al.*, 2012), fueron enviados al laboratorio de Semillas en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo para la confirmación de la identificación mediante la secuenciación de las regiones ITS-1 e ITS-2, según lo recomendado por Vanegas Berrouet, Gutiérrez Sánchez y Marín Montoya (2014), una vez obtenidas las secuencias se procesaron en el programa CHROMAS PRO y se compararon con la base de datos del GeneBank usando el programa BLAST 2.8.

3.1.4. Evaluación de la tasa de crecimiento

Los hongos aislados y purificados fueron transferidos en condiciones asépticas a placas de 90 mm de diámetro que contenían medio de cultivo PDA + jugo de hojas de café. La siembra se llevó a cabo usando un sacabocado de 1 cm de diámetro con el cual se obtuvo un cilindro de medio de cultivo con el hongo purificado, este se colocó en la parte media una caja Petri nueva que contenía medio PDA + jugo de hojas de café y estreptomycin.

Las cajas Petri con las siembras permanecieron selladas a temperatura ambiente de 21 ± 1 °C y el crecimiento del micelio fue evaluado diariamente, hasta que éste cubrió la

totalidad de la caja. Para la medición del área de crecimiento se empleó el programa ImageJ 1.46 r[®].

Se observó crecimiento de cada hongo durante 10 días y se calculó la velocidad de crecimiento, de igual manera se promedió la diferencia de cada área de crecimiento de un día con respecto a la anterior para obtener la tasa de crecimiento.

Las tasas de crecimiento se sometieron a ANDEVA utilizando el software SAS[®] versión 9.0 (SAS Institute Inc. Campus Drive, Cary, North Caroline, USA).

3.1.5. Pruebas de patogenicidad de hongos aislados

Para determinar si los hongos aislados de la filosfera podrían infectar café, se realizaron inoculaciones en hojas de la misma especie con 20 µL de suspensión de esporas o micelio obtenido de los hongos aislados previamente.

La metodología seguida fue propuesta por Silva, Tozzi, Terrasan, & Bettiol (2012) y modificada por el personal del Laboratorio de Hongos Fitopatógenos, del Departamento de Parasitología Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo. Esta consistió en realizar una suspensión cuya concentración se ajustó a 1×10^{50} esporas usando una cámara de recuento Neubauer para ajustar la concentración.

De la suspensión ajustada se tomó una alícuota de 20 µL y se inoculó en la superficie de una hoja de café previamente esterilizada con la metodología propuesta por Salas-Bastos (2010) y colocada en una cámara húmeda. El proceso se repitió pero en esta ocasión inoculando por punción. De cada hongo se establecieron cuatro repeticiones de la metodología de inoculación en superficie y cuatro más de la de punción, así como cuatro hojas más inoculadas con agua como controles negativos.

Las hojas inoculadas por ambos métodos se incubaron a temperatura ambiente y después de 72 horas se evaluaron determinando el área infectada por el hongo con ayuda del programa ImageJ 1.46 r[®] y empleado los datos obtenidos para calcular el índice de severidad (S) con la siguiente fórmula:

$$S = \frac{\text{área de tejido enfermo} * 100}{\text{Área total evaluada}}$$

Los resultados fueron procesados usando análisis de varianza (ANDEVA) además de la prueba de comparación de medias Tukey con un nivel de significancia $p = 0.05$, utilizando el software SAS® versión 9.0 (SAS Institute Inc. Campus Drive, Cary, North Caroline, USA) y un diseño experimental completamente al azar.

3.2. RESULTADOS

3.2.1. Identificación de hongos y su distribución en hojas de café

Las especies de hongos aislados en hojas de café corresponden con las asociadas a este cultivo y reportadas en estudios anteriores por Silva, Tozzi, Terrasan, & Bettiol (2012), además la distribución así como la cantidad de epífitos y endófitos en las plantas estudiadas se relaciona de forma indirecta con las condiciones ambientales y directamente con las heridas causadas por la roya (*H. vastatrix*) que propicio la entrada de microorganismos a la hoja infectada (Agrios, 2002; Salas-Bastos, 2010), otro factor determinante en la presencia de ciertos géneros de hongos es el debilitamiento nutrimental que la roya causa debido a la defoliación que sufren las plantas infectadas, haciéndola susceptible a la infección de otros organismos.

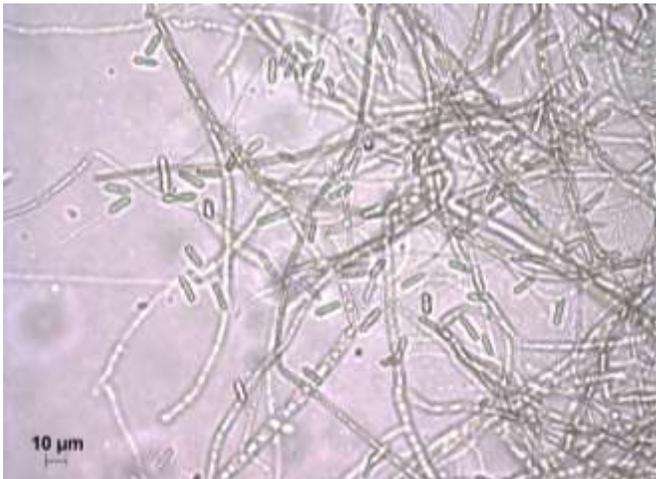
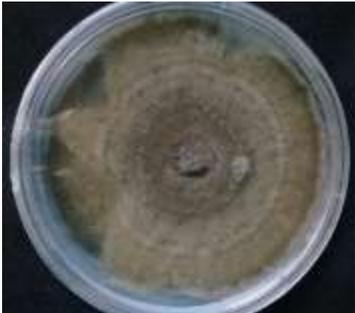
Se aislaron nueve hongos epífitos y dos endófitos en hojas de café sin signos de infección por roya, mientras que en hojas con signos de infección se identificaron siete epífitos y cinco endófitos (Cuadro 14).

En orden de abundancia, se aislaron e identificaron 10 especies del género *Colletotrichum*, seguido de tres especies de *Fusarium*. El resto de hongos encontrados pertenecían a los géneros *Lecanicillium*, *Neopestalotiopsis*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Curvularia* y *Botrytis*, resultando un total de ocho géneros identificados con 20 especies distintas (Cuadro 15).

Cuadro 14. Géneros de hongos presentes en hojas de café (*C. arabica* L.) variedad Typica con y sin signos de infección por roya (*H. vastatrix*).

Estatus de la planta	Hongo epifito	Hongo endófito
Sin signos de infección	<i>Colletotrichum</i> sp. 1 <i>Colletotrichum</i> sp. 3 <i>Colletotrichum</i> sp. 5 <i>Colletotrichum gloesporoides</i> <i>Colletotrichum siamense</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Neopestalotiopsis</i> sp. <i>Aspergillus niger</i>	<i>Lecanicillium</i> sp. <i>Fusarium equiseti</i>
Con signos de infección	<i>Colletotrichum</i> sp. 1 <i>Colletotrichum</i> sp. 2 <i>Colletotrichum</i> sp. 3 <i>Colletotrichum</i> sp. 4 <i>Curvularia akaii</i> <i>Penicillium christenseniae</i> <i>Botrytis</i> sp.	 <i>Colletotrichum</i> sp. 6 <i>Colletotrichum</i> sp. 7 <i>Colletotrichum truncatum</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium equiseti</i>

Cuadro 15. Hongos aislados de hojas de café (*C. arabica* L.) variedad Typica.

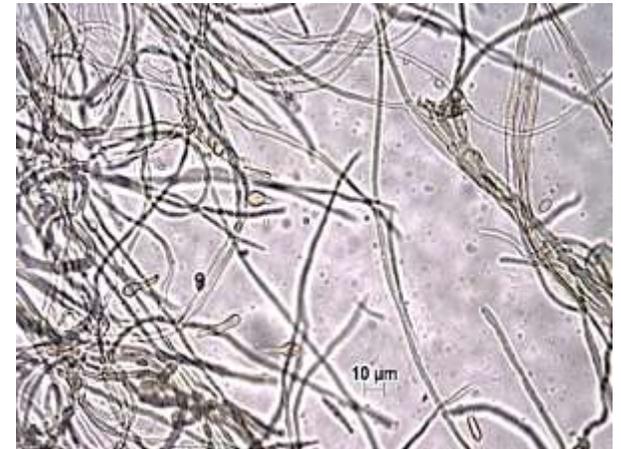
ID	Nombre	Descripción	Colonia en medio PDA	Estructuras representativas
1112	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	<p>Colonia: micelio aéreo color blanco que con el tiempo se torna de color grisaseo o verde opaco.</p> <p>Células conidiogénicas: fialides ausentes, cilíndricas, pared delgada, medidas 20 µm X 5 µm</p> <p>Conidios: células individuales cilíndricas, lisas, hialinas, medidas 11.6 µm X 5 µm y otras esféricas lisas, refringentes, ambas hialinas, medidas promedio de 5 µm de diámetro.</p>		
		<p>Colonia: micelio algodonoso, color marrón que cambia a negro cuando madura, crecimiento concéntrico.</p> <p>Conidióforos: erectos, no ramificados, con célula terminal conidiogénica, crecimiento simpodial y orificio en el extremo superior.</p> <p>Conidio: elipsoide, ligeramente curvada, con dos a cuatro septos, color marrón, con medidas 28.5 µm X 12 µm.</p>		

EPÍFITOS

1131

Collectotrichum sp. 2

Colonia: micelio aéreo color gris que con el tiempo se torna de color más oscuro, su crecimiento es en círculos concéntricos. Solo se observa micelio con crecimiento linear, hialino con formaciones circulares.



1211

Penicillium christenseniae

Colonias: micelio color amarillo que cuando madura se convierte en verde.

Conidiofros: surgen del medio de cultivo, con cuatro verticilos, estípites lisos con medidas de 400 µm x 2.5 µm. Ramificaciones divergentes, métula cilíndrica de 8 µm X 2 µm, con 4- 7 fialides en forma de botella con medidas de 7 µm X 2 µm.

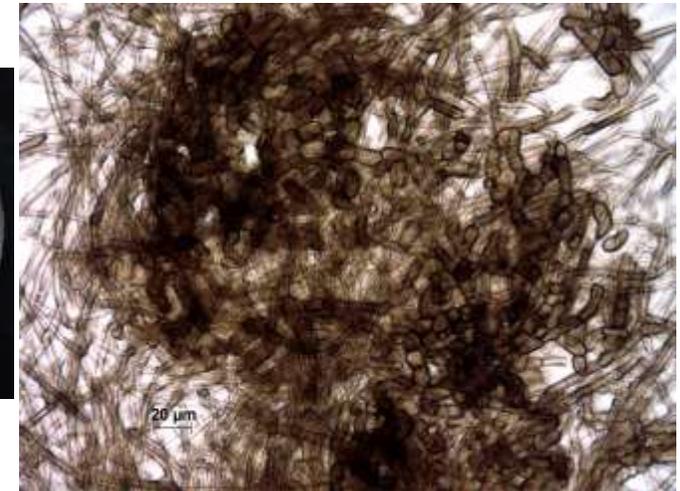
Conidios: producidos en cadena, globosos, 5 µm de diámetro.



1311

Colletotrichum sp. 3

Colonia: micelio aéreo color blanco que con el tiempo se torna de color grisaseo, el crecimiento miceliar es en círculos concéntricos. Solo se observa micelio septado, crecimiento curvado, color marrón claro con formaciones circulares.



1411

Colletotrichum sp. 4

Colonia: micelio aéreo creciendo en masa, color blanco que con el tiempo se torna de color grisaseo. Solo se observa micelio septado, crecimiento curvado, hialino.



2111

Colletotrichum sp. 5

Colonia: micelio aéreo color gris claro que con el tiempo se torna de color negro, de crecimiento en masa.

Células conidiogénicas: fialides ausentes, cilíndricas, pared delgada, medidas 15.3 μm X 5 μm

Conidios: células individuales cilíndricas, corrugadas de medidas 15 μm X 5 μm y otras elipsoidales lisas, refringentes, ambas hialinas, medidas promedio de 11.6 X 11 μm .



2112

*Colletotrichum
gloesporoides*

Colonia: micelio aéreo color blanco que con el tiempo se torna de color amarillento, de rápido crecimiento en forma de hilos.

Conidios: células individuales elipsoidales, hialinas, con un punto refractivo en el centro, medidas promedio de 21 μm X 6 μm . En masa forman gotas rojizas que se observan en la colonia.



2211

Fusarium solani

Colonia: micelio algodonoso color rosa blanquecino de rápido crecimiento.

Conidióforos: compactos, escasamente ramificados y esporocarpio sosteniendo macroconidios en masa.

Conidios: microconidios elipsoidales, ligeramente truncados en la base, medidas promedio de $13\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$, macroconidios fusiformes, bisepados célula basal pedicelada, paredes delgadas y medidas promedio de $30\ \mu\text{m} \times 6.6\ \mu\text{m}$



2311

*Colletotrichum
siamense*

Colonia: micelio aéreo color blanco que con el tiempo se torna de color grisaseo, de crecimiento en masa.

Células conidiogénicas: fialides ausentes, cilíndricas, pared delgada, medidas $15.3\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$

Conidios: células individuales cilíndricas, corrugadas de medidas $15\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ y otras elipsoidales lisas, refringentes, ambas hialinas, medidas promedio de $11.6 \times 11\ \mu\text{m}$.



2411

Neopestalotiopsis sp.

Colonia: micelio aéreo pálido de color miel pálido en la superficie con conidiomas gregarios negros.

No se observó formación de conidios en medio PDA



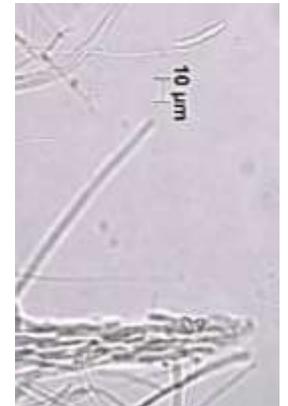
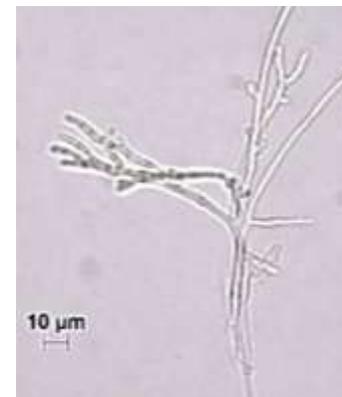
2412

Fusarium
graminearum
Schwabe 1839

Colonia: micelio algodonoso color rosa blanquecino.

Conidióforos: compactos, escasamente ramificados y esporocarpio sosteniendo macroconidios en masa.

Conidios: microconidios elipsoidales, ligeramente truncados en la base, medidas promedio de 8 µm X 2 µm, macroconidios fusiformes, biseptados célula basal pedicelada, paredes delgadas y medidas promedio de 18 µm X 3.4 µm.



4212

Aspergillus niger Tiegh

Colonias: mcelio basal blanco con superficie granulosa color blanco polvoso que cambian a negro cuando la colonia envejece.

Conidioporo: nacen de células Conidióforos: surgen de células basales largas, de pared gruesa, en su mayoría de color marrón, a veces ramificadas, medidas de 1.5 a 3.0 mm de altura.

Fialides: en forma de botella con medidas de 7 μm X 3 μm .

Conidios en cabezas grandes, en su mayoría globosas, rugosas irregularmente, 4 a 5 μm de diámetro, uninucleadas.



1122

ENDÓFITOS

Lecanicillium sp.

Colonia: algodonosa, color blanco de lento crecimiento.

Conidios:



2112

Colletotrichum sp. 6

Colonia: micelio aéreo creciendo en masa, color verde opaco que con el tiempo se torna de color gris intenso

Células conidiogénicas: fialides ausentes, cilíndricas, pared delgada, medidas 15.3 μm X 5 μm

Conidios: células individuales cilíndricas, corrugadas de medidas 15 μm X 5 μm y otras elipsoidales lisas, refringentes, ambas hialinas, medidas promedio de 11.6 X 11 μm .



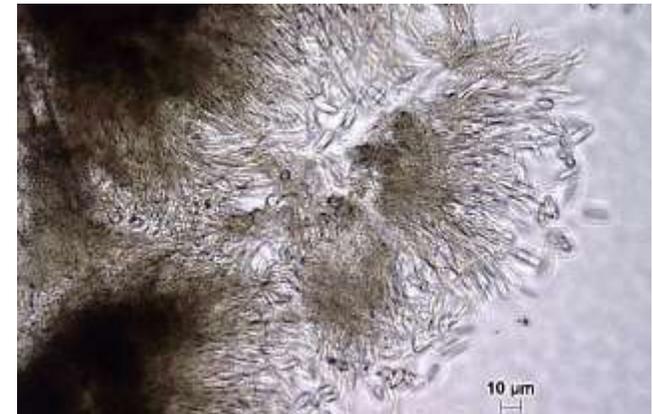
2211

Colletotrichum truncatum (Schwein.) Andrus & W.D. Moore, 1935

Colonia: micelio aéreo blanco, con aspecto algodonoso, de crecimiento regular en masa.

Células conidiogénicas: células cilíndricas con medidas de 22 μm X 5 μm .

Conidios: células individuales cilíndricas, hialinas, lisas, medidas 13.3 μm X 5 μm .



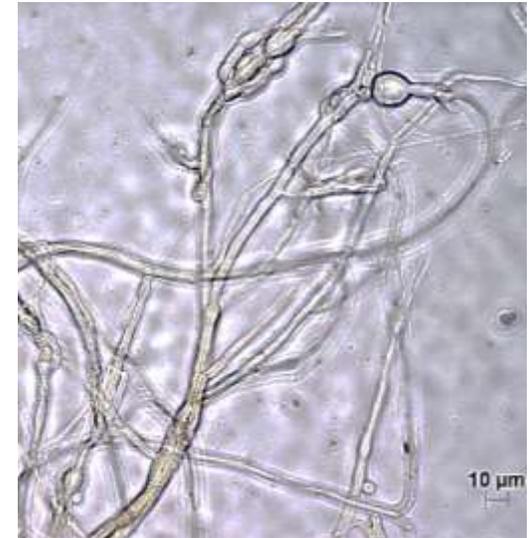
2311

*Fusarium
graminearum*
Schwabe 1839

Colonias: micelio color rosa amarillento

Conidióforos: compactos, escasamente ramificados, en forma de botella y esporocarpio sosteniendo macroconidios en masa.

Conidios: microconidios elipsoidales, ligeramente truncados en la base, medidas promedio de $17.25\ \mu\text{m} \times 5.1\ \mu\text{m}$, macroconidios fusiformes, con seis septos, célula basal pedicelada, paredes delgadas y medidas promedio de $41.09\ \mu\text{m} \times 6.1\ \mu\text{m}$.



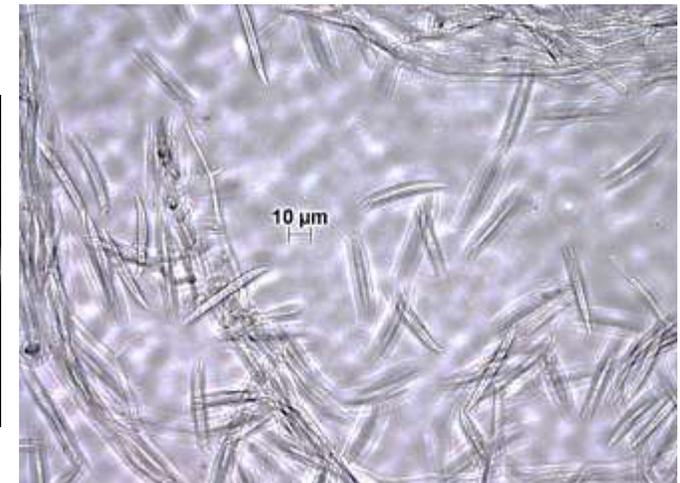
2312

Fusarium equiseti
(Corda) Sacc. 1886

Colonias: micelio algodonoso color rosa blanquecino.

Conidióforos: compactos, y pequeños ($10\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$) escasamente ramificados, en forma de botella.

Conidios: microconidios no visibles, macroconidios fusiformes, con ocho septos, célula basal pedicelada, paredes delgadas y medidas promedio de $39.5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$.



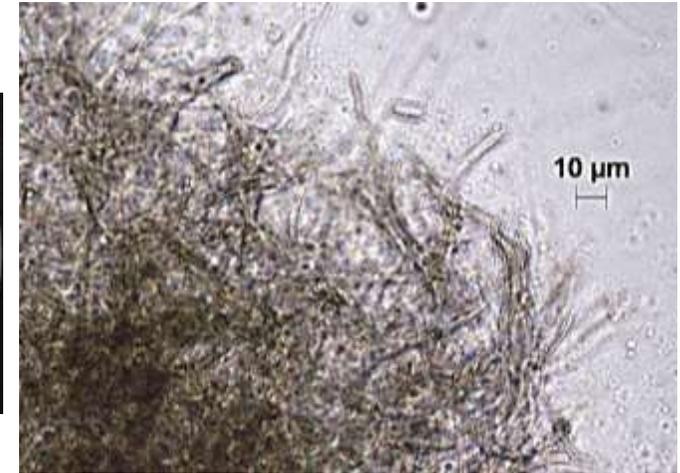
2411

Colletotrichum sp. 7

Colonia: micelio aéreo color blanco que con el tiempo se torna de color gris, con crecimiento micelial en masa.

Células conidiogénicas: fialides ausentes, cilíndricas, pared delgada, medidas 15.3 μm X 5 μm

Conidios: células individuales cilíndricas, corrugadas de medidas 15 μm X 5 μm y otras elipsoidales lisas, refringentes, ambas hialinas, medidas promedio de 11.6 X 11 μm .



De acuerdo a los resultados de las investigaciones de Haddad, Saraiva, Mizubuti, Romeiro, & Maffia, (2014), Jackson, Skillman, & Vandermeer (2012) y Silva, Tozzi, Terrasan, & Bettiol (2012) algunos géneros de *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, son capaces de inhibir la germinación de esporas de *H. vastatrix*, por esta razón se secuenciaron los hongos aislados cuyas características morfológicas indicaban pertenecer a alguno de estos géneros, también se enviaron a secuenciar algunos otros donde existía incertidumbre de su identidad. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 16.

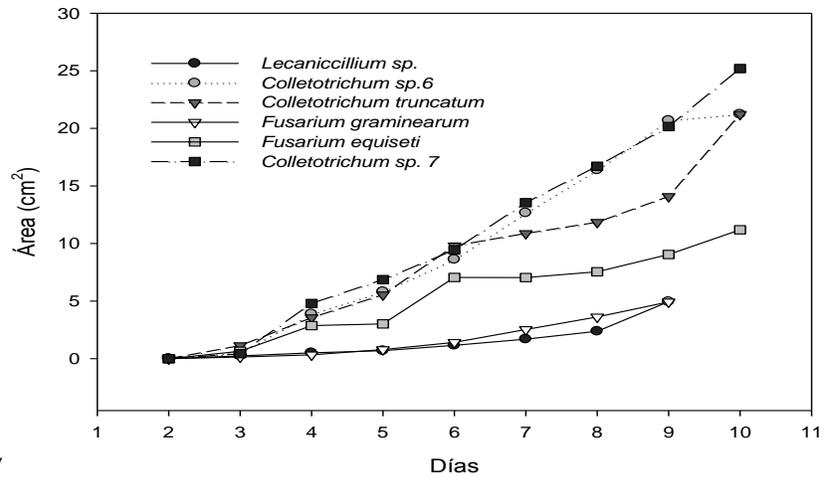
Cuadro 16. Identidad y porcentaje de similitud según la base de datos del GenBank (2019) de algunos hongos filoféricos aislados de café (*C. arabica* L. var. *Typica*) e identificados con los marcadores ITS-1 e ITS-2.

Organismo*	e	% Id	Coincidencias en NCBI	GenBank b
<i>Colletotrichum truncatum</i>	0	99	<i>Colletotrichum truncatum</i> <i>Colletotrichum siamense</i>	KY799040.1 MG913611.1
<i>Fusarium equiseti</i>	0	100	<i>Fusarium equiseti</i> <i>Fusarium</i> sp.	<u>MN133053.1</u> MK050646.1
<i>Curvularia akaii</i>	0	98	<i>Curvularia akaii</i> <i>Penicillium expansum</i>	HF934922.1 <u>MK461924.1</u>
<i>Penicillium christenseniae</i>	0	100	<i>Penicillium crustosum</i> <i>Penicillium christenseniae</i>	<u>MN007134.1</u> <u>MK267452.1</u>
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	0	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Colletotrichum siamense</i>	MF981126.1 LC260489.1
<i>Colletotrichum siamense</i>	0	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Neopestalotiopsis</i> sp.	MK514517.1 <u>MK256884.1</u>
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	0	100	<i>Pestalotiopsis</i> sp. <i>N. clavispora</i>	MN180879.1 MK278906.1
<i>Fusarium graminearum</i>	0	100	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium</i> sp.	<u>MK079920.1</u> MN385442.1
<i>Aspergillus niger</i>	0	100	<i>Aspergillus costaricensis</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus tubingensis</i>	<u>MK910049.1</u> <u>MG976495.1</u> MG857644.1

*De acuerdo a la caracterización macro y micromorfológica de organismos, e: probabilidad de error en la identificación, %Id: porcentaje de similitud entre secuencias; GenBank b: número de accesión en GenBank de secuencias con mayor similitud con respecto a las muestras del presente trabajo.

3.2.2. Tasa de crecimiento

Al evaluar la velocidad de crecimiento de los hongos se pudo observar que los endófitos cubrieron la caja Petri en un periodo de nueve a diez días, con una tasa de crecimiento



promedio de 2.5 cm² por día (

Figura 10), mientras que el periodo de crecimiento de los epífitos vario desde cuatro (tasa de crecimiento de 6.2 cm² por día) hasta 11 días (tasa de crecimiento promedio de 2.3 cm² por día) (Figura 11).

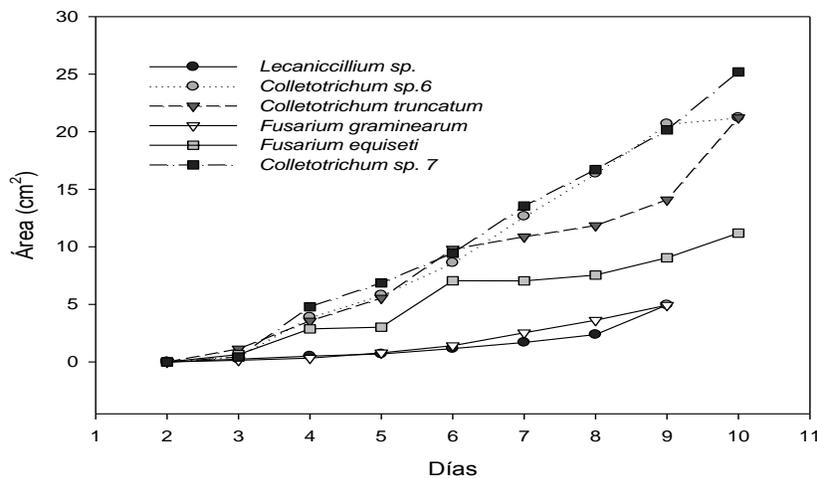


Figura 10. Tasa de crecimiento de hongo filoféricos endófitos aislados de café (*C. arabica* L.) Var. *Typica*.

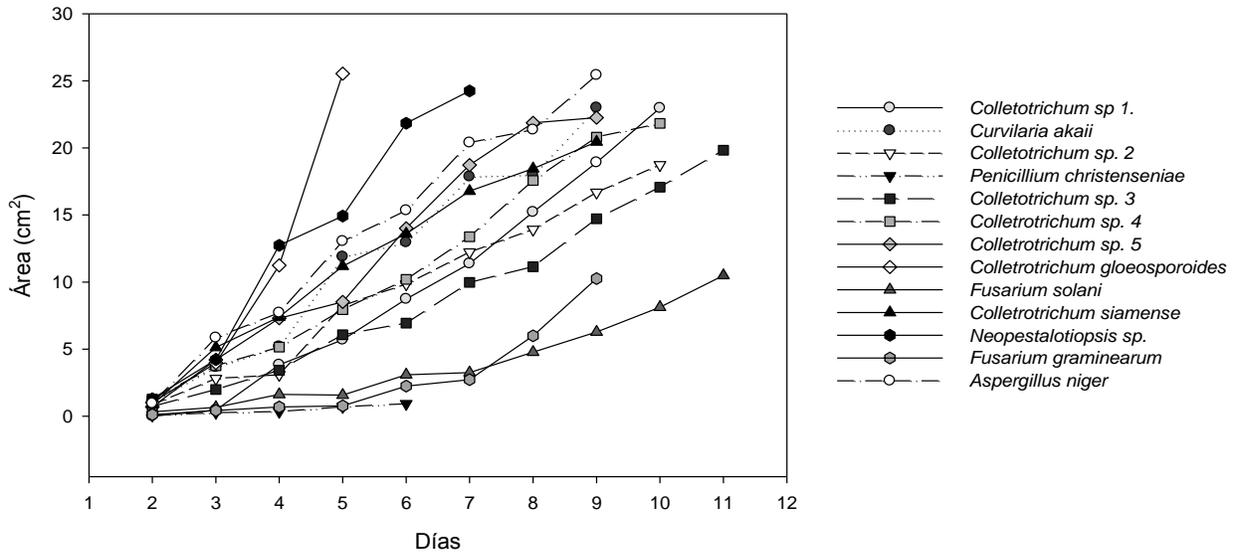


Figura 11. Tasa de crecimiento de hongo filoféricos epífitos aislados de café (*C. arabica* L.) Var. Typica.

La velocidad con la que un microorganismo se desarrolla, los pigmentos que libera, así como la morfología general de la colonia *in vitro* son indicadores importantes para su identificación pero en algunas ocasiones también dan indicios de su comportamiento como fitopatógenos, epífitos o antagonistas (Uzunovic y Webber, 1988), sin embargo, para el caso de los hongos, estas características varían de acuerdo al medio empleado y el organismo evaluado además del lugar donde fueron aislados, por lo que a diferencia de las bacterias, una tasa de crecimiento lenta no necesariamente indica fitopatogenicidad (Tavera- Montero *et al.*, 2010). Para determinar este comportamiento es necesario realizar pruebas de inoculación en el hospedero bajo condiciones controladas, evaluando el avance de la infección.

En los resultados obtenidos es posible observar que aquellos hongos que pertenecen al mismo género, tienden a crecer en tasas similares, por ejemplo; los hongos del género *Colletotrichum* se desarrollan a una tasa de crecimiento promedio de 2.2 cm² por día, mientras que los pertenecientes al género *Fusarium* con tasas promedio de 1 cm² por día.

3.2.3. Patogenicidad de hongos filosféricos de café

Del total de los hongos aislados, 10 de ellos corresponden a alguna especie del género *Colletotrichum*, la causa de esto es de naturaleza ambiental, pues al realizar la colecta de las hojas (cinco de noviembre del 2017), la huerta presentaba poca ventilación, el rango de temperaturas diarias era de 5 a 20 °C, con humedad relativa promedio de 70 % (Sistema meteorológico Nacional, 2019). Estas condiciones ambientales mantienen al hongo latente, por lo que las lesiones de antracnosis en hojas y frutos de café no estarán presentes hasta que la temperatura se encuentre entre 21-24 °C (Luciano *et al.*, 2009) y la humedad relativa \geq 80% (Huerta-Palacios, Holguín-Meléndez, Benítez-Camilo, & Toledo-Arreola, 2009).

Cuando se realizó la prueba de patogenicidad se encontró que todos los hongos del género *Colletotrichum*, excepto *Colletotrichum* sp. 4 y *C. truncatum* (no se presenta imagen del daño de este último) son capaces de infectar cuando se inoculan por punción, así como *Colletotrichum* sp. 1, *Colletotrichum* sp. 3 (ambos epífitos) y *Colletotrichum* sp. 6 (endófito) cuando se inoculan superficialmente (Figura 12 y Figura 13). Las hojas inoculadas por punción con *Colletotrichum* sp. 6 y sp. 1 fueron las que mayor severidad presentaron (32.22 %).

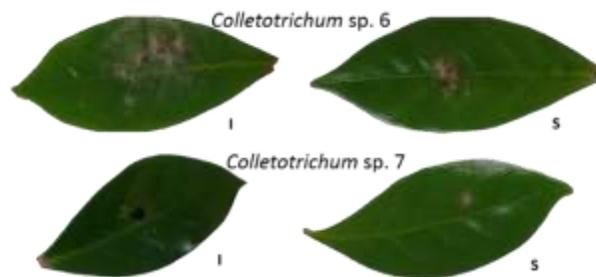


Figura 12. Prueba de patogenicidad en hojas de café (*C. arabica* L. var. Typica), inoculadas con diferentes especies endófitas de *Colletotrichum*; I Inoculación por punción, S inoculación en superficie.

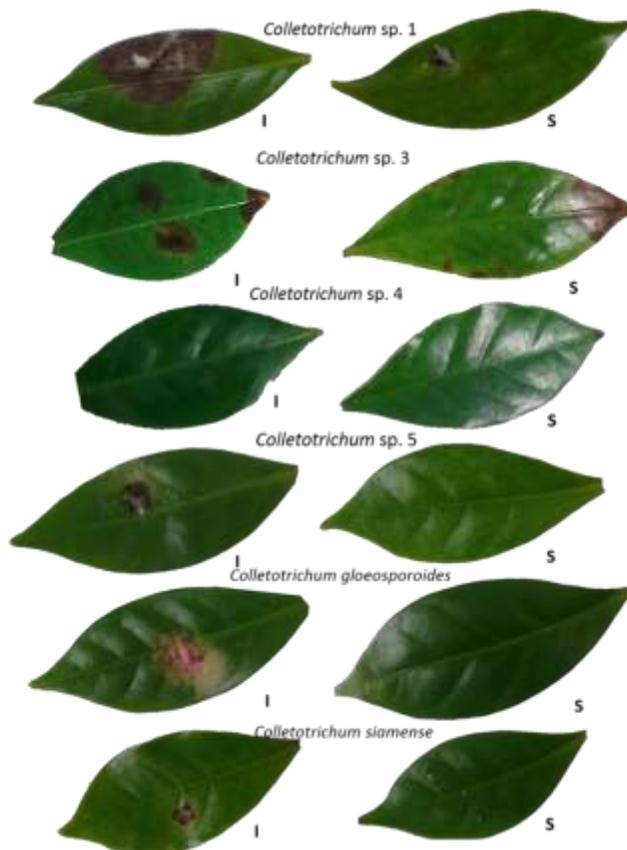


Figura 13. Prueba de patogenicidad en hojas de café (*C. arabica* L. var. *Typica*), inoculadas con diferentes especies epifitas de *Colletotrichum*; I Inoculación por punción, S inoculación en superficie.

En cuanto a los hongos aislados pertenecientes al género *Fusarium* (Figura 14), se encontró que *F. equiseti* es incapaz de producir signos de infección bajo condiciones controladas, además de que en las hojas colectadas tampoco se observaron lesiones de este hongo, esto indica que el cultivo no se encuentra dentro del rango de hospedantes del patógeno, lo cual concuerda con la ausencia de registros del patógeno causando enfermedades en café.

Por el contrario *F. solani* solo infectó cuando se inoculó por punción, además de que se observó necrosamiento en las puntas de las hojas inoculadas por ambos métodos al cuarto día de evaluación. Los mecanismos y condiciones necesarias para que *F. solani* infecte café, son parecidos a los que fueron expuestas las hojas en cámaras húmedas (Muengula-manyi, Ngombo-nzokwani, & Kiamana-mantata, 2017) por lo que después del

periodo de incubación, el micelio se desarrolló hasta zonas donde la inoculación no tuvo contacto directo y los signos aparecieron.

Al evaluar a *F. graminearum*, se observó mayor severidad de ataque, pues el necrosamiento de las hojas expuestas a este organismo durante cuatro días, fue de 56.8 % ($p= 0.05$) cuando se inoculó por punción y 96.8 % ($p= 0.05$) con la técnica de superficie (Figura 14 y 15).

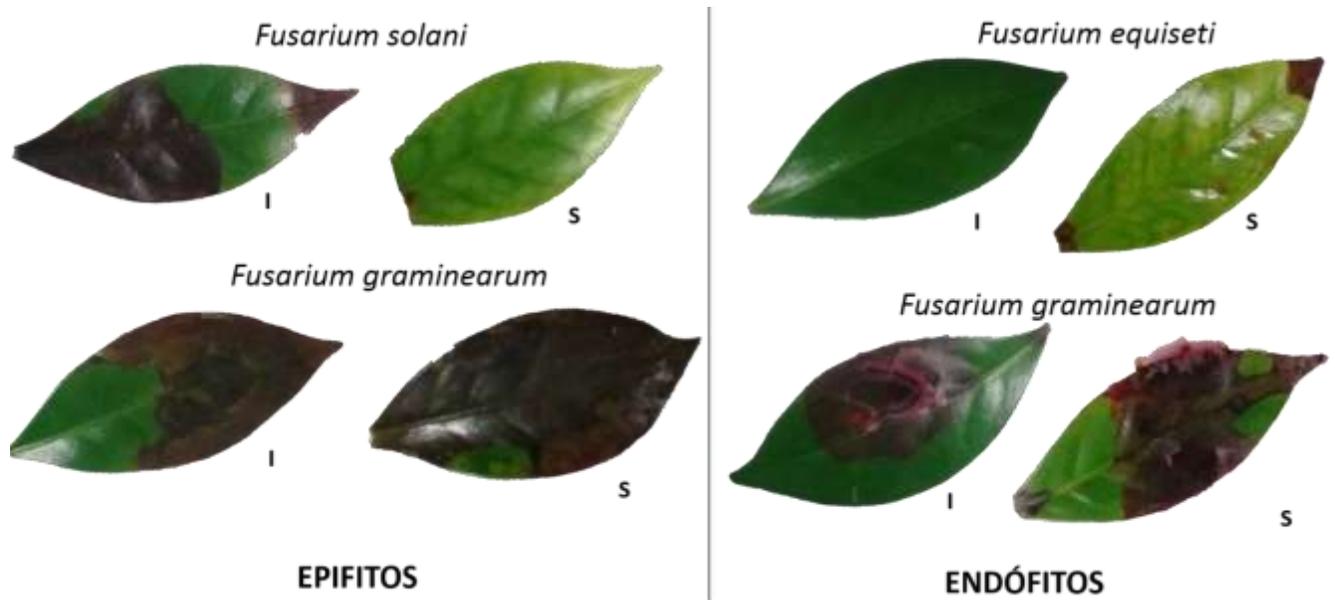


Figura 14. Prueba de patogenicidad en hojas de café (*C. arabica* L. var. *Typica*) inoculadas con diferentes especies de *Fusarium* aislados de la superficie (epífitos) y dentro de hojas (endófitos); I Inoculación por punción, S inoculación en superficie.

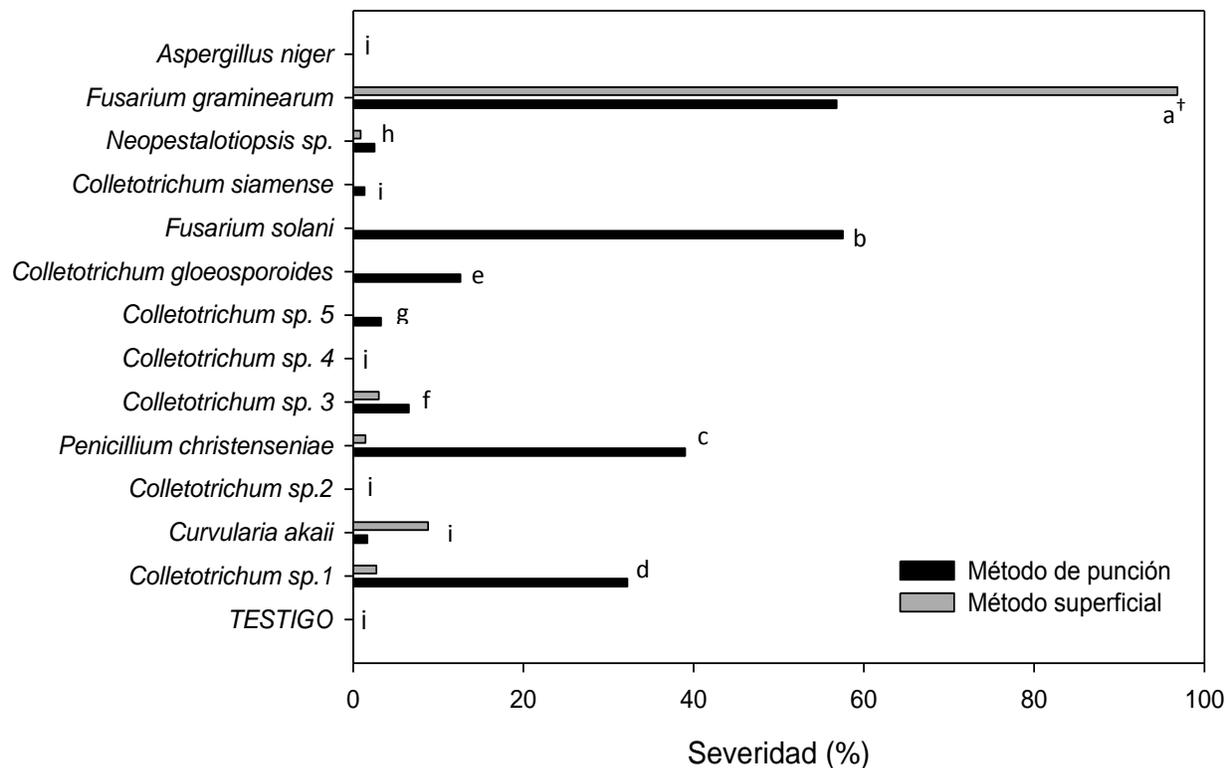


Figura 15. Severidad observada en hojas de café (*C. arabica* L.) variedad Typica, al inocular hongos epífitos por dos métodos. [†]Grupos con la misma letra por columna no representan diferencia significativa DMSH ($p=0.05$). Test de comparación de medias Tukey.

Los hongos restantes se comportaron como patógenos al inocularlos por uno o ambos métodos, indicando que bajo condiciones ambientales adecuadas, o bien cuando la planta sufra daño mecánico, tienen potencial para infectar y pasar de endófitos a patógenos, a excepción de *Lecanicillium* sp. y *Aspergillus niger* los cuales no provocaron signos de infección cuando se inocularon por ambos métodos (Figura 15, 16 y 17).

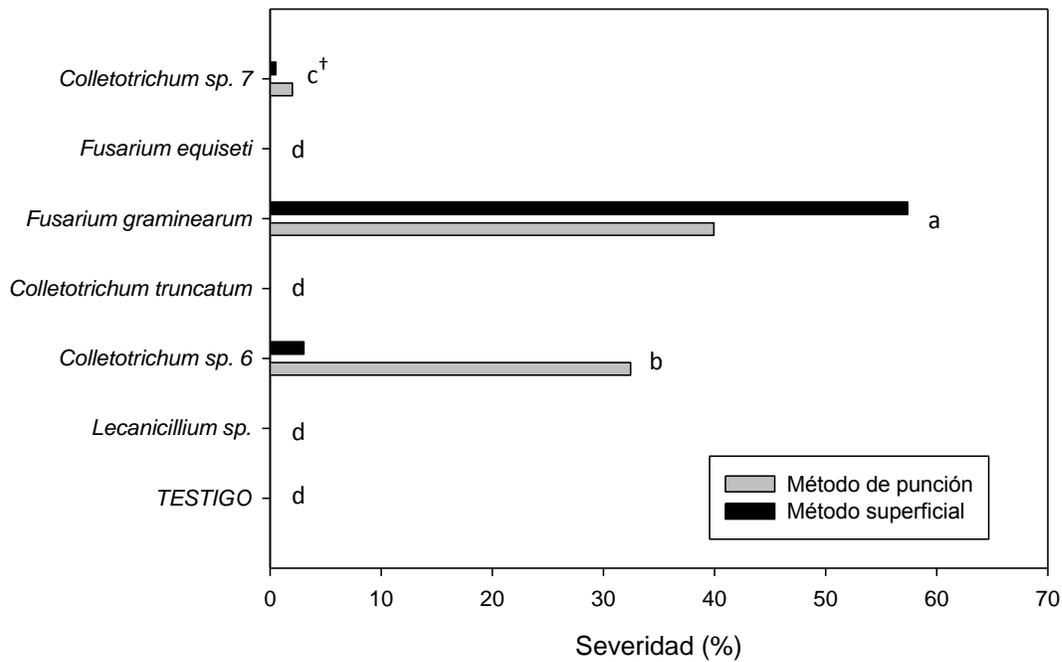


Figura 16. Severidad observada en hojas de café (*C. arabica* L.) variedad Typica, al inocular hongos endófitos por dos métodos. [†]Grupos con la misma letra no representan diferencia significativa DMSH ($p=0.05$). Test de comparación de medias Tukey.

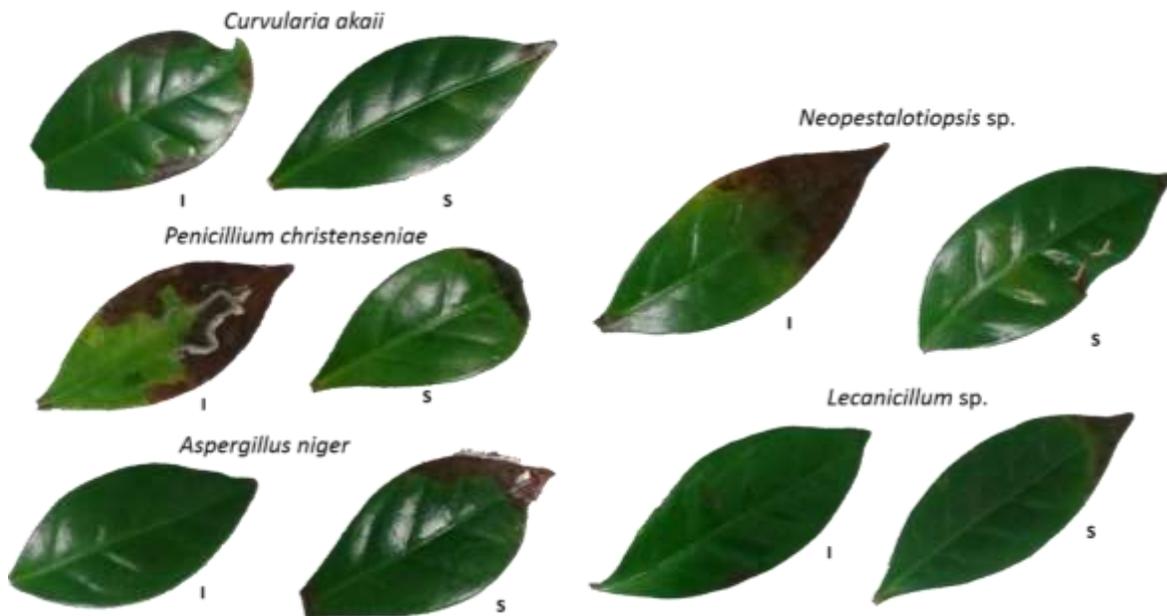


Figura 17. Prueba de patogenicidad en hojas de café (*C. arabica* L. var. Typica) inoculadas con diferentes especies hongos aislados de la superficie (epífitos) y dentro de hojas (endófitos); I Inoculación por punción, S inoculación en superficie.

Debido a que los hongos comúnmente aislados en hojas de café fueron los de los géneros *Colletotrichum* y *Fusarium*, y además de que *Penicillium*, *Aspergillus* y *Lecanicillium* se han empleado en investigaciones anteriores para biocontrol de roya anaranjada (Vaast *et al.*, 1997; Jackson, Skillman, & Vandermeer, 2012; Silva, Tozzi, Terrasan, & Bettioli, 2012; Haddad, Saraiva, Mizubuti, Romeiro, & Maffia, 2014), en el siguiente capítulo se presenta la evaluación de la interacción de estos géneros con los hongos endomicorrízicos que mostraron ser predominantes en cafetos sin signos de roya e infectados con este patógeno, y su efecto en el desarrollo de cafetos.

3.3. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que la abundancia de especies de hongos aislados de la superficie de hojas de café, referidos como epífitos, es mayor que los encontrados en el interior (endófitos), mientras que la diversidad fue mayor en hojas infectadas con roya (*H. vastatrix*).

Se identificaron un total de ocho géneros con 20 especies distintas de hongos, el más común fue *Colletotrichum* seguido de *Fusarium*, el primero con 10 especies y el segundo con tres. El resto de hongos encontrados pertenecían a los géneros *Lecanicillium*, *Neopestalotiopsis*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Curvularia* y *Botrytis*.

La tasa de crecimiento promedio de los hongos endófitos fue de 2.5 cm² por día, mientras que el periodo de crecimiento de los epífitos vario de 6.2 a 2.3 cm² por día, no existiendo una relación entre esta variables.

Al evaluar la patogenicidad se observó que la mayoría de hongos tienen capacidad patogénica, siendo *Fusarium graminearum* el que mayor severidad mostró al incubarse por cuatro días en cámara húmeda (56.8 % cuando se inoculó por punción y 96.8 % con la técnica de superficie). Mientras que *F. equiseti*, *Lecanicillium* sp., *Aspergillus niger*, *Colletotrichum* sp. 4 y *C. truncatum* no provocaron signos de infección cuando se inocularon por ambos métodos.

CAPITULO IV: INTERACCIÓN DE HONGOS ENDOMICORRIZICOS Y HONGOS FILOSFÉRICOS

La asociación simbiótica entre microorganismos rizosféricos (como los hongos micorrízicos) así como aquellas que se establecen en la filosfera, se han estudiado por separado y han mostrado tener efectos positivos al inhibir el desarrollo de patógenos (Vaast *et al.*, 1997; Jackson, Skillman, & Vandermeer, 2012; Silva, Tozzi, Terrasan, & Bettiol, 2012; Haddad, Saraiva, Mizubuti, Romeiro, & Maffia, 2014), también se ha comprobado que mejoran la eficiencia de las plantas para aprovechar nutrimentos, agua o capacidades para enfrentar condiciones ambientales abióticas desfavorables. Sin embargo son escasos los estudios en los que se considere a las plantas como un organismo completo, donde los microorganismos de la filósfera interactúan indirectamente con los de la rizósfera.

Es bien conocido que una planta en simbiosis con hongos micorrízicos arbusculares mejora su absorción y aprovechamiento de nutrimentos como nitrógeno y fósforo (Artursson *et al.*, 2006; Hashem *et al.*, 2016), además que esta condición genera cambios en la fisiología de la planta (Filho *et al.*, 2016) que le permite modificar también su morfología y por lo tanto, indirectamente le facilita establecer relaciones con otros microorganismos filosféricos que le brindaran protección contra patógenos foliares. También se sabe que existen microorganismos, como *Bacillus*, *Pseudomona* y *Brevibacillus* que promueven la síntesis de ácido indo acético y ácido giberélico (AG₃). Estos microorganismos son capaces de colonizar tanto hojas como raíces y está documentado que su presencia facilita y potencia la asociación de la planta con micorrizas como *Glomus mosseae* (Panneerselvam *et al.*, 2012).

En café se han evaluado las inoculaciones con microorganismos filosféricos como *Lecanicullium lecani* observándose resultados favorables pero cíclicos en el control de roya (Jackson, Skillman, & Vandermeer, 2012). También se han realizado inoculaciones con hongos micorrízicos arbusculares, presentándose mejora en las características fisiológicas de las plantas y resistencia a patógenos edáficos (Vaast *et al.*, 1997; Trejo-Aguilar, 2013), sin embargo no se tiene registro de evaluaciones donde se observen las interacciones entre hongos endomicorrízicos y organismos filosféricos patógenos y

endosimbiontes cuando se inoculan experimentalmente en cafetos, por esta razón en este capítulo se describirá la metodología para evaluar el desempeño agronómico y la incidencia de enfermedades en plantas de café de la variedad *Typica*, provenientes de semillas inoculadas con consorcios de hongos micorrízicos nativos y posteriormente con microorganismos filosféricos.

4.1. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1. Obtención de cafetos e inoculación con hongos endomicorrízicos

Los cafetos se obtuvieron seleccionando 200 semillas de café variedad *Typica* de la cosecha de diciembre en el año 2018. Antes de la siembra, las semillas se remojaron por 48 horas en agua destilada estéril a temperatura ambiente y se eliminó el pergamino, posteriormente se sembraron en macetas (una semilla por maceta) que contenían dos litros de arena de río estéril y se cubrieron con inoculo (300 g por maceta) obtenido tras un proceso de multiplicación a partir de muestras de suelo de huertas de Ixhuatlan, Veracruz (ver proceso en capítulo II). 100 de las macetas sembradas con semillas de café se inocularon con un consorcio donde los géneros *Gigaspora* sp. y *Acaulospora* sp. fueron dominantes y las macetas restantes (100 macetas) con consorcio donde los géneros predominantes fueron *Rhizophagus* sp., *Clareideoglous* sp, *Septoglomus* y *Glomus* sp.

Una vez concluida la siembra, se aplicó un riego con agua destilada estéril y se cubrió con polietileno transparente la parte superior de las macetas para conservar la humedad y evitar contaminación con otros hongos micorrízicos. Cuando trascurrieron 25 a 30 días después de la siembra emergieron los cafetos, por lo que el polietileno se perforó para permitir la salida de la plántula, el riego se mantuvo cada ocho días con agua destilada estéril hasta 15 días después de la emergencia, posteriormente se regaron con 500 mL agua destilada estéril + 50 mL solución Log Ashton por planta, posteriormente, cuando apareció el primer par de hojas verdaderas el riego continuo siendo quincenal pero ahora con 500 mL agua destilada estéril + 100 mL solución Log Ashton por planta (Yépez-Hernández *et al.*, 2016).

Para estudiar la dinámica de asociación de los hongos micorrízicos con las plantas de café se realizaron dos evaluaciones, la primera cuando los cafetos presentaron cuatro hojas verdaderas (dos cruces) y antes de la inoculación con hongos filosféricos, esto para corroborar que los consorcios se mantuvieran y colonizaran la raíz. La segunda evaluación se llevó a cabo 30 días después de la primera, cuando el cafeto tenía seis hojas verdaderas (tres cruces) y ya se habían inoculado hongos filosféricos, en esta caso con la intención de observar si los consorcios continuaban colonizando raíz en la misma proporción que en la primer evaluación.

En cada evaluación se realizaron dos muestreos, uno para clareo-tinción de estructuras de HMA en raíz y el segundo para recolección de esporas en suelo. El primer muestreo se llevó a cabo colectando 1 g de raíces por maceta, sin cosechar la planta, únicamente se tomó una muestra de suelo cerca del tallo de ésta, se separaron las raíces y se devolvió el suelo a la maceta. Cabe mencionar que este muestreo se hizo sin suspensión de riego para promover la presencia de vesículas o arbusculos, con la finalidad evaluar porcentaje de colonización.

El segundo muestreo se realizó 15 días después del primero y tuvo la finalidad de coleccionar e identificar morfológicamente esporas de los HMA. Para promover esporulación, 10 días antes del segundo muestreo se suspendió el riego y una vez transcurrido este tiempo se muestrearon 50 g de suelo por maceta para realizar conteo de esporas e identificación de géneros.

Las evaluaciones solo incluyeron los datos obtenidos de hongos micorrízicos arbusculares y se establecieron con un diseño de experimento completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento (Cuadro 17). Los resultados de porcentaje de colonización fueron transformados según las recomendaciones de Alves *et al.* (2010) y, al igual que los datos obtenidos de densidad de esporas, fueron procesados usando análisis de varianza (ANOVA) además de la prueba de comparación de medias Tukey con un nivel de significancia $p= 0.05$, utilizando el software SAS® versión 9.0 (SAS Institute Inc. Campus Drive, Cary, North Caroline, USA).

Cuadro 17. Tratamientos evaluados para hongos micorrizicos arbusculares

Simbología	Tratamiento	Repeticiones
1	Consortio <i>Gigaspora</i> sp. y <i>Acaulospora</i> sp.	3
2	Consortio <i>Rhizophagus</i> sp., <i>Clareideoglous</i> sp, <i>Septoglomus</i> y <i>Glomus</i> sp	3

4.1.2. Inoculación con hongos filosféricos

Del total de 200 plantas establecidas e inoculadas con hongos endomicorrizicos, cuando estas presentaron cuatro hojas verdaderas, se seleccionaron 140 con altura similar y estructura homogénea. Después se inocularon de acuerdo a lo indicado por el cuadro 18, con hongos filosféricos identificados, pre-seleccionados y multiplicados previamente usando la metodología propuesta y estandarizada en el laboratorio de hongos fitopatógenos del departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

La metodología de obtención, purificación e identificación ya se ha descrito en el capítulo III de este trabajo. A partir de las cajas Petri que contenían hongos purificados, se seleccionaron géneros de *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Lecanicillium* pues la literatura los reporta como potenciales inhibidores de la germinación de esporas de *H. vastatrix* (Haddad, Saraiva, Mizubuti, Romeiro, & Maffia, 2014; Jackson, Skillman, & Vandermeer, 2012; Silva, Tozzi, Terrasan, & Bettioli, 2012).

Después de seleccionarlos, se multiplicaron tomando discos del medio de cultivo con micelio de cada especie pura y sin contaminación o crecimiento anormal visible, los discos median de 0.5 cm de diámetro uniformizando el tamaño con un sacabocado estéril. Posteriormente estos discos fueron sembrados individualmente en cajas Petri que contenían medio de cultivo PDA para los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Lecanicillium*, y con medio V8 solidificado con agar para *Fusarium*, todos se incubaron por 14 días a temperaturas de ± 25 °C con luz natural.

Para la inoculación de hongos filosféricos se obtuvo de forma aséptica, una suspensión de micelio y esporas agregando 100 mL de agua destilada estéril a cada caja y raspándola con una varilla de vidrio doblada en ángulo de 90 °, cuidando de no romper el medio de cultivo y procurando arrastrar la mayor cantidad de estructuras en el agua. El agua con el raspado de las cajas fue colectada en un vaso de precipitado por especie, después se tomó 1 ml de cada vaso y con ayuda de una cámara de Neubauer se contaron el número de estructuras para ajustar la concentración a 1×10^{10} esporas \cdot mL⁻¹.

La obtención de esporas de *H. vastatrix* fueron colectadas de cafetos de Ixhuatlan Veracruz 24 horas antes de realizar la inoculación con hongos filosféricos, para ello se rasparon hojas de café infestadas con el patógeno con navajas estériles, recolectando las uredias en microtubos, estos se resguardaron a temperaturas de $4 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$. Una vez en el laboratorio, se desinfestaron con la metodología sugerida por Holts-Sanjuán *et al.* (2017), sumergiendo las esporas por 30 segundos en alcohol etílico al 75 %, después se retiró el alcohol y se agregó una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % por 60 segundos, finalmente se realizaron dos lavados con agua destilada estéril, se suspendieron en agua destilada estéril y se ajustó la concentración con cámara de Neubauer a 1×10^{10} esporas \cdot mL⁻¹.

Para la inoculación en plantas de café con cuatro hojas verdaderas, se siguió la metodología de aspersión con atomizador manual dosificando 100 mL por cafeto de una suspensión compuesta por agua destilada estéril y 1×10^{10} esporas \cdot mL⁻¹ del hongo seleccionado, excepto para *H. vastatrix* (Cuadro 18).

Cuadro 18. Descripción de tratamientos evaluados

Tratamiento	Unidades experimentales	Hongo filosférico	Consortio micorrízico
1	10	<i>Aspergillus niger</i>	
2	10	<i>Fusarium equiseti</i>	
3	10	<i>Penicillium christenseniae</i>	AG
4	10	<i>Colletotrichum siamense</i>	(<i>Acaulospora</i> sp. + <i>Gigaspora</i> sp.)
5	10	<i>Lecanicillium</i> sp.	
6	10	Testigo - (agua destilada estéril)	
7	10	<i>Hemileia vastatrix</i> [†]	
8	10	<i>Aspergillus niger</i>	
9	10	<i>Fusarium equiseti</i>	RCSG
10	10	<i>Penicillium christenseniae</i>	(<i>Rhizophagus</i> sp. + <i>Clareideoglossus</i> sp,
11	10	<i>Colletotrichum siamense</i>	<i>Septoglomus</i> + <i>Glomus</i>
12	10	<i>Lecanicillium</i> sp.	sp.)
13	10	Testigo - (agua destilada estéril)	
14	10	<i>Hemileia vastatrix</i> [†]	

† La concentración de uredias de roya fue 2 mg·mL⁻¹

Antes de la inoculación con hongos filosféricos, las plantas fueron regadas a saturación con agua destilada y posterior a esta se incubaron a temperaturas de 18 ± 1 °C cubriéndolas por 48 horas con bolsas de polietileno para propiciar una microatmósfera húmeda y facilitar el desarrollo de los organismos aplicados. Cada tratamiento fue aislado de los otros en cubos construidos con polietileno de medidas de 1 m x 1 m x 1 m.

4.1.3. Evaluación de la interacción hongo endomicorrízico/hongo filosférico

Cuando transcurrieron tres días después de la inoculación con hongos filosféricos, se procedió a registrar cada tres días durante 30 días el color de las plantas mediante lecturas hechas con el medidor portátil de clorofila SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development), también se registró la aparición de lesiones patogénica. Para la evaluación de estas variables se estableció un experimento con diseño completamente al azar con 14 tratamientos y tres repeticiones por cada uno, realizando análisis de varianza (ANOVA) además de la prueba de comparación de medias Tukey con un nivel de significancia $p = 0.05$, utilizando el software SAS® versión 9.0 (SAS Institute Inc. Campus Drive, Cary, North Caroline, USA).

Cinco días después de la inoculación con hongos filosféricos, se comenzó a determinar la biomasa acumulada de las plantas. Esta última variable se determinó cada diez días

durante un mes pesando en cada ocasión la estructura completa de tres plantas, secando a 70 °C hasta peso constante y aplicando la siguiente formula:

$$Biomasa\ acumulada = P_i - P_f$$

Donde:

P_i : Peso inicial y P_f : Peso después de secado a 70° C.

El experimento se estableció usando un diseño completamente al azar con 14 tratamientos, se realizaron tres muestreos de tres repeticiones cada uno por tratamiento. Los resultados se graficaron y también fueron procesados usando análisis de varianza (ANOVA) además de la prueba de comparación de medias Tukey con un nivel de significancia $p = 0.05$, utilizando el software SAS® versión 9.0 (SAS Institute Inc. Campus Drive, Cary, North Caroline, USA).

4.2. RESULTADOS

Después de la inoculación con los dos consorcios de hongos endomorrízicos, cuando se realizaron los muestreos de los géneros especificados en el cuadro 18, se pudo verificar que en el sustrato colectado, seguía conteniendo los mismos géneros predominantes de los inóculos originales (Figura 18).

También se observó mayor porcentaje de colonización en plantas antes de la inoculación con hongos filosféricos (30 días antes) en comparación con el obtenido después de ésta, pero no existió diferencia estadísticamente significativa al contabilizar el número de esporas $\cdot g^{-1}$ (Cuadro 19).

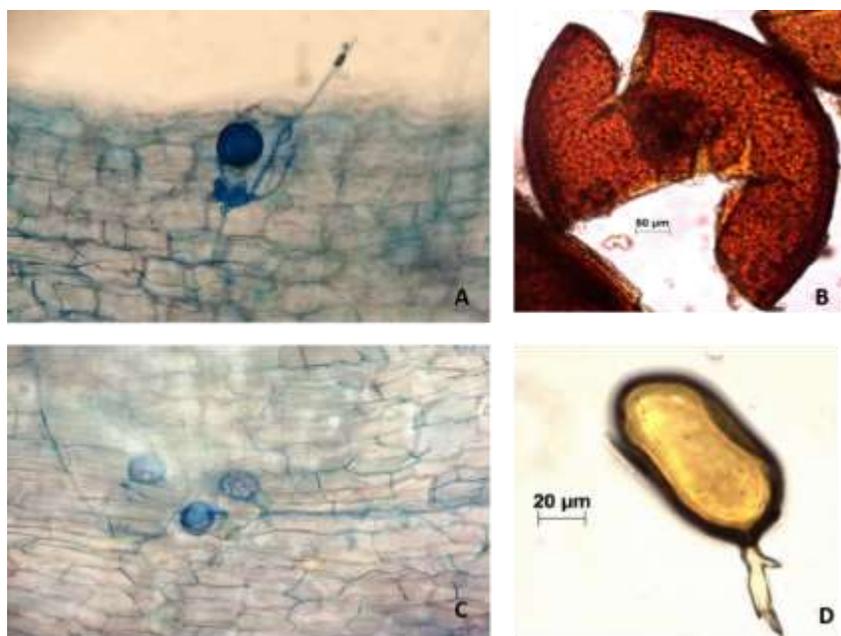


Figura 18. Estructuras de hongos endomicorrízicos obtenidas en el primer muestreo de cafetos con cuatro hojas verdaderas (dos cruces), antes de inocular con hongos filósfericos. **A** espora con célula auxiliar y **B** espora madura de *Gigaspora* sp.; **C** esporas intraradicales y **D** espora madura de *R. intraradices*.

Cuadro 19. Porcentaje de colonización y densidad de esporas antes y después de la inoculación con hongos filósfericos.

Tratamiento	Antes de la inoculación		Después de la inoculación	
	Colonización (%)	Densidad de esporas (esporas · g ⁻¹)	Colonización (%)	Densidad de esporas (esporas · g ⁻¹)
1	59.2 a [†]	6.5 a	46.6 a	6.5 a
2	51.6 a	6.4 a	48.7 a	6.3 a
3	55.9 a	6.1 a	47.8 a	6.3 a
4	55 a	6.5 a	48.4 a	6.3 a
5	53.3 a	6.3 a	38.4 b	6.3 a
6	54.3 a	6.3 a	30.9 b	6.4 a
7	49.6 a	6.5 a	26.5 b	6.4 a
8	54.2 a	6.2 a	35.4 b	6.4 a
9	56 a	6.3 a	25.8 b	6.5 a
10	55.8 a	6.3 a	30.1 b	6.3 a
11	55.2 a	6.3 a	34.7 b	5.9 a
12	54.6 a	6.3 a	30.1 b	6.5 a
13	55.3 a	6.3 a	31.2 b	6.3 a
14	54.7 a	6.4 a	35.4 b	6.3 a
DMSH	14.574	0.917	15.395	0.901

[†] Grupos con la misma letra dentro de la misma columna no representan diferencia significativa DMSH (p=0.05). Test de comparación de medias Tukey.

Los tratamientos inoculados con el consorcio que contenía los géneros *Acaulospora* y *Gigaspora* mostraron mayor porcentaje de colonización en comparación con el resto de los tratamientos. Este efecto del consorcio *Acaulospora* y *Gigaspora* en los tratamientos inoculados con los hongos también ha sido observado en investigaciones anteriores (Diniz-Cogo *et al.*, 2016) siendo el incremento de la absorción de fósforo y nitrógeno la razón por la cual se favorece la asociación entre algunos organismos filosféricos y de la rizosfera.

Este fenómeno ocurre porque patógenos como *Aspergillus*, *Fusarium* y *Colletotrichum* para infectar a su huésped, suprimen el funcionamiento del fotosistema (Yan *et al.*, 2018; Renu, 2018; Moore *et al.*, 2017), por lo que en una primera etapa el aprovechamiento del nitrógeno disminuye y su demanda por la planta aumenta. Por otro lado Andrade *et al.* (2009) reportó que el género *Acaulospora* favorece la absorción de nitrógeno en su huésped, por lo que la asociación entre éste género de hongos endomicorrízicos y plantas infectadas con los hongos filosféricos antes mencionados, se propicia.

La supresión del sistema fotosintético de los tratamientos uno al cuatro pudo evidenciarse con la disminución de las lecturas hechas con SPAD-502 (Figura 19), instrumento cuyas unidades se correlacionan con la concentración de clorofila extractable y con las concentraciones foliares de nitrógeno (Ramírez-Builes *et al.*, 2012).

En la Figura 19 se observa que la primer lectura (tres días después de la inoculación) es estadísticamente igual para todos los tratamientos (DMSH 1.931 y $p=0.05$), pero después de esta y hasta la quinta (15 días después de la inoculación con hongos filosféricos), las lecturas de los tratamientos del uno al cuatro son menores (DMSH 1.593 y $p=0.05$), la causa de esto fue la inoculación con distintos hongos. Sin embargo a partir de la sexta lectura (20 días después de la inoculación) los valores de unidades SPAD obtenidos por todos los tratamientos fueron estadísticamente iguales (DMSH 1.963 y $p=0.05$).

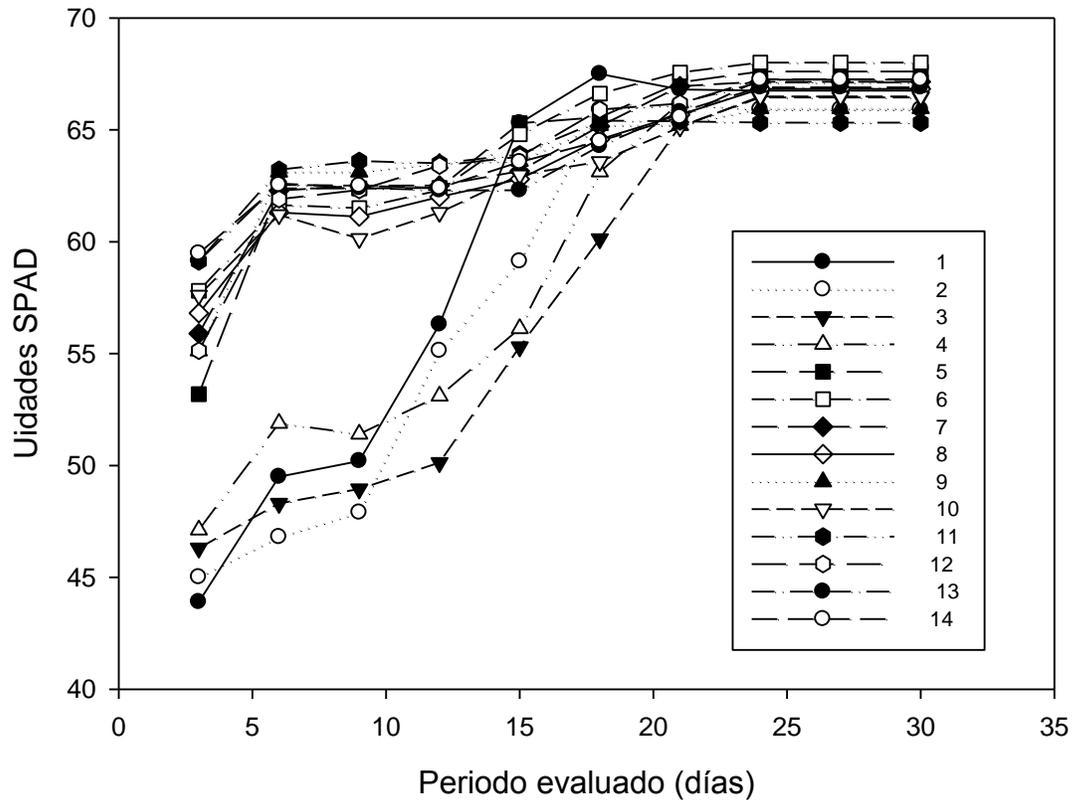


Figura 19. Tratamientos y unidades SPAD de cafetos inoculados con dos consorcios de hongos endomicorrízicos y 14 hongos filosféricos.

En cuanto a la biomasa acumulada las plantas no se obtuvo diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos y los testigos inoculados con agua (5.0 g, $p=0.05$) (Figura 20), por lo que la inoculación no tuvo efecto en esta variable a pesar de que los 15 días después de la inoculación con hongos filosféricos las lecturas hechas con SPAD-502 fueron menores en los tratamientos uno al cuatro. Esto se debió a que todos los tratamientos que presentaron las menores lecturas SPAD únicamente mostraban hambre oculta (Ramírez-Builes *et al.*, 2012) la cual no se prolongó por un periodo de tiempo largo, además las plantas se encontraban en estado vegetativo, lo que les permitió una recuperación de tal manera que la producción de biomasa no se vio afectada (Rendón y Sadeghian, 2018).

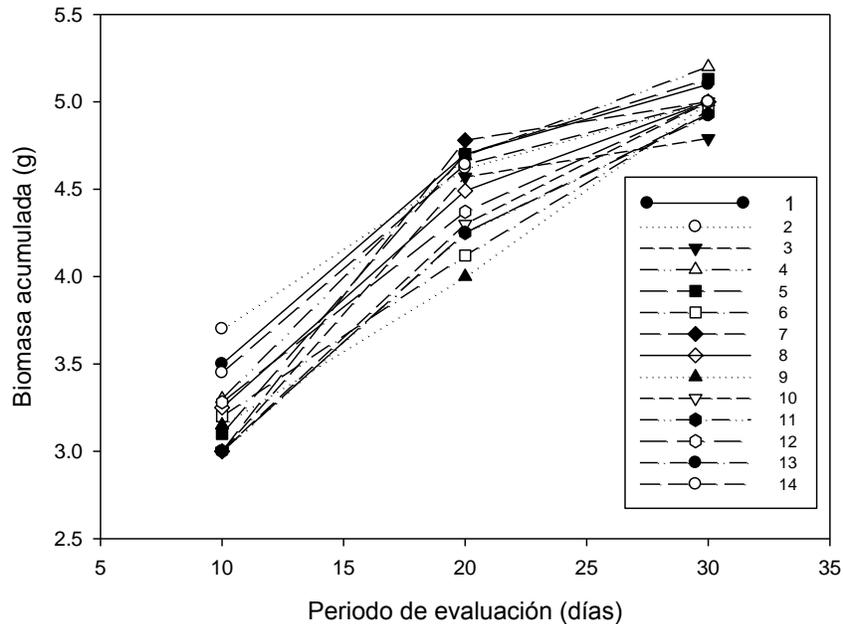


Figura 20. Biomasa acumulada durante 30 días por cafetos inoculados con dos consorcios de hongos endomicorrízicos y 14 hongos filosféricos.

Es importante mencionar que no se presentaron síntomas de infección por ningún hongo filosferico inoculado, además las lecturas SPAD del testigo inoculado con agua y del tratamiento inoculado con uredias de roya fueron iguales, por lo que el experimento completo fue repetido una vez más obteniendo los mismos resultados pero esta vez colocando a la par de la inoculación de cafetos, esporas de los hongos en cámaras húmedas para observar germinación de estas estructuras. El resultado fue que todos los hongos presentaron germinación en más del 60 % de las esporas evaluadas a excepción de *H. vastatrix* donde ninguna uredia germino.

Posiblemente la falta de germinación de *H. vastatrix* se debió al shock de temperatura al que se sometieron las uredias, pues al recolectarlas la temperatura fue 18 ± 1 °C, pero al trasportarla se colocó en hieleras con temperaturas de 4 °C aproximadamente, además la humedad del sitio de recolección fue distinta a la del área donde se montó el experimento. Dill-Hinnah *et al.* (2018) menciona que la temperatura y la humedad son los principales factores que influyen en la infección de la roya anaranjada, por lo que es indispensable continuar con pruebas que permitan establecer temperaturas y rangos de humedad para resguardar inóculos viables de este patógeno con fines de investigación.

4.4. CONCLUSIONES

El porcentaje de colonización de hongos endomicorrízicos fue mayor en los tratamientos inoculados con el consorcio que contenía a los géneros *Acaulospora* y *Gigaspora* debido que los hongos filosféricos propiciaron un deterioro del sistema fotosintético del hospedero y lo obligó a demandar mayor cantidad de nitrógeno, favoreciendo la simbiosis con el consorcio *Acaulospora* y *Gigaspora*. Este resultado fue respaldado por lecturas SPAD menores en los tratamientos inoculados con los géneros endomicorrízicos antes mencionados.

Se observó que las uredias de *H. vastatrix* fueron incapaces de germinar por lo que se sugiere evaluar otras formas de recolección, desinfestación e inoculación de este patógeno.

CONCLUSIONES GENERALES

En esta investigación se hongos endomicorrízicos presentes en café de variedad Criollo, Bourbon, Garnica y Geisha. Donde no existió diferencia entre los géneros predominantes, estos fueron *Acaulospora*, *Rhizophagus*, *Clareideoglossum*, *Diversispora*, *Septoglossum* y *Glomus* por lo que se concluye que la diversificación de géneros endomicorrízicos no está afectada ni definida por las variedades de café evaluadas. Sin embargo la proporción del género *Acaulospora* con respecto a la de *Rhizophagus* parece estar relacionada con la infección de roya anaranjada.

En general, al observar únicamente la dinámica de micorrización, se encontró que las plantas que establecen relaciones mutualistas con hongos endomicorrízicos se ven menos afectadas por patógenos, que aquellas que no lo hacen. Esta aseveración es respaldada por el porcentaje de colonización y el número de esporas hallados en plantas sanas en comparación con las enfermas.

Al evaluar la abundancia de hongos epífitos y endófitos de hojas de café se concluye que la distribución de los géneros así como su capacidad patogénica obedeció a la presencia de lesiones foliares causadas por roya, a las condiciones ambientales al momento del muestreo de hojas y a la simbiosis establecida entre el hospedante y géneros específicos de hongos endomicorrízicos.

Por otro lado, la inoculación con géneros endomicorrízicos específicos junto con hongos filosféricos no afecta la cantidad de biomasa acumulada de cafetos criollos en etapas vegetativas pero es posible observar un periodo breve de hambre oculta cuando en un mismo hospedante interactúan hongos patógenos que deterioran el sistema fotosintético con hongos endomicorrízicos que favorecen la absorción de nitrógeno antes que la de fósforo.

LITERATURA CITADA

- Aleksandrowicz-Trzcinska, M. et al. 2017. "The Effect of Silver and Copper Nanoparticles on the Condition of English Oak (*Quercus Robur* L.) Seedlings in a Container Nursery Experiment." *Forests* 8(9): 310.
- Almudena, B. 2016. La crisis del café mexicano: en 2016 será mayor la importación que la producción nacional. <http://www.economiahoy.mx/mercados-eAm-mexico/noticias/7367513/02/16/La-crisis-del-cafe-mexicano-en-2016-sera-mayor-la-importacion-que-la-produccion-nacional.html> [Consultado el 10/01/17].
- Agrios, G. N. 2002. *Fitopatología*. 2nd ed. México: LIMUSA. 856 p.
- Andersen, Martin Marchman et al. 2015. "Feasibility of New Breeding Techniques for Organic Farming." *Trends in Plant Science* 20(7): 426–34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2015.04.011>.
- Andrade, S. A.L., P. Mazzafera, M. A. Schiavinato, and A. P.D. Silveira. 2009. "Arbuscular Mycorrhizal Association in Coffee." *Journal of Agricultural Science* 147(2): 105–15.
- Arias, Rosa, Heredia-Abarca, G., Sosa, V., Fuentes-Ramírez, L. 2011. Diversity and abundance of arbuscular mycorrhizal fungi spores under different coffee production systems and in a tropical montane cloud forest patch in Veracruz, México. *Agroforestry Systems*. 85:179–193.
- Arneson, P.A. 2000. *Roya del Café*. Trans. María Eugenia Ordóñez. 2015. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0718-02. Updated 2011. <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/CoffeeRustspan.aspx>.
- Artursson, V., Finaly, D. R., Jansson, J. K. 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology*. 8 (1): 1-10.
- Augé, Robert M., Heather D. Toler, and Arnold M. Saxton. 2014. "Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis Alters Stomatal Conductance of Host Plants More under Drought than under Amply Watered Conditions: A Meta-Analysis." *Mycorrhiza* 25(1): 13-24.
- Avelino, J; Rivas, G. 2013. La roya anaranjada del café. [WWW documento] URL <http://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01071036>. [Consultado el 24/10/16].
- Anzueto, F. 2013. Variedades de café resistentes a roya. *Revista electrónica El cafetal*. [WWW documento] URL https://www.anacafe.org/glifos/index.php/Variedades_resistentes_a_roya. [Consultado el 24/10/16].
- Bedoussac, Laurent et al. 2015. "Ecological Principles Underlying the Increase of Productivity Achieved by Cereal-Grain Legume Intercrops in Organic Farming. A Review." : 911–35.
- Bench, K. 2016. MycoBank Database. [WWW documento] URL <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000063&Rec=13768&FieIds=All>. [Consultado el 30/04/17].
- Bolaños-B., M., Rivillas-Osorio, A., Suárez-Vásquez, S. 2000. Identificación de Micorrizas Arbusculares en Suelos de la Zona Cafetalera Colombiana. *Cenicafé*. 51(4): 245-262.
- Bora, M. y Lokhandwala, A. 2016. Mycorrhizal Association: A Safeguard for Plant Pathogen In Hashem, Abeer et al. 2016. "The Interaction between Arbuscular Mycorrhizal Fungi and

- Endophytic Bacteria Enhances Plant Growth of *Acacia Gerrardii* under Salt Stress.” *Frontiers in Microbiology* 7: 1–15.
- Bowden, J., Gregory P. H., Johnson C. G. 1971. Possible wind transport of coffee leaf rust across the Atlantic Ocean. *Nature* 229: 500-501.
- Burgos-Araya, G. M. (2018). Análisis y recomendación de parámetros y materiales para el diseño de ambiente protegido para la reproducción de café por medios asexuales en la empresa micro plantas, ubicada en desamparados de alajuela. Informe de Trabajo Final de Graduación presentado a la Escuela de Ingeniería Agrícola como requisito parcial para optar al grado de Licenciado en Ingeniería Agrícola. 76 p.
- Caldwell, A.C., Silva, L.C.F., da Silva, C.C., Ouverney, C.C., 2015. *Prokaryotic diversity in the rhizosphere of organic, intensive, and transitional coffee farms in Brazil.* . *PLoS ONE* 10(6): e0106355. doi:10.1371/journal.pone.0106355.
- Camargo-Ricalde, S. N., Montañó M., De la Rosa-Mera, C. J., Montañó S. A. 2012. Micorrizas: una gran unión debajo del suelo. *Revista Digital universitaria*. 13 (7): 3-19. [WWW documento] URL <http://www.revista.unam.mx/vol.13/num7/art72/art72.pdf>. [Consultado el 24/10/16].
- Camarena-Gutiérrez, G. 2012. Interacción planta-hongos micorrícicos arbusculares. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 18 (3): 409-421.
- Carvalho C. R., Fernandes, R. C., Carvalho, G. M. A., Barreto, R. W., Evans, H. C. 2011. Cryptosexuality and the genetic diversity paradox in coffee rust, *Hemileia vastatrix*. *PLoS One*. 6(11): e26387.
- CEDRSSA (Centro de estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria). (Marzo 2018). Reporte el café en México diagnóstico y perspectiva. [<http://www.cedrssa.gob.mx/files/10/30EI%20caf%C3%A9%20en%20M%C3%A9xico:%20diagn%C3%B3stico%20y%20perspectiva.pdf>.] Consultado el 17/09/2019.
- CEDRSSA (Centro de estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria). (Marzo 2019). Propuesta para reactivar la producción y comercialización de café en México 2019-2024. Palacio Legislativo San Lázaro, Ciudad de México. 19 p. [<http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/96Las%20propuestas%20para%20reactivar%20la%20producci%C3%B3n%20y%20comercializaci%C3%B3n%20de%20Caf%C3%A9%202019%2008.pdf>] Consultado el 10/01/17.
- CICADES y Fundación Malongo. (2016). Manual práctico y técnico de cafecultura orgánica. Veracruz, México. Pp 47.
- Clay, K. 2014. “Defensive symbiosis: a microbial perspective”. *Funct Ecol* 28(2):293–298.
- Crous, P.W., Summerell, B.A., Carnegie, A.J., Wingfield, M.J., Hunter, G.C., Burgess, T.I., Andjic, V., Barber, P.A., Groenewald, J.Z. 2009. “Unravelling *Mycosphaerella*: do you believe in genera?”. *Persoonia*. 23:99-118
- Del Mar Alguacil, Maria, Emma Torrecillas, Zenaida Lozano, and Antonio Roldán. 2011. “Evidence of Differences between the Communities of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Colonizing Galls and Roots of *Prunus Persica* Infected by the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*.” *Applied and Environmental Microbiology* 77(24): 8656–61.

- Dill-Hinnah, F., Sentelhas, P. C., Alves-Meira, C. A., Naves-Paiva, R. 2018. Weather-based coffee leaf rust apparent infection rate modeling. *International Journal of Biometeorology*. 62 (10): 1847-1860.
- Diniz-Cogo, F., Gontijo-Guimarães, P. T., Pouyú-Rojas, E., Saggin, O., Siqueira, J. O., Carbone-Carneiro, M.A. 2016. "Arbuscular mycorrhiza in *Coffea arabica* L.: Review and meta-analysis". *Coffee Science, Lavras*. 12(3): 419 – 443.
- Dominguesa, F. C., Queiroza, J. A., Cabralb, J. MS., Fonseca, L. P. 2000. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulose production by *Trichoderma reesei* rut C-30. *Enz Microb Technol*, 26:394–401.
- Etchevers, J. D. 2010. Interpretación de los análisis químicos de suelo. Centro de Edafología, Colegio de Postgraduados. México. 37 p.
- Elsen, A., Gervacio, D., Swennen, R., De Waele, D. 2008. AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa* sp.: a systemic effect. *Mycorrhiza* 18:251–256.
- FAOSTAT. 2018. La producción de café en México: periodo 2002-2012. [WWW documento] URL <http://biblioteca.catie.ac.cr/royadelcafé/descargas/ROYA-MA.pdf>. [Consultado el 20/04/17].
- Felipe-Felipe, L. 2007. Cambios en la producción y comercialización del café (*Coffea arabica* L.) en el Mundo y sus impactos en la actividad cafetalera de México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonia Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Pp 11.
- Felix, Fernandez. 2007. Factibilidad Biologica de La Micorrización "in Vitro" de Papa, *Solanum Tuberosum*. La Habana, Cuba. 94 p.
- Ferrera-Cerrato, R., González-Chávez, Ma. Del C., Rodríguez-Mendoza, M. de las N. 1993. Manual de agromicrobiología. Trillas. México. 144 p.
- Filho, J. A. C., Pascholati, S.F., Sabrinho, S.F. 2016. Micorrizal Association and Their Role In Disease Protection. P 95-97. In Hakem, K. R., Akhatar, M.S. (eds.) 2016. *Plant, Soil and Microbes*, Volumen 2: Mechanism and Molecular Interactiosn. Springer International Publishing. Suiza. 438 p.
- FIRA. 2015. Panorama Agroalimentario: Café 2015. Dirección de Investigación y Evaluación Económica Sectorial. FIRA. Pp 40. [WWW documento] URL. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/61949/Panorama_Agroalimentario_Caf__2015.pdf [Consultado el 10/01/17].
- Fritz, M., Jakobsen, I., Lyngkjaer, M.F., Thordal-Christensen, H., Pons-Kuhnemann, J. 2006. Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza* 16:413–419.
- García-González, A. 2011. Mejoramiento Genético del Café en América Central: Selección de Clones de Híbridos F1 de *Coffea arabica* y Desarrollo Tecnológico. PROMECAFE, Guatemala. 15 p.
- Georget, F., Courtel, P., Malo-Garcia, E., Hidalgo, M., Alpizar, E., Breitler, J. C., Bertranda, B., Etienne, H. (2017). Somatic embryogenesis-derived coffee plantlets can be efficiently propagated by horticultural rooted mini-cuttings: A boost for somatic embryogenesis. *Scientia Horticulturae*. 216:177-185.
- Gianinazzi-Pearson, V. 1996. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *Revista Plant Cell*. 8: 1871-1883.

- Guzman- Plazola, R., Ferrera- Cerrato, R. 1990. La endomicorriza vesiculo-arbuscular en las leguminosas. Colegio de Postgraduados, México, 119 p.
- Haddad, Fernando et al. 2014. "Isolation and Selection of Hemileia Vastatrix Antagonists." *European Journal of Plant Pathology* 139(4): 763–72.
- Harman, G.E., 2005. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. 648. *Phytopathology* 96:190–194
- Hashem, A., Abd-Allah, E. F., Alqarawi, A. A., Al-Huqail, A. A., Wirth, S., Egamberdieva, D. 2016. The Interaction between Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Endophytic Bacteria Enhances Plant Growth of *Acacia gerrardii* under Salt Stress. *Front Microbiol.* doi:10.3389/fmicb.2016.01089.
- Hakeem, Khalid Rehman; and Mohd Sayeed Akhtar. 2016. 2 *Plant, Soil and Microbes.* <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-29573-2>.
- Hernández-Martínez, G. y Velázquez-Premio, T. (2016). Análisis integral sobre la roya del café y su control. *Revista Internacional de Desarrollo Regional sustentable.* 1 (1): 92-99.
- Hodge A., Fitter, A. 2010. Substantial nitrogen acquisition by arbuscular mycorrhizal fungi from organic material has implications for N cycling. *PNAS.* 107 (31): 754-759.
- Holst-Sanjuán, K., Rivera-Coto, G., Villalobos-Moya, K., Orozco-Rodríguez, R., Orozco-Cayasso, S. (2017). Pruebas in vitro de hongos antagonistas para combatir la roya de mora en Costa Rica. *Agronomía Costarricense.* 41(1): 19-32.
- Honrubia, M. 2009. Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. *Anales Jard. Bot. Madrid* 66(1): 133-144.
- Hooykaas, P. J. (2015) *Agrobacterium, the genetic engineer.* In: *Principles of plant-microbe interactions.* Springer, New York, pp 355–361
- Huerta-Palacios, Graciela, Francisco Holguín-Meléndez, Flor Azucena Benítez-Camilo, and Jorge Toledo-Arreola. 2009. "Epidemiología de La Antracnosis [*Collectotrichum Gloesporoides* (Penz.) Penz. and Sacc.] En Mago (*Mangifera Indica* L.) Cv. Ataulfo En El Soconusco, Chiapas, México." *Revista Mexicana de Fitopatología* 27(2): 93–105.
- Jackson, Doug, Jane Skillman, and John Vandermeer. 2012. "Indirect Biological Control of the Coffee Leaf Rust, *Hemileia Vastatrix*, by the Entomogenous Fungus *Lecanicillium Lecanii* in a Complex Coffee Agroecosystem." *Biological Control* 61(1): 89–97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.01.004>.
- Jefree, C. E. 1996. Structure and ontogeny of plants cuticles. P. 33-82. In *Plant Cuticles: An Integrated Functional Approach.* G. Kerstiens, ed. BIOS Scientific Publisher Oxford.
- Kawabata, Andrea. 2016. "How to Take Coffee Leaf and Soil Samples." 1: 1–7.
- Kirk, P., Cannon, P. F., David, J. C., Stalpers, J. A. 2008. *Dictionary of the Fungi.* CAB International. Oxon, UK. 771 pp.
- Lee CS, Lee YJ, Jeun Y.C. 2005. Observations of infection structures on the leaves of cucumber plants pre-treated with arbuscular mycorrhiza *Glomus intraradices* after challenge inoculation with *Colletotrichum orbiculare*. *Plant Pathol* 21:237–243.
- Litelier, A. E. 1967. *Manual de fertilizantes para Chile.* Banco del Estado, Santiago, Chile. 200 p.

- Leveau, J. H. J. 2015. Life of Microbes on Aerial Plant Parts in Lugtenberg B. (ed.). 2015. Principles of Plant-Microbe Interactions. Springer International Publishing Switzerland. Pp 447.
- López, M. R., Díaz, P. G., Martínez, R. J. 2007. Potencial productivo y tipología de productores de café en la zona centro del estado de Veracruz. INIFAP. México, D. F. 36 p.
- Lugtenberg, B. 2015. Life of Microbes in the Rhizosphere P7-15. In Lugtenberg, B (eds) . 2015. Principles of Plant-Microbe Interactions, Microbes for Sustainable Agriculture. Springer International Publishing. Suiza. p. DOI <https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3>.
- Manzo, S. G., Orozco-Santos, M., Guzmán-González. 2001. Caracterización morfológica de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet de la región Pacífico-Centro de México y su desarrollo en medios líquidos. Revista Mexicana de Fitopatología. 19(001): 66-71.
- Martínez-Pamatz, R., Soriano-Fajardo, A. R. 2014. Muestreo para análisis foliar. INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias). Desplegable para productores No. 10. 2 p.
- Menezes M. S., Silva D. K. A., Queiroz M. A. A., Félix W. P., Yano-Melo A. M. (5, febrero, 2016). Agriculture, ecosystems and environment arbuscular mycorrhizal fungal communities in buffelgrass pasture under intercropping and shading systems in brazilian semiarid conditions. Agriculture, Ecosystems and Environment. 230, 55–67. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.05.024>.
- Mishra, J., Tewari, S., Singh, S., Kumar-Arora, N. 2015. In N.K. Arora (ed.). 2015. Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets, 37. DOI 10.1007/978-81-322-2068-8_2, © Springer India 2015. 17 p.
- Montaño, N. M., Camargo-Ricalde, S. L., García-Sánchez, R., Monroy, A. 2007. Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos. México: Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT, Mundi-Prensa S.A. de C.V., UAM-Iztapalapa, FES Zaragoza, UNAM. 13 (7): 2-19.
- Montilla, R., Camacho, B., Quintero, A., Cardozo G. 2006. Parasitismo por *Beauveria bassiana* sobre la broca del café, en el estado Trujillo, Venezuela. Agronomía Trop. 56(2): 183 – 198.
- Moreno-Ruiz, G. 2002. TABI: Variedad de café de porte alto con resistencia a la roya. Avances Técnicos 300 CENICAFÉ. 10p.
- Morton, J. 2017. International Culture Collection of (vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM). West Virginia University. WWW documento] URL <http://invam.wvu.edu/home>. [Http://www.amf-phylogeny.com/](http://www.amf-phylogeny.com/).
- Moore, J., Rajasekaran, J., Cary, J. y Chlan, C. 2017. “Identification of resistance to *Aspergillus flavus* infection in cotton germplasm”. Journal of Crop Improvement. 31 (5): 727-741.
- Muleta D., Assefa F., Nemomissa S. & Granhall U. 2007. Composition of coffee shade tree species and density of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) spores in Bonga natural coffee forest, southwestern Ethiopia. Forest Ecology and Management 241, 145–154.
- Mutjaba, B. M., Fareed, K. S., Kasim, Z. M., Sadaf, Z. N., Gul, A. 2016. Plant-Microbe interactions: A molecular approach. P 1-22. In Hakem, K. R., Akhtar, M.S. (eds.) 2016. Plant, Soil and Microbes, Volumen 2: Mechanism and Molecular Interactions. Springer International Publishing. Suiza. 438 p.

- Muengula-manyi, Marcel, Augustin Ngombo-nzokwani, and John Kiamana-mantata. 2017. "Induction of Coffee Wilt Disease Infection Using Different Types of Contaminant in Field Conditions in Democratic Republic of Congo." *African journal of agricultural research* 11(49): 5014–20.
- Organización Internacional del Café (OIC). 2019. Informe de mercado de café enero 2019. International Coffee Organization. Consultado el 12/ 11/2019 de: <http://www.ico.org/documents/cy2018-19/cmr-0119-c.pdf>.
- Panneerselvam, P., Mohandas, S., Saritha, B., Upreti, K. K., Poovarasan, Monnappa, A., Sulladmath, V. V. 2012. *Glomus mosseae* associated bacteria and their influence on stimulation of mycorrhizal colonization, sporulation, and growth promotion in guava (*Psidium guajava* L.) seedlings. *Biological Agriculture & Horticulture*. 28(4):267-279.
- Promecafé-IIICA (Programa regional para la protección y modernización de la caficultura en Centroamérica y Panamá e Instituto Internacional de Cooperación para la Agricultura). 2013. Programa integrado de combate a la roya del café y recuperación de la capacidad productiva en la región centroamericana y el caribe. Promecafé-IIICA. 22 p.
- Pozo, M. y Azcón-Agular, C. 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 10(4):393-8.
- Pérez-Moreno, J., Read, D. 2004. Los hongos ectomicorrícicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*, 29(5), 239-247. [WWW documento] URL. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442004000500004&lng=es&tlng=es. [Consultado el 04/03/16].
- Pérez-Cordero, A., Barraza-Roman, Z., Martínez-Pacheco, D. 2015. Identificación de bacterias endófitas resistentes a plomo, aisladas de plantas de arroz. *Agron. Mesoam.* 26(2):267-276.
- Ramírez-Builes, V. H., Moreno-Berrocal, A. M., López-Ruiz, J. C. 2012. Evaluación temprana de la deficiencia del nitrógeno en café y aplicaciones. *Avances técnicos Cenicafé*. 1: 1-8.
- Renard- Hubert. M. C. 2016. Mercado y desarrollo rural sustentable. Ciudad de México: Red SIAL-México; Conacyt; Colofón. 370 p.
- Rendón, S., Sadeghian, K. 2018. Aplicación de índices espectrales para identificar necesidades de fertilización nitrogenada en café. *Cenicafé*. 69(1):7-15.
- Renu, J. 2018. "A Review on *Colletotrichum* spp. virulence mechanism against host plant defensive factors". *Journal of Medicinal Plants Studies*. 6(6): 64-67
- Rêzacôvá, V., Konvalinková, T., Jansa, J. 2017. Chapter 1: Carbon Fluxes in Mycorrhizal Plants in Varma, A., Prasad, R., Tuteja, N. 2017. *Mycorrhiza -Eco-Physiology, Secondary Metabolites, Nanomaterials*. Cuarta edición. Springer DOI 10.1007/978-3-319-57849-1.
- Richars, L. A. 1962. Diagnóstico y rehabilitación de suelos sódicos. Traducido al español por N. Sánchez. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas.
- Rivera, S. M., Nikolskii-Gavrilov, I., Castillo-Álvarez, M., Ordaz-Chaparro, V., Díaz-Padilla, G., Guajardo-Panes, R. 2013. Vulnerabilidad de la producción del café (*Coffea arabica* L.) al cambio climático global. *Revista Terra Latinoamericana*. 31(4): 305-313.
- Rojo-Jiménez, E. 2014. Café I (*G. Coffea*). *Reduca (Biología), Serie Botánica*. 7 (2): 113-132.

- Rosendahl, S. 2008. Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 178: 253-266.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, MX). 2013. Ficha técnica roya del café *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome. México, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. 28 p.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, MX). 2017. Planeación agrícola nacional 2017-2030, Café mexicano. Consultado el 12/11/2019 de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256426/B_sico-Caf_.pdf
- Salas-Bastos, Adrián. 2010. "Aislamiento e Identificación de Endofitos y Epífitos En Hojas de Café Colectadas En Zonas de Costa Rica y Su Posible Empleo Como Biocontroladores de *Mycena Citricolor*." : 114.
- Sánchez, T. J., Trigo-Landa A. 2013. Las bacterias y sus interacciones con las plantas. *Revista de divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana.* 16 (3): 1-3. [WWW documento] URL. <https://www.uv.mx/ciencia/hombre/revistae/vol26num3/articulos/bacterias-interacciones.html> [Consultado el 12/01/17].
- Sánchez de Prager, M., Posada-Almanza, R., Velázquez- Pomar, D., Narváes- Castillo, M., 2010. Metodologías Básicas para el trabajo con Micorriza Arbuscular y hongos Formadores de Micorriza Arbuscular. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. 139 p.
- Sanders, I., R.T. Koide & D. L. Shumway. 1999. Diversity and structure in natural communities: The role of the mycorrhizal symbiosis. In: Varma, A. & B. Hock (eds.) *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*, second edition, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Schüßler, A., Walker, C. 2001. The Glomeromycota: species list with a new families and genera. The royal Botanic Garden. Edinburgo y Kew, Inglaterra. [WWW documento] URL. <http://www.amf-phylogeny.com> [Consultado el 01/05/17].
- Shaner, G., Finney, R. E. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopat.* 67: 1051-1056.
- SIAP-SAGARPA. 2016. Sistema de Información Agroalimentarias de Consulta. Base de datos para el año 1980-2016. [Http://www.siap.gob.mx/optestadisticasiakon2012parcialsiakon-zip/.] Consultado el 17/09/2019.
- Sieverding, E. 1983. Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo-arbuscular en el laboratorio. Palmira: Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, Palmira, Valle del Cauca. 121 p.
- Silva, Harllen S A, João P L Tozzi, César R F Terrasan, and Wagner Bettiol. 2012. Endophytic Microorganisms from Coffee Tissues as Plant Growth Promoters and Biocontrol Agents of Coffee Leaf Rust. *Biological Control* 63(1): 62–67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.06.005>.
- Somers, E., Vanderleyden, J., and Srinivasan, M. 2004. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.* 30(4): 205– 240.
- Sousa, Leandro Pio De, Marcio José, Jorge Maurício, and Costa Mondego. 2018. "Leaf-Associated Bacterial Microbiota of Coffee and Its Correlation with Manganese and Calcium Levels on Leaves."

- Smith, S., Read, D. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 2° Ed. Academic Press. ISBN 9780123705266. 800 pp.
- Swamy M.K., Akhtar M.S., Sinniah U.R. 2016. Root Exudates and Their Molecular Interactions with Rhizospheric Microbes. In: Hakeem K., Akhtar M. (eds) *Plant, Soil and Microbes*. Springer, Cham. pp 59-77.
- Talbot, M. 2011. The coffee commodity chain in the world-economy: Arrighi's systemic cycles and braudel's layers of analysis. *Revista American Sociological Association*. 17 (1): 58-88.
- Tavera, S. G. 1985. Criterios para la interpretación y aprovechamiento de los reportes de laboratorio para las áreas de asistencia técnica. *Publicación 3*. 258 p.
- Tavera- Montero, Víctor, Morales- García José Luciano, González-Chavira Mario Martín, Anaya-López José Luis, Corona-Torres Tarsicio, Gálvez-Mariscal, Amanda. 2010. "Diversidad genética, patogénica y morfológica del hongo *Colletotrichum gloeosporoides* (Penz.) de Michoacán, México". *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1(2): 159–74.
- Talhinhas P., Batista D., Diniz I., Vieira A., Silva D. N., Loureiro A., Silva M. do C. 2017. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology*, 18(8), 1039–1051. <https://doi.org/10.1111/mpp.12512>.
- Thangaraju, M. (2008). Microbial consortium and its effect on controlling coffee root-lesion nematode (*Pratylenchus coffeae*) under nursery conditions. *Journal of Biological Control*, Bangalore. 22 (2): 425-432.
- The National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2018). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>.
- Trejo-Aguilar, D. 1997. *Ecología y comportamiento de la endomicorriza-arbuscular en el cultivo de café*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 130 p.
- Trejo-Aguilar, D. 2003. *Efecto de la Endomicorriza arbuscular sobre el desarrollo de nemátodos fitopatógenos en plántulas de café*. Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México. 165 p.
- Trejo-Aguilar D., Zulueta-Rodríguez, R., Lara-Capistrán, L. 2008. *Manual de prácticas para el estudio de la simbiosis micorrizógena arbuscular*. Textos universitarios, Universidad Veracruzana. 134 p.
- Uzunovic, A., Webber, J. F. 1998. Comparison of bluestain fungi grown in vitro and in freshly cut pine billets. *European Journal of Forest Pathology*. 28 (5): 323-334.
- Vaast, P., Zasoski, R. J., Bledsoe, C. S. 1997. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation at different soil P availabilities on growth and nutrient uptake of in vitro propagated coffee (*Coffea arabica*L.) plants. *Revista Springer Verlag Micorrhiza*. 6(6): 493-497.
- Van der Heijden, M.G.A. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi as a determinant of plant diversity: in search of underlying mechanisms and general principles. *Ecological Studies*, 157: 243-265.
- Vanegas Berrouet, Katherine Maritza, Pablo Andrés Gutiérrez Sánchez, and Mauricio Alejandro Marín Montoya. 2014. "Molecular Identification of Fungi Isolated from Bean Tissues with Anthracnose Symptoms." *Acta Biológica Colombiana* 19(2): 143. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84902768068&partnerID=tZOtx3y1>.

- Valera. L., Trejo, D. 2001. Los Hongos Micorrizógenos Arbusculares como Componentes de la Biodiversidad del Suelo en México. *Acta Zool. Mex.* (n.s.). Número especial 1:39-51.
- Virgilio-Filho, E., As torga-Domian, C. 2015. Prevención y control de la roya en café: Manual de buenas prácticas para técnicos y facilitadores. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Manual técnico No. 131. 96 p.
- Volcy, C. 2008. Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología: Una revisión. *Agronomía Colombiana* 26(1): 107-115.
- World Coffe Research. 2016. Las Variedades de Café de Mesoamérica y el Caribe. World Coffe Research, USAID y PROMECAFE. Catálogo 1. 48 p.
- Yan, K., Guangxuan H., Chenggang R., Shijie Z., Xiaoqing W., and Tiantian B. 2018. *Fusarium solani* infection depressed photosystem performance by inducing foliage wilting in apple seedlings. *Front. Plant Sci.* 9:1-10.
- Yépez-Hernández, F. J., Ferrera-Cerrato, R., Alarcon, A., Delgadillo-Martínez, J., Mendoza-López, M. R. y García-Barradas, O. 2016. Fertilización nitrogenada en el crecimiento, contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de albahaca. *Rev. Fitotec. Mex.* 39 (1): 33 – 40.