



TESIS

**“EVALUACIÓN DE CONTROL BIOLÓGICO Y
BIOESTIMULANTES DE LA ROYA EN CAFÉ (*Hemileia
vastatrix*) EN VITROPLANTAS, BAJO CONDICIONES
DE INVERNADERO”**

QUE PRESENTA:

IVÁN LEAL GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MAYRA ITZCALOTZIN MONTERO CORTES

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN AGROBIOTECNOLOGÍA**

TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA, JALISCO. DICIEMBRE, 2021.

OFICIO 1

OFICIO 2

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de estudios de posgrado 700981, la cual me permitió llevar a cabo este proyecto.

Al Instituto Tecnológico de Tlajomulco por haberme permitido desarrollar parte de mi proyecto en las instalaciones, así como al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), por haberme recibido en sus instalaciones del laboratorio de biotecnología vegetal para dar continuidad al proyecto.

AL proyecto FORDECYT 292474 “Estrategias multidisciplinarias para incrementar el valor agregado de las cadenas productivas del café, frijol, mango, agave mezcalero y productos acuícolas (tilapia) en la región Pacífico Sur a través de la ciencia, la tecnología y la innovación”, por haber financiado el proyecto.

Le estoy muy agradecido a mi directora de tesis la Dra. Mayra I. Montero por su enseñanza, dedicación, y comprensión, que me impulsaron a seguir adelante a pesar de dificultades durante el proyecto.

A mi Codirector de tesis al Dr. Joaquín, por haberme integrado en su equipo de trabajo y entregar parte de su tiempo para dirigirme durante el proyecto.

A mis revisores de tesis al Dr. Isaac, al Dr. Martín, y la Dra. Alejandra, así como a mis Maestros de cátedra, que fueron un pilar fundamental para desarrollo Técnico y profesional.

A mis amigos colegas, Denis García, Karla García, José Cristóbal, Nicolás Hernández, Mayra Vega, Omar Camacho, Diego Navarro, Julio Cesar López, Verónica Gómez, Bibiana T. Jazmín Hernández y Maribel Falcom, por haberme dado de su apoyo en cada una de las etapas del proyecto.

RESUMEN

Esta investigación tiene como objetivo principal generar un protocolo reproducible con vitroplantas en condiciones de invernadero, en el cual se buscó el control de la roya de café (*Hemileia vastatrix*) con el uso de materiales menos agresivos para el medio ambiente como lo son el control biológico, basado en microorganismos vivos como hongos, bacterias, entre otros y biopolímeros de síntesis natural como lo es el quitosano. El primer capítulo hace referencia a una búsqueda de información para conocer el ciclo biológico de la enfermedad y las formas de control que se tienen hasta el momento que en específico se han reportado varios métodos de control de este patógeno obligado y otros en algunas otras especies de plantas similares usando el control químico, biológico, genético y la inducción de resistencia a través de biomoléculas.

En segundo capítulo está dirigido a la propagación de vitroplantas, en los que se desarrollaron diversas técnicas como la propagación en sustratos, propagación *in vitro* en medio semisólido, y una de las técnicas reciente mente aportadas, propagación en biorreactor, para las cuales se buscaba tener mayor número de plantas, mayor desarrollo de las mismas y de mejor adaptación en invernadero.

En el tercer capítulo se hace mención de la búsqueda de microorganismos asilados de las zonas endémicas en donde se tiene el cultivo de café en México, principalmente de rizósfera del género *Trichoderma sp.* que fue usado como bioestimulante para tener un mayor desarrollo de las plantas de café gracias a los compuestos producidos por estas cepas.

Finalmente en el último capítulo se buscó un protocolo el cual revisando la literatura de las condiciones óptimas para obtener inóculo de la roya de café en condiciones controladas y estableciendo nuevas metodologías, se pudo lograr inducir resistencia a las plantas de café mediante la aplicación de Quitosano de alto peso molecular grado reactivo con diferentes concentraciones al 0.01% y 0.05%, que mediante un el análisis de datos del avance de la enfermedad en plantas infectadas con roya se obtuvieron resultados factibles para generar una posible respuesta de la defensa de la planta una vez que inicia el proceso de colonización del hongo.

ABSTRACT

The main objective of this research is to generate a reproducible protocol with vitroplants under greenhouse conditions, in which the control of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) was sought with the use of less aggressive materials for the environment, such as biological control, based on living microorganisms such as fungi, bacteria, among others, and biopolymers of natural synthesis such as chitosan.

The first chapter refers to a search for information to know the biological cycle of the disease and the forms of control that exist so far, specifically that various methods of control of this obligate pathogen and others have been reported in some other species of similar plants using chemical, biological, genetic control and resistance induction through biomolecules.

The second chapter is aimed at the propagation of vitroplants, in which various techniques were developed such as propagation in substrates, in vitro propagation in a semi-solid medium, and one of the recently contributed techniques, propagation in a bioreactor, for which the aim was to have greater number of plants, greater development of the same and better adaptation in the greenhouse.

In the third chapter, he mentions the search for isolated microorganisms from endemic areas where coffee is grown in Mexico, mainly rhizosphere of the genus *Trichoderma* sp. which was used as a biostimulant to have a greater development of coffee plants thanks to the compounds produced by these strains.

The fourth chapter looked for a protocol which, reviewing the literature of the optimal conditions to obtain inoculum of coffee rust under controlled conditions, an evaluation was carried out taking as references the temperature, humidity, light hours, which the pathogen needs to infect vitroplants. and make an evaluation of damage and severity depending on the conditions to which the rust inoculum was subjected.

In the fifth chapter, it was possible to induce resistance to coffee plants by applying reagent grade high molecular weight Chitosan with different

concentrations at 0.01% and 0.05%, that by means of an analysis of data on the progression of the disease in plants infected with rust, feasible results were obtained to generate a possible response of the defense of the plant once the process of colonization of the fungus begins.

ÍNDICE

Contenido

AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE CUADROS	11
CLAVE DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	12
1. CAPÍTULO 1.	13
1.1 Introducción general.....	13
1.2 Revisión de literatura.....	14
1.2.1 Importancia económica del cultivo de café en el mundo	14
1.3 Clasificación taxonómica del café	17
1.3.1 Características de <i>Coffea arabica var. Typica</i>	17
1.4 Propagación del cultivo de café	17
1.4.1 Propagación sexual	17
1.4.2 Propagación asexual	18
1.4.3 Cultivo de tejidos en plantas de café	19
1.4.4 Propagación por embriogénesis somática.....	20
1.5 Enfermedades relevantes en cultivo de café y sus características.	21
1.5.1 Características del género de Roya (<i>Hemileia vastatrix</i>)-clasificación taxonómica.	22
1.5.2 Ciclo de infección de la roya (<i>Hemileia vastatrix</i>)	22
1.5.3 Control biológico de la roya de café.....	24
1.6 Planteamiento del problema.....	33
1.7 Justificación.....	34

1.8	Hipótesis	36
1.9	Objetivos	37
1.9.1	Objetivo general.....	37
1.9.2	Objetivos particulares	37
1.10	Estructura y desarrollo del escrito de tesis.....	38
1.10.1	Bibliografía.....	39
2.	CAPÍTULO 2.	44
2.1	Evaluación de germinación y desarrollo de plántulas café (<i>Coffea arabica</i>) en diferentes sistemas de propagación in vitro.	44
2.1.1	Resumen	44
2.1.2	Introducción	44
2.1.3	Materiales y métodos.....	46
2.1.4	Resultados y discusiones	50
2.1.5	Conclusiones	57
2.1.6	Bibliografía.....	59
3.	CAPÍTULO 3.	62
3.1	Bioestimulación en el desarrollo de plántulas de café mediante cepas nativas de <i>Trichoderma sp.</i>	62
3.1.1	Resumen	62
3.1.2	Introducción	62
3.1.3	Metodología	64
3.2	Resultados y discusión.....	68
3.2.1	Conclusiones	74
3.2.2	Bibliografía.....	76
4.	CAPÍTULO 4.	79

4.1	Evaluación de condiciones de infección del agente causal de roya de café (<i>Hemileia vastatrix</i>) para el incremento de inóculo.....	79
4.1.1	Resumen	79
4.1.2	Introducción	80
4.1.3	Metodología	81
4.1.4	Inoculación de roya (<i>Hemileia vastatrix</i>) en plantas de café.....	82
4.1.5	Resultados y discusión	84
4.1.6	Conclusiones	87
4.1.7	Bibliografía.....	89
5.	CAPÍTULO 5.	91
5.1	Evaluación de la efectividad biológica de bioestimulantes (quitosano) en la inducción de resistencia a la roya del café (<i>Hemileia vastatrix</i>).	91
5.1.1	Resumen	91
5.1.2	Introducción	92
5.1.3	Metodología	94
5.1.4	Material vegetal	94
5.1.5	Material biológico.....	95
5.1.6	Solución de quitosano	95
5.1.7	Bioensayo de efectividad biológica con quitosano <i>in vitro</i>	95
5.1.8	Tinción de muestra para observación de microscopio.....	96
5.1.9	Resultados y discusión	97
5.1.10	Conclusiones	100
5.1.11	Bibliografía.....	101
6.	CAPÍTULO 6.	103
6.1	Discusión general y conclusiones	103
6.1.1	Bibliografía.....	110

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 PRODUCCIÓN MUNDIAL DE CAFÉ 2003-2016	15
FIGURA 1.2 <i>COFFEA ARÁBICA VAR. TÍPICA</i>	17
FIGURA 1.3 SÍNTOMAS DE ROYA EN PLANTA DE CAFÉ	22
FIGURA 1.4 CICLO DE INFECCIÓN DE LA ROYA DE CAFÉ Y SINTOMATOLOGÍA.	23
FIGURA 2.1 RECOLECTA DE CAFÉ (<i>COFFEA ARABICA</i>) EN HUERTAS DE TRASPATIO SAN MIGUEL CUYUTLÁN, TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA JALISCO.....	47
FIGURA 2.2 PROCESO DE COSECHA, LAVADO, DESPULPE Y SECADO DE SEMILLAS DE CAFÉ.....	47
FIGURA 2.3 ARMADO DE BIORREACTORES TIPO SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL (SIT).	48
FIGURA 2.4 DETERMINACIÓN DEL INICIO DE LA GERMINACIÓN EN SEMILLAS DE CAFÉ (<i>COFFEA ARABICA</i>).	51
FIGURA 2.5 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE CAFÉ (<i>COFFEA ARABICA</i>) EVALUADOS LOS DÍAS 7, 11, 14 DÍAS	53
FIGURA 2.6 COMPARACIÓN DE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE PLANTAS DE CAFÉ EN DIFERENTES SISTEMAS DE PROPAGACIÓN.	55
FIGURA 3.1 MORFOLOGÍA COLONIAL Y MICROSCÓPICA DE CEPAS AISLADAS DE <i>TRICHODERMA SPP.</i>	69
FIGURA 3.2 COLONIZACIÓN DE CEPAS DE <i>TRICHODERMA SSP.</i> DURANTE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE CAFÉ EN MEDIO MS (SIN SACAROSA).	71
FIGURA 4.1 ESCALA DE SEVERIDAD DE ROYA EN HOJAS DE CAFÉ DGSV-SINAVEF-LANREF.....	84
FIGURA 4.2 EVALUACIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA INFECCIÓN DE ROYA EN HOJAS DE CAFETO HASTA EL DÍA 40.	86
FIGURA 5.1 CRONOGRAMA DE APLICACIÓN DE ELICITORES Y EVALUACIÓN DE PROGRESIÓN DE INFECCIÓN <i>H. VASTATRIX</i>	96
FIGURA 5.2 PROCESO DE INFECCIÓN DE ROYA EN PLANTAS SUSCEPTIBLES DE CAFÉ.	98
FIGURA 6.1 PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN DE ESTUDIOS DE EFECTIVIDAD BIOLÓGICA PARA EL CONTROL DE LA ROYA DEL CAFÉ	109

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 2.1 PARÁMETROS DE DESARROLLO DE CAFÉ (<i>COFFEA ARÁBICA</i>)	54
CUADRO 3.1 GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE CAFÉ (<i>COFFEA ARÁBICA</i>) EN PRESENCIA DE CEPAS NATIVAS DE <i>TRICHODERMA</i> , 15 DÍAS DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN.	72
CUADRO 4.1 CONDICIONES PARA ESTABLECER EL PROCESO DE INFECCIÓN DE ROYA	83
CUADRO 4.2 EVALUACIÓN DE LA SEVERIDAD DE ROYA EN PLANTAS DE CAFÉ	85

CLAVE DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ABREVIATURA	TÉRMINO
°C	Grados Celsius
Km, m, cm, mm	Kilómetro, metro, centímetro, milímetro
Ph	Potencial hidrogeno
$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Unidad radiación fotosintética activa
mgL^{-1} , gL^{-1} .	Miligramo por litro, gramo por litro
s, min, hrs.	Segundo, minuto, horas.
MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog
Gelrite®	Agente gelificante
BAP	6-Bencilaminopurina
AIB	Ácido indol butírico
ANA	Ácido 1-naftalenacético
Hv	<i>Hemileia vastatrix</i>
ZG	Germinación cigótica
IAA	Ácido indol -3- acético
Th	<i>Trichoderma harzianum</i>
Apresorio	Estructura utilizada por hongos para establecimiento
SIT	Sistema de inmersión temporal
RITA®	Recipiente de inmersión temporal automatizado
Biótrofo	Hongos que se alimentan de células vivas
Estreptomicina	Bactericida sistémico agrícola
Benomilo	Fungicida sistémico agrícola
FAA	(Formaldehído, alcohol, acético)
Tween 80	Polisorbato 80
Nm	Nanómetros
ANOVA	Análisis de varianza
±	Mas menos
SD	Desviación Estándar
p/v	Peso por volumen de solución
CONABIO	Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad
SEMARNAT	Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales
sp. spp.	Especie - especies

1. CAPÍTULO 1.

1.1 Introducción general

El café (*Coffea arabica* L.) es una planta originaria de Etiopía donde se desarrolla a una altura de 1,000 a 2,000 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) y a una temperatura de 10 °C y 20 °C, las variedades y especies de cafetos se desarrollan y adaptan bien en las regiones de la zona tropical (MADINDRA, 1988).

México cuenta con condiciones ideales para el cultivo del café, con zonas montañosas del sureste del país que se encuentran a altitudes mayores a 900 metros sobre el nivel del mar, así como temperaturas que van de los 17.5 a 25.3°C. La cafecultura en el país representa una actividad fundamental en el sector agrícola, no sólo por el valor de su producción, sino además por ser un importante generador de divisas, además por las bondades que ofrece al ser un cultivo de gran relevancia ambiental, puesto que el 99% de los predios cafetaleros se establecen bajo sombra. (SIA-SAGARPA., 2015)

México produce cafés de excelente calidad, ya que su topografía, altura, climas y suelos le permiten cultivar variedades clasificadas dentro de las mejores del mundo, la variedad genérica que se produce en nuestro país es la *arábica* y su producción se realiza por lo regular en las zonas tropicales. (SAGARPA, 2016)

Por otra parte la producción de café reportó su nivel mínimo desde que se tiene registro. Los principales factores que explican la disminución de la producción nacional durante la década reciente son la disminución de la superficie cosechada y la reducción de la productividad de los cafetales, relacionada principalmente con avanzada edad de las plantaciones, afectaciones climatológicas y por la roya del café. (USDA, 2016)

La roya de la hoja de café, causada por el hongo *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. (Uredinales) es la principal enfermedad de variedades susceptibles de *Coffea arabica* alrededor del mundo. Aunque todo su ciclo de vida ocurre en las hojas,

la clorosis y la defoliación afectan el llenado y la maduración de granos de café, reduciendo el tamaño y la calidad del grano. Variedades resistentes a la roya han sido criadas en varios países productores de café, incluidos México. (Castillo Zapata, 1992)

Sin embargo, actualmente se han generado estudios de la interacción planta-patógeno, que han permitido conocer los mecanismos de patogénesis de una gran cantidad de fitopatógenos, así como los mecanismos de defensa vegetal que utiliza la planta para contrarrestar a los patógenos, con lo cual el control biológico se ha visto fortalecido con nuevos compuestos y moléculas que son derivados de los fitopatógenos, microorganismos de control biológico, o incluso moléculas señal de la propia planta. Entre estas moléculas destacan los polímeros como la quitina y su derivado el quitosano que, en la actualidad por sus propiedades como inductores de mecanismos de defensa vegetal, además de su inocuidad para la salud humana y el medio ambiente, han surgido como fuertes candidatos para sustituir de manera efectiva productos químicos tóxicos y contaminantes. Los inductores de mecanismos de defensa vegetal que presentan un efecto protector en las plantas equivalentes a “vacunas”, al provocar un efecto de “encendido” o “priming” en la planta, que la prepara de manera efectiva contra el ataque de plagas y enfermedades utilizando sus propios mecanismos de defensa. En este sentido podemos encontrar derivados de microorganismos o plantas incluyendo metabolitos de bajo peso molecular, péptidos, proteínas y oligosacáridos, así como derivados químicos que presenta una toxicidad baja o nula. (Vera, 2014).

1.2 Revisión de literatura

1.2.1 Importancia económica del cultivo de café en el mundo

En la producción de café se distinguen dos variedades principales: arábica (*Coffea arabica*) y robusta (*Coffea canephora*). Las variedades más conocidas del café arábica son *Typica* y *Borbón*, pero a partir de éstas se han desarrollado muchas cepas y cultivares diferentes (BIOAGRO, 2002).

Las expectativas de crecimiento en la producción obedecen a la presencia de condiciones climatológicas más favorables para el cultivo, principalmente en Brasil. Para ese país, se estima que la producción cafetalera crezca a una tasa anual de 13.3 por ciento en 2016/17, por lo cual participaría con el 32.2 por ciento de la producción mundial. Por el contrario, se estima que la cosecha de Vietnam, Colombia e Indonesia descienda a tasas de 6.9, 2.2 y 14.9 por ciento, respetivamente. Lo anterior, debido a que sus cultivos se han visto afectados por condiciones de sequía (SIA-SAGARPA., 2015).

Entre los ciclos cafetaleros 2005/06 y 2015/16, la producción mundial de café creció a una tasa promedio anual de 2.7%. En el ciclo 2015/16 la cosecha global ascendió a 153.3 millones de sacos de 60 kg, es decir, el mismo nivel de producción del ciclo previo. Por tipo de café, el comportamiento de la cosecha fue diferenciado: la producción de café arábica disminuyó 0.4 por ciento, mientras que la de café robusta se incrementó en 0.6 por ciento a tasa anual (USDA, 2016).

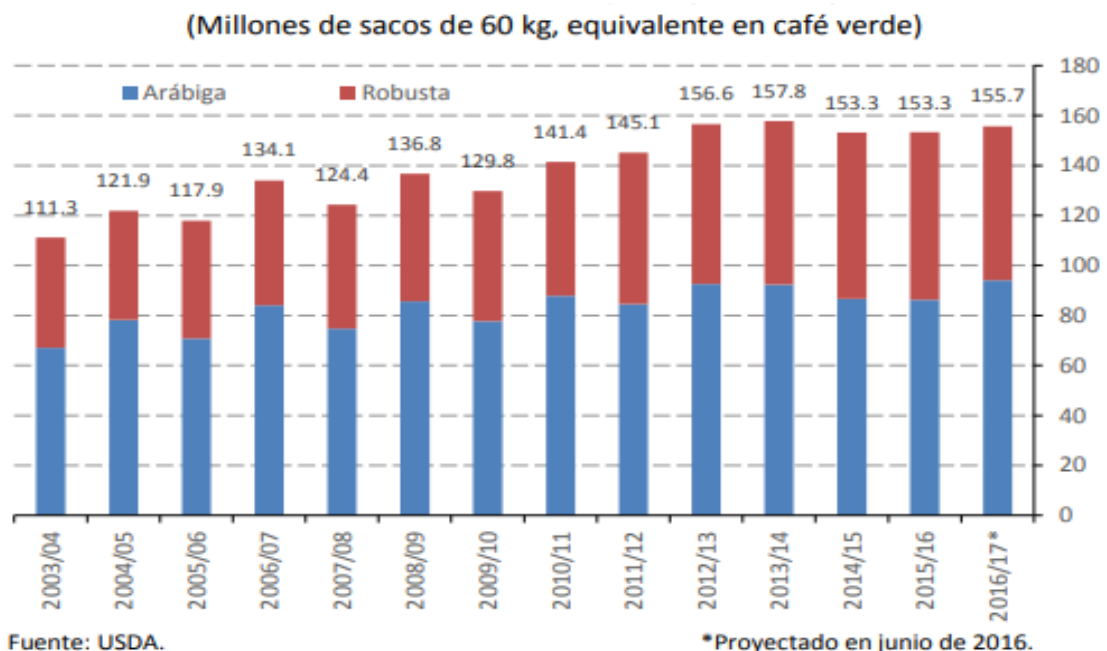


Figura 1.1 Producción mundial de café 2003-2016

1.2.1.1 Importancia económica del cultivo de café en México

Sin embargo, el sector cafetalero nacional enfrenta desde 1998 una crisis relacionada con la caída de los precios en el mercado internacional (García S., 2006). Esta crisis ha repercutido negativamente en las regiones cafetaleras mexicanas, donde actualmente se observan problemas como: aumento de la migración, abandono de las plantaciones, severo impacto ambiental por la tala de cafetales para cambio de cultivo o urbanización, alta incidencia de plagas y enfermedades que afectan la calidad del grano, bajos rendimientos y drástica caída del nivel de vida de los pobladores rurales que dependen de la caficultura (Aragón G., 2006).

La agricultura ecológica representa un buen negocio, una alternativa que aporta un beneficio social en un marco de libre comercio. Esto se sustenta a partir de que el café sustentable se distingue por repartir ganancias y beneficios más equitativos debido a que su cadena de acopio, distribución y comercialización no ha estado dominada por grandes compañías, lo que se traduce en ventajas para el pequeño productor. Por ello, estas alternativas de producción pueden ser una solución para mejorar la calidad de vida de los productores, al permitirles acceso a mejores precios, mientras que permiten conservar las características agroecológicas del lugar de cultivo (Pérez, 2005). Esta mejoría puede lograrse a partir de que los productos orgánicos cuentan con un sobreprecio frente a los productos tradicionales. El consumidor de café orgánico, y de cualquier producto orgánico en general, se caracteriza por ubicarse entre segmentos altos de ingresos y por ello ofrece un pago más alto por el producto, principalmente por el cuidado de su salud, y en algunos casos consciente de que al adquirirlo contribuye al cuidado del ambiente y a la mejora de la situación del productor (Sosa, 1995). La conversión hacia la producción de café orgánico podría considerarse como una medida de protección a los ingresos de los productores ante la incertidumbre mundial de los precios del mercado. En este sistema productivo, además de buscar un precio mayor por su producto, se participa de una estrategia de agricultura sustentable evitando la explotación irracional de la tierra, lo que garantizaría su permanencia en el tiempo.

1.3 Clasificación taxonómica del café

Existen numerosas especies de cafeto y diferentes variedades de cada especie. Las especies más importantes pertenecen al género *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (CONABIO, 2017).

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Sapindales*

Familia: *Anacardiaceae*

Género: *Coffea*

Especie: *Coffea arabica*



Figura 1.2 *Coffea arabica* var. *Típica*

1.3.1 Características de *Coffea arabica* var. *Tipyca*.

Los cafetos de la variedad *Typica* se distinguen por el color bronceado (rojizo) de las hojas que emergen tanto del ápice del eje central como de las ramas laterales, las plantas a libre crecimiento alcanzan hasta cuatro metros de altura, el tallo generalmente consta de un solo eje vertical con ejes verticales secundarios frecuentes que nacen de los nudos, presentan abundante ramas laterales, los frutos maduros se caracterizan por un color rojo vistoso y se desprenden fácilmente de la planta (Fischersworrning H & Robkamp R, 2001)

1.4 Propagación del cultivo de café

1.4.1 Propagación sexual

En la naturaleza, el café se reproduce por semillas. En *Coffea arabica*, después de un proceso de selección relativamente largo, unos veinte años como mínimo,

las variedades comerciales son propagadas por semillas. Esta selección permite obtener una variedad generalmente estable y homocigótica para los caracteres buscados. En *Coffea canephora*, planta alógama, la reproducción por vía sexual, da lugar a una recombinación de genes y por ende individuos diferentes a los dos padres (H. Etienne, 2002).

1.4.2 Propagación asexual

Para multiplicar cultivos con buenas cualidades agronómicas, se han utilizado métodos de multiplicación vegetativa, que permiten la multiplicación idéntica o clonación del material a gran escala (Etienne *et al.*, 1999). La multiplicación vegetativa juega un papel importante en especies perennes como el café, el cual puede ser propagado vegetativamente por medio de estacas o injerto (Solano, 2001). El injerto es una práctica utilizada fundamentalmente con miras a mejorar el crecimiento de ciertas especies y de ciertos híbridos o para reducir la duración de las generaciones. El injerto de *Coffea arabica* en *Coffea canephora* es una práctica muy utilizada para controlar nematodos. Las técnicas de injerto utilizadas son muy clásicas: injerto de púa por rajadura e injerto por aproximación (Coste, 1968) estableció la técnica de injerto de embriones de café, 23 cuya importancia radica en la recuperación de material que no se hubiera podido salvar en condiciones normales de germinación. Además, esta técnica permite el desarrollo de híbridos entre especies de café genéticamente apartados (Berthouly, 1997).

La reproducción por estacas es una práctica hortícola muy empleada en *Coffea canephora*, especie alógama, debido a la imposibilidad de reproducción uniforme por vía sexual (Solano, 2001). En la multiplicación vegetativa del café por estacas, se pueden utilizar solamente tallos ortotrópicos, esto debido al dimorfismo vegetativo. Si se llegara a utilizar estacas plagiotrópicos se obtendría un cafeto de porte rastroso y compacto, sin interés práctico (Coste, 1968). El número de estacas ortotrópicas que puede producir una planta de café es limitado y en el caso de una multiplicación a gran escala, esto puede conducir a lapsos de tiempo considerables entre la creación de una variedad y su posterior difusión. Además, la reproducción por estacas exige la instalación de jardines

clónales, lo que implica diversos problemas, entre ellos el mantenimiento de las superficies utilizadas (Berthouly, 1997). En tal sentido, el desarrollo de las técnicas de multiplicación in vitro ha revolucionado la multiplicación vegetal, ya que permite obtener plantas genéticamente mejoradas en gran cantidad, con gran rendimiento y se espera que a bajo costo (Solano, 2001).

1.4.3 Cultivo de tejidos en plantas de café

El cultivo de tejidos se define como el conjunto de técnicas que permiten cultivar un explante con potencial de diferenciación en un medio de cultivo de composición química definida, bajo condiciones de asepsia y bajo condiciones ambientales controladas.

Las técnicas de cultivo de tejidos son utilizadas en café principalmente con dos fines: i) recortar el ciclo de selección para *Coffea arabica L.* por medio de la micropropagación de híbridos y por la utilización de plantas haploides y ii) multiplicar rápidamente los genotipos de *Coffea canephora* en las regiones en donde la multiplicación por esquejes presenta problemas, o bien, para acelerar la instalación de jardines clónales (Berthouly, 1997).

1.4.3.1 Propagación por microestacas

La técnica de microestacas del cafeto fue desarrollada separadamente por Dublin en 1980 y en 1984 y por Custer en 1980, Berthouly, 1997, (H. Etienne, 2002). La propagación in vitro por microestacas, consiste en el cultivo de un nudo o entrenudo proveniente del vástago de la planta, con el fin de obtener nuevos vástagos mediante el desarrollo de yemas preexistentes o neoformadas, las cuales podrán, a su vez, proporcionar nuevos esquejes, o ser enraizados, obteniéndose así múltiples plantas, idénticas, en principio, a la planta madre (Solano, 2001). Esta técnica comprende tres fases: i) instalación del material vegetal in vitro, seguida de la obtención de micro tallos provenientes de la inducción de yemas axilares; ii) multiplicación de los micro tallos y iii) enraizamiento in vitro de los micro tallos y su aclimatación a condiciones de

invernadero. La principal ventaja de esta técnica es la garantía de una propagación genéticamente idéntica a la planta madre (Juma C, 1994) (Solano, 2001). Sin embargo, esta técnica sigue siendo una metodología costosa ya que tiene una manipulación muy alta, además, que ofrece una tasa de multiplicación limitada (Etienne H, 1999). La alta contaminación por bacterias y hongos y la oxidación fenólica que se manifiesta mediante la aparición de un color café en el medio de cultivo, en el cual se encuentran sembrados los explantes, representan problemas importantes que se presentan al utilizar la técnica de microestacas como metodología de propagación (Girón, 1998). Por estos motivos desde hace varios años las investigaciones se orientaron básicamente hacia el uso de la embriogénesis somática como herramienta de micropropagación (Berthouly y Etienne, 1999; Solano, 2001).

1.4.4 Propagación por embriogénesis somática.

La embriogénesis somática es la más clara expresión del fenómeno de totipotencia celular enunciado por (Haberland en 1902, Etienne *et al.*, 1999; Solano, 2001). La totipotencia, es la capacidad de las células vegetales para formar un nuevo individuo genéticamente idéntico a la célula madre (Berthouly, 1997). La embriogénesis somática es un proceso biológico por medio del cual se obtienen embriones perfectamente organizados a partir de células somáticas. Estos embriones somáticos se desarrollan al pasar por las fases (globular, torpedo y cotiledonar en plantas dicotiledóneas) idénticas a las del embrión cigótico (Ammirato, 1983). Los embriones somáticos presentan una estructura bipolar, con meristemos apicales y radicales en extremos de un mismo eje, en los cuales las características morfológicas son idénticas a las encontradas en los embriones cigóticos (Denchev *et al.*, 1992; Abdelnour y Escalant, 1994; Solano, 2001). Además, los embriones somáticos se caracterizan por no presentar conexión vascular con el tejido materno (Litz y Jarret, 1991). De manera general, la embriogénesis somática puede obtenerse por medio de dos estrategias: (i) una, denominada embriogénesis somática directa o embriogénesis somática de baja frecuencia y (ii) la otra, conocida como embriogénesis somática indirecta o

embriogénesis somática de alta frecuencia. Por medio de la embriogénesis somática directa o de baja frecuencia, se obtienen embriones directamente a partir de una célula individual o un grupo de células del explante, sin la formación previa de un callo. Esto ocurre, por ejemplo, con las células epidérmicas del hipocótilo en la zanahoria silvestre y en *Ranunculus sceleratus* (Sondahl *et al.*, 1991; Denchev *et al.*, 1992; Berthouly *et al.*, 1999; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002). En la embriogénesis somática directa, las células embriogénicas están presentes y lo único que se requiere para la formación de los embriones somáticos, es la presencia de una sustancia inductora o la eliminación de una sustancia inhibidora, para que estas células reanuden su actividad mitótica y su desarrollo embriogénico (Sondahl *et al.*, 1991; Quiroz *et al.*, 2002). Esta estrategia se caracteriza por permitir, después de 13-15 semanas de cultivo en el medio de inducción, la obtención rápida de embriones somáticos bien constituidos (Etienne *et al.*, 1999). La cantidad de embriones somáticos obtenidos por explante cultivado, de 1 a 10, es limitada en comparación a la cantidad obtenida a través de la embriogénesis somática indirecta (Berthouly, 1997). No obstante, presenta la ventaja de reducir considerablemente la variación somaclonal, obteniéndose una mayor uniformidad genética (Molina y Figueroa, 1996; Vicient y Martínez, 1998; Berthouly y Etienne, 1999). La embriogénesis somática indirecta o de alta frecuencia, permite la obtención de embriones a partir de callos, mediante el uso de dos medios de cultivo, uno de inducción de un callo embriogénico y otro para la regeneración de los embriones (Denchev *et al.*, 1992; Berthouly y Etienne, 1999).

1.5 Enfermedades relevantes en cultivo de café y sus características.

La especie *C. arabica* al ser producida por autogamia posee una base genética estrecha y por ende es susceptible a diferentes plagas y enfermedades tales como la roya (*Hemileia vastatrix*), la antracnosis (*Colletotrichum coffeanum*) y la broca del café (*Hypothenemus hampei Ferrari*), mientras que la especie *C. canephora* es menos susceptible, debido a la gran variabilidad genética que presenta, por ser una especie alógama (Berthouly y Etienne, 1999).

1.5.1 Características del género de Roya (*Hemileia vastatrix*)-clasificación taxonómica.

El principal causante de la baja producción en cultivos de café a nivel mundial es causada por el hongo biotrófico basidiomycete (*Hemileia vastatrix*). Se produce en casi todos los países donde se produce café. El patógeno causa lesiones en las hojas causando la defoliación. La temperatura óptima para la germinación de las esporas está entre 22°C y la incidencia en la variedad, C. arábica oscila alrededor del 30% de las pérdidas si la enfermedad no está controlada (Rozo., 2012).

Reino: *Fungi*

Phylum: *Basidiomycota*

Subphylum: *Puccinioniomycotina*

Clase: *Pucciniomycetes*

Orden: *Pucciniales*

Género: *Hemileia*

Especie: *Hemileia vastatrix*

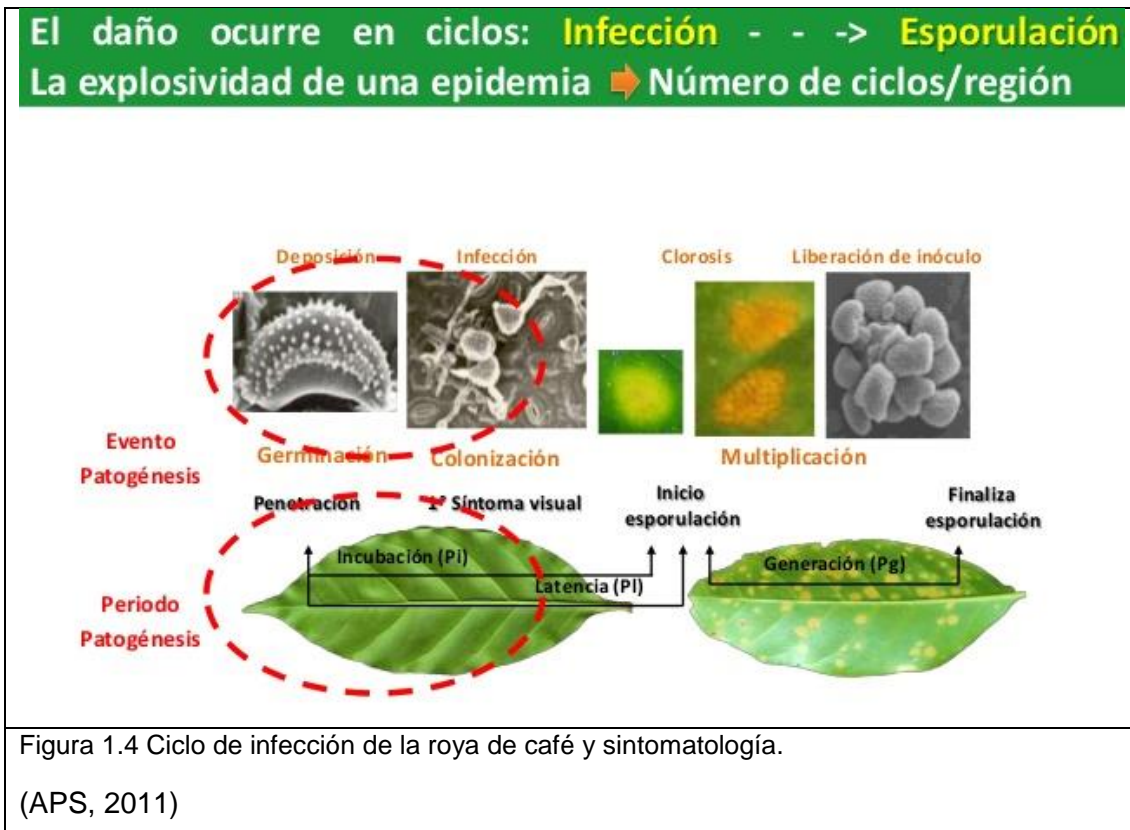
(SENASICA, 2016).



Figura 1.3 Síntomas de roya en planta de café

1.5.2 Ciclo de infección de la roya (*Hemileia vastatrix*)

Hemileia vastatrix es un parásito obligado, sobrevive únicamente en tejido vivo del hospedante, las urediniósporas pueden sobrevivir hasta por 6 semanas bajo condiciones ambientales secas. No se han reportado hospedantes alternos y no sobrevive en restos del cultivo (APS, 2011). En la actualidad existen diversas estrategias para controlar la roya, como son el control químico y biológico, como se explican en la siguiente sección



1.5.2.1 Control químico de la roya en planta de café

Los fungicidas a base de cobre fueron, por mucho tiempo, casi los únicos productos utilizados en el control de óxido de café, hasta que a partir de los años 60 surgieron nuevos productos de diferentes composiciones químicas, algunos de amplio espectro, y otros, de uso más específico

Aunque los fungicidas cúpricos (protectores) presentan eficacia comprobada en el control del óxido, desde que se aplica a intervalos de semanas (Bock, 1962), los fungicidas sistémicos presentan ventajas en relación con los protectores por ejercer un efecto curativo sobre las nuevas lesiones y la inhibición de la esporulación de las lesiones viejas. Los fungicidas sistémicos, entre ellos los del grupo químico de los triazoles, lanzados en el mercado después de 1976, han demostrado una elevada eficiencia en la reducción del inóculo residual, permitiendo el retraso del inicio de las pulverizaciones y la reducción de su número, cuando se aplican por medio de pulverizaciones o a través del sistema radicular (Silva- Acuña, 1990).

1.5.3 Control biológico de la roya de café

El control biológico puede definirse como el uso de un organismo para suprimir las actividades y poblaciones de otro organismo y se ha utilizado para manejar insectos plaga, patógenos y malas hierbas y otros tipos de plantas no deseadas.

En el control biológico, se utilizan las esporas o los filtrados de cultivos que actúan por medio de productos metabólicos que ejercen acción sobre la pared celular, membrana y ácidos nucleicos de sus hospederos o por micoparasitismo matando las estructuras invadidas directamente, reduciendo de esta manera la concentración de esporas o la densidad poblacional, y por ende el ataque de muchos hongos fitopatógenos de importancia económica (Elad y Katan, 1980).

El control biológico ofrece ventajas por su bajo costo, no contamina el ambiente, y no presenta problemas de residuos. Anteriormente el control biológico de enfermedades vegetales consideraba el uso exclusivo de organismos vivos para contrarrestar a los organismos patógenos, sin embargo, esta definición ha sido extendida a derivados de organismos e incluso a compuestos químicos que pueden mimetizar o disparar respuestas en la planta. Aunque la validación de estos productos en su mayoría ha sido bajo condiciones controladas, falta la transferencia a nivel de campo, para diferentes cultivos de importancia. Este conocimiento ha provocado una evolución del concepto del control biológico o manejo orgánico a un término mucho más adecuado como es un manejo de cultivo de bajo impacto ambiental. El control biológico actual puede clasificarse de acuerdo con su mecanismo de acción en 3 tipos principales (Sid Ahmed *et al.*, 2000; Castro-Rocha, 2012):

- 1.- Microorganismos antagonistas.
- 2.- Fortalecedores o precursores de la actividad antagónica u organismos benéficos.
- 3.- Inductores de mecanismos de defensa vegetal.

El control biológico de organismos tipo roya ha sido evaluado en muchos cultivos con buenos resultados y en el caso del cafeto se han usado microhongos y bacterias de la superficie de las hojas) para control de roya del cafeto (Ganley *et al.*, 2008, Jackson *et al.*, 2012.)

La recurrencia de las epidemias de roya junto con el impacto socio-económico y ambiental que conlleva la prevención, manejo y control de las mismas, principalmente mediante el uso de químicos fungicidas, son motivos significativos para más investigación y desarrollo de alternativas de control.

En el caso del cafeto, se han aislado hongos y bacterias endófitas a partir de hojas, frutas, raíces y semillas en diferentes países de América, África y Asia, con el propósito de caracterizar su diversidad y estudiar su potencial de controlar plagas y patógenos de este cultivo.

En cuanto a búsqueda de controladores biológicos de *H. vastatrix* en el microbioma del cafeto, se han reportado especies de bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* con capacidad de inhibir la germinación y reducir la incidencia de (Shiomi *et al.*, 2006).

1.5.3.1 Control biológico clásico.

Uso de un agente de control biológico que proviene del mismo sitio de origen y que ha coevolucionado con el organismo que se quiere controlar.

1.5.3.1.1 Control biológico aumentativo

Detección de enemigos naturales del organismo que se quiere controlar en sitios diferentes a su lugar de origen y el posterior aumento de los niveles del mismo en áreas seleccionadas para que los mismos supriman las actividades o poblaciones del organismo a ser controlado. En el caso particular del cafeto se ha evaluado esta estrategia para control biológico de *H. vastatrix* usando bacterias endofíticas y se han obtenido resultados prometedores en Brasil (Shiomi *et al.*, 2006.)

1.5.3.1.2 Control biológico mediante conservación

Manejo del ambiente para incrementar la sobrevivencia, capacidades fisiológicas y/o efectividad de un agente de control biológico sobre un organismo blanco en un área específica (Barbosa 1998).

1.5.3.2 Manejo integrado del cultivo de café (MIP)

Los métodos de combate, formados por un número variable de tácticas, pueden ser operados en un programa de MIP. Estos incluyen desde la utilización de medidas legales, como la erradicación y las cuarentenas, hasta la manipulación de los cultivos, las plagas y sus enemigos naturales (Andrews, 1989). Además de los métodos legales, en el MIP se incluyen el uso de enemigos naturales (combate biológico), el uso de cultivares de cultivos resistentes o tolerantes a enfermedades e insectos, una serie amplia de prácticas agrícolas, y el uso de los combates mecánicos, físicos, etológicos, autocidas y químicos.

Tipos de plaguicidas, según sus orígenes y propiedades: sintéticos o naturales, insecticidas, herbicidas, fungicidas, nematicidas, rodenticidas, otros.

- Agentes de combate biológicos: microorganismos, parasitoides y depredadores.
- Tácticas de combate con prácticas agrícolas.
- Tipos de cultivares resistentes.

(Coronado, 2000)

1.5.3.3 Microorganismos antagonistas

En el control biológico de fitopatógenos, los organismos antagonistas juegan un papel muy importante por presentar características de agresividad, persistencia, rápido crecimiento, desarrollo y capacidad de colonizar el medio donde se encuentra el agente causal de la enfermedad, aun en condiciones de "stress" nutricional.

El antagonismo como mecanismo se basa en la actividad inhibitoria directa que ejerce un microorganismo sobre otro y que presenta acciones opuestas en un

mismo sistema (Cotes, 1993). En la micro-biota del suelo existe una gran variedad de microorganismos que ejercen actividad antagónica contra patógenos de plantas, manteniendo de esta manera un equilibrio natural (Trapero, 2000).

1.5.3.3.1 *Trichoderma Harzianum*

El género *Trichoderma sp.* son unos de los organismos saprofitos naturales del suelo, los cuales le proporciona ventajas, tales como antibiosis, competencia por nutrientes, espacio y micoparasitismo, mecanismos que actúan coordinadamente. Su importancia en el proceso de bio-control depende de la cepa de *Trichoderma* empleada, al hongo que se requiere controlar, el tipo de planta o cultivo y algunas condiciones ambientales, como pH, disponibilidad de nutrientes, humedad relativa, temperatura y concentración de hierro (Benítez *et al.*, 2004).

En la rizósfera se presenta una competencia continua por espacio y alimento entre los microorganismos que la habitan. Ciertas especies de *Trichoderma sp.* tienen un potencial antagónico debido a su potencial para producir compuestos anti-fúngicos, enzimas extracelulares y sustancias antibióticas (Harman *et al.*, 1996). También a la capacidad de luchar por espacio y nutrientes frente a otros hongos. Fuera de estas características, es un agente promotor del crecimiento de las plantas e inductor de la resistencia sistémica (Hermosa *et al.*, 2000).

Trichoderma sp. tiene la capacidad de colonizar y adaptarse a diferentes clases de sustratos en condiciones controladas, generando como resultado una limitación del crecimiento de los organismos (Borrero y Silva, 2005).

1.5.3.3.2 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis pertenece a la familia *bacillaceae*, genero *Bacillus* es un bacilo Gram-Positivo catalasa-positivo, aerobico estricto (aunque puede crecer en vía anaeróbica), productor de endosporas, de antibióticos y matriz extracelular (biofilm) que comúnmente se encuentra en el suelo. El potencial de *B. subtilis*

se basa en la capacidad de moléculas bioactivas, que muestran fuertes propiedades antifúngicas, junto con la baja toxicidad, alta biodegradabilidad y características amigables con el medio ambiente en comparación con los pesticidas químicos (Chen *et al.* 2008).

1.5.3.4 Inductores de defensa vegetal

La defensa de las plantas al ataque de patógenos es un complejo de reacciones químicas armónicamente engranadas. Cuando un patógeno penetra un tejido vegetal, la planta inmediatamente reconoce al invasor y activa las alarmas internas para bloquear el ataque y frenar la infección. Los receptores de membrana captan la señal del invasor infeccioso y envían señales químicas al núcleo celular, donde se desencadena la síntesis de proteínas y sustancias de defensa.

Dentro de los mecanismos de defensa, se encuentran las reacciones hipersensibles, producción de fitoalexinas, formación de barreras estructurales, proteínas relacionadas con la patogénesis y la resistencia sistémica. La resistencia inducida es una forma de defensa activa que involucra la expresión diferencial de genes y cambios metabólicos que ocurren como consecuencia de un proceso de reconocimiento específico entre la planta y el patógeno. (Madriz, 2002).

Incluso la muerte celular programada es un mecanismo de respuesta, que mediante la lignificación de paredes celulares forma una red con compuestos de celulosa, pectina y hemicelulosa que actúan como barrera física (Greenberg, 1997).

1.5.3.4.1 Quitosano

El quitosano, también llamado quitosana, quitosan o chitosán, es un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β -(1-4) D-glucosamina (unidades desacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada). El quitosano se produce comercialmente mediante la desacetilación

de la quitina, que es un elemento estructural en el exoesqueleto de los crustáceos (cangrejos, gambas, camarones, jaibas, langostas, etc). El quitosano se emplea principalmente como un complemento en el crecimiento de las plantas, debido a sus propiedades como sustancia que permite promover la defensa de las plantas contra infecciones provocadas por hongos. La actividad fungicida del quitosano se ha estudiado, tanto in vitro (El-Ghaouth *et al.*, 1992) como in vivo (Li y Yu, 2001; Yu *et al.*, 2007). El quitosano inhibe a una multitud de especies de hongos, exceptuando, o siendo menos efectivo con aquellas que lo poseen en sus paredes celulares (Roller y Covill, 1999; Allan y Hardwiger, 1979). En la actualidad el uso del quitosano y sus derivados ha sido una nueva alternativa al promover la inducción de mecanismos de defensa vegetal contra diferentes fitopatógenos, incluyendo *Phytophthora sp.*, sensibilizándolas para responder más rápidamente a su ataque. El quitosano tiene otra propiedad como un agente antimicrobiano, al inhibir el crecimiento de hongos, bacterias y virus fitopatógenos. Los mecanismos de defensa que el quitosano activa es la síntesis de lignina y calosa, la inducción de la fenilalanina amonioliase (PAL), biosíntesis de fitoalexinas, producción de inhibidores de proteasas y proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) como son: quitinasas, glucanasas, peroxidasas (POD) y quitosanasas (Rodríguez-Pedroso, 2009). Otro estudio fue el realizado por (Falcón *et al.*, 2002), utilizaron al quitosano y su hidrolizado enzimático en plantas de tabaco, donde se determinó la capacidad para inducir marcadores de resistencia. Para esto se evaluó la actividad de la quitinasa, glucanasa y PAL contra *Phytophthora parasitica var. nicotianae*. Se mostró una inducción de la quitinasa y glucanasa por quitosano, en el caso del hidrolizado enzimático hubo una inducción de PAL y β 1-3-glucanasa. El quitosano es un compuesto natural que se ha observado que presenta un importante potencial para inducir una serie de reacciones de defensa. Por lo que, representa una buena alternativa en la sustitución de una amplia gama de plaguicidas de alta persistencia promoviendo de esta forma el uso de compuestos totalmente biodegradables y no tóxicos para los seres humanos y los vertebrados (Porrás *et al.*, 2009).

1.5.3.4.2 Fosfitos

Los fosfitos de potasio son producidos por reacción química del ácido fosforoso con hidróxido de potasio, y dan como resultado un compuesto que aporta fósforo y potasio en forma disponible y asimilable, que además de nutrir los cultivos, actúa como inductor de resistencia, frente al ataque de hongos fitopatógenos.

En estudios de aplicación de fosfitos vía foliar realizados en Rosa (*Rosa sp*), por (León *et al.*, 2015), se encontró que el fosfito de potasio mejoró la resistencia con 6.54% de incidencia y 8.13% de severidad para “Oídio” (*Sphaerotheca pannosa*); y con 7.11% de incidencia y 11.46% de severidad para “Mildiu veloso” (*Peronospora sparsa*).

1.5.3.5 Estudio de interacción planta - patógeno

La multifuncionalidad de los microorganismos en los sistemas agrícolas se expresa de acuerdo con una serie de factores bióticos, como la competencia con otros microorganismos, la composición biológica del suelo, el reconocimiento planta-microorganismo y viceversa. Igualmente, factores abióticos, como la climatología, las características físicas y químicas del suelo, que influyen directamente en el tipo de interacción de estos organismos y la expresión de los efectos benéficos o determinantes en el desarrollo de las especies vegetales (Radjacommare *et al.*, 2010). Es difícil predecir el resultado de las interacciones entre plantas y microorganismos benéficos del suelo y, más aún, entre las especies de microorganismos; no obstante, las comunidades microbianas asociadas con el sistema de raíces, se considera que desempeñan un papel clave en el desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles. La respuesta de las plantas a la inoculación depende de las compatibilidades funcionales en la fisiología y en la bioquímica de la interacción, entre los componentes microbianos; así arroja diferentes respuestas, dependiendo de la combinación de los microorganismos (Vázquez *et al.*, 2000).

En la interacción entre dos o más microorganismos se espera ver un tipo de reacción tanto de la planta como el huésped que se encuentra en ella, en el caso de interacción planta-patógeno se espera una interacción de parasitismo de

parte del patógeno, ya que este se beneficia y la planta es afectada, pero cuando también está en interacción un antagonista el esquema cambia de parasitismo del patógeno con la planta a competencia del patógeno con el antagonista ya que la función de este es contrarrestar la actividad patogénica y además de que su interacción con la planta es protocooperación y ambos pueden ser beneficiados. En el caso de *Trichoderma sp.* la interacción que realiza contra algunos patógenos puede diferir ya que interactúa de diferentes maneras cuando entra en contacto con un patógeno, unas de sus funciones son el micoparasitismo ya que inhibe al patógeno invadiendo su crecimiento, otra acción que realiza *Trichoderma sp.* contra patógenos, es la alelopatía ya que mediante este tipo de interacción perjudica o elimina al patógeno expulsando sustancias químicas que pueden afectar seriamente los procesos por el cual el patógeno establece su interacción con la planta. También el patógeno interactúa de forma similar con la planta ya que produce enzimas que penetran la pared celular comenzando así su infección.

En el caso de la interacción planta-antagonista, esta se realiza en forma de protocooperación ya que los dos se benefician o en casos se realiza en forma de facilitación en la que al menos uno de los dos es beneficiado, en este caso *Trichoderma sp.* se beneficia al colonizar la raíz de la planta ya que puede desarrollarse y de esta forma la planta es beneficiada al tener su raíz protegida de patógenos, además de que *Trichoderma sp.* tiene mecanismos inductores de defensa mediante enzimas que sirven de señal de activación para que los mecanismos de defensa vegetal de la planta entren en función. En algunos trabajos en los que se han evaluado este tipo de interacciones, se ha corroborado que *Trichoderma sp.* es capaz de inducir los mecanismo de defensa de las plantas, como en el trabajo realizado por (Marra *et al.*, 2006), ellos estudiaron la interacciones entre dos patógenos *B. cinerea* y *R. solani* en confrontación con *T. atroviride* en plantas de frijol, donde observaron que el proteoma de la planta, proteínas relacionadas con la patogénesis específica y otros factores relacionados con la enfermedad (es decir, genes de resistencia potenciales) parecen estar asociados con la interacción con uno de los dos patógenos y / o *T. atroviride*. Esta conclusión está de acuerdo con la capacidad

demostrada de *Trichoderma sp.* para inducir resistencia sistémica contra diversos patógenos microbianos.

1.5.3.6 Mecanismos de defensa vegetal – respuesta de la planta al ataque del patógeno

Las plantas poseen mecanismos preformados e inducibles para resistir patógenos.

Invasión: Existen barreras morfológicas denominadas metabolitos secundarios o (fitoalexinas), y las proteínas antimicrobianas que deben ser evitadas o superadas para que los patógenos puedan invadir una planta. Una vez que el contacto ha sido establecido, inductores producidos y lanzados por el patógeno inducen mayor defensa a la planta, que comprende el esfuerzo de las paredes celulares como la producción de fitoalexinas y la síntesis relacionada con la defensa (Slusarenko *et al.*, 2000).

Las plantas poseen resistencia contra sus patógenos que en su caso puede ser superada, manipulada o reprimida por patógenos para permitirles una infección exitosa (Cui J. *et al.*, 2005, Nomura K. *et al.*, 2005, Schulze-Lefert P. 2004, Zimmerli L. *et al.*, 2004).

Existen compuestos de señalización los cuales forman parte de los mecanismos de defensa de las plantas como el ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) o etileno (ET), producidos durante la infección. (Kunkel BN, Brooks DM. 2002).

1.6 Planteamiento del problema

El café es un cultivo de importancia en México. Uno de sus principales problemas fitosanitarios es la roya amarilla del cafeto causada por el parasito obligado (*Hemileia vastatrix*). La Roya es la enfermedad más destructiva del cafeto y la de mayor importancia económica a nivel mundial, debido a que provoca la caída prematura de las hojas, propiciando la reducción de la capacidad fotosintética, así como el debilitamiento de árboles enfermos y en infecciones severas puede ocasionar muerte regresiva en ramas e incluso la muerte en árboles. A su vez, el cultivo de café es considerado como el producto agrícola más importante en el comercio internacional, y una mínima reducción en el rendimiento o un ligero aumento en los costos de producción de este cultivo por efecto de *H. vastatrix*, puede tener un gran impacto en los países cuyas economías son totalmente dependientes de las exportaciones. El impacto económico de *H. vastatrix* en el cultivo de café no solo se debe a la reducción de la cantidad y la calidad de la producción, sino también a la necesidad de implementar costosas medidas de control en los cultivares susceptibles. La base racional para el manejo químico de la roya del café es el aspecto fenológico de la planta, para entender el periodo de mayor susceptibilidad e impacto en el manejo. Sin embargo, el manejo químico tiene el inconveniente de su toxicidad y un impacto negativo del medio ambiente. Por este motivo, se hace necesario el desarrollo y evaluación de nuevas tecnologías para el control de la enfermedad de bajo impacto ambiental que incluye microorganismos de control biológico (*Trichoderma sp.*, *Bacillus subtilis*) y bioestimulantes (elicitores o inductores de defensa vegetal, quitosano BTH, etc.). Para lograr estas evaluaciones es indispensable contar con plantas sanas (libres de patógenos), de tal manera que nos permita asegurar que las respuestas y efectos observadas durante las evaluaciones no sean por patógenos externos. En este trabajo se busca evaluar la inducción de mecanismos de defensa de plántulas de café libres de patógenos para el control de la roya amarilla del café.

1.7 Justificación

En 1974 la roya anaranjada del café llegó al continente luego de un largo trayecto por varias regiones desde su origen en África. Logró prosperar debido a que se completaron los componentes del llamado triángulo de la enfermedad: la presencia de *H. vastatrix* en nuestro continente, planta hospedera susceptible y condiciones climáticas favorables. La roya amarilla del cafeto es una de las enfermedades más graves de la planta del café, ya que limita seriamente la producción del grano a escala mundial. En México representa un gran peligro, puesto que existen muchas regiones productoras de este grano principalmente el estado de Chiapas, con variedades de plantas muy susceptibles a ella, a tal grado que en el ciclo 2013-2014 alcanzó niveles epidémicos y la producción del café se redujo un 23%. Esta enfermedad es provocada por el hongo *Hemileia Vastatrix*, que ataca a las hojas y provoca debilitamiento de la planta en plazos muy cortos.

En 1974 la roya del café llegó al continente americano y debido a las condiciones ambientales propicias como: la salpicadura de las lluvias que dispersa el hongo entre las hojas y entre plantas; las temperaturas entre 21 °C y 25 °C; lluvia abundante con la que una capa de agua se queda en las hojas durante varias horas; baja intensidad luminosa que permite la germinación de las esporas provocó que esta enfermedad se propagara por todos los cultivos cafetaleros. (Huerta.ECOSUR., 2016).

La demanda actual de café en el mercado mundial exige elevar la producción para de esta manera poder competir en calidad y precio. Una producción alta de café solo puede lograrse mediante la contribución de varios factores: a) uso de variedades resistentes b) densidad de siembra adecuada, c) control fitosanitario. (Carvajal, 1984)

Debido a la grave crisis por la que atraviesa el cultivo de café a causa de los problemas fitosanitarios ocasionados por el hongo *Hemileia vastatrix* es necesario mantener el cultivo, incrementar rendimiento con base a la identificación y propagación de (variedades resistentes y mejoradas y darle un manejo integrado al cultivo), con un enfoque sustentable.

Atendiendo el problema de la roya en cultivos de café en la región sur del país y teniendo en cuenta las altas problemáticas de los productos convencionales utilizados en la actualidad que son de origen químico causantes de daño a la salud, se requiere utilizar nuevas alternativas de control de la enfermedad, de tal manera que el presente trabajo tendrá como objetivo; evaluar diferentes bioestimulantes en el control de la roya amarilla en plántulas de café propagadas in vitro, para así identificar nuevas variedades con resistencia que servirán como incremento en producción del café en el país.

1.8 Hipótesis

El quitosano como bioestimulante en plantas de café tendrá un efecto de inducción de resistencia contra la roya amarilla (*Hemileia vastatrix*).

1.9 Objetivos

1.9.1 Objetivo general

Evaluar diferentes bioestimulantes e inductores en el control de la roya (*Hemileia vastatrix*) en plantas de café provenientes vivero como plantas propagadas in vitro.

1.9.2 Objetivos particulares

- Establecer y evaluar diferentes estrategias de propagación de plantas de café (*Coffea arabica*) a partir de semillas.
- Evaluar el efecto de bioestimulación de cepas nativas de *Trichodermas sp.* en el desarrollo de plántulas de café
- Establecer el modelo de infección de *Hemileia vastatrix* bajo condiciones controladas.
- Evaluación de la efectividad biológica *in vitro* del quitosano contra la roya (*Hemileia vastatrix*) en plantas de café

1.10 Estructura y desarrollo del escrito de tesis

Los resultados se presentan en tres secciones, cada uno enfocado al cumplimiento de los objetivos específicos.

En el primer capítulo se desarrolla la introducción, el marco teórico (revisión bibliográfica), el planteamiento del problema, la justificación, la hipótesis y los objetivos.

En el segundo capítulo se evaluó y comparó el desarrollo del café en diferentes sistemas de propagación, partiendo de la germinación de semillas.

En el tercer capítulo se evaluó el efecto en el desarrollo y bioestimulación de diferentes cepas de (*Trichoderma sp.*) en plántulas de café (*Coffea arábica*) en condiciones in vitro y ex vitro.

En el cuarto capítulo se evaluaron diferentes condiciones de infección de la roya (fotoperiodo, temperatura, humedad relativa), para generar inóculo del hongo (*Hemileia vastatrix*) en cafetos.

En el quinto capítulo se describe la evaluación de los efectos en los mecanismos de defensa vegetal contra la roya de café *Hemileia vastatrix* con el uso previo de quitosano (alto peso molecular) en plantas de café.

En el sexto capítulo se realiza una discusión general de los resultados de la tesis.

1.10.1 Bibliografía

Allan, C. R. (1979). The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental Mycology*, 3: 285–287.

APS. (2011). *Coffee rust (Hemileia vastatrix)*. *The American Phytopathological*, 75-127.

Aragón G., C. (2006). Aragón G., C. Cafecultura, inequidad y pobreza. Productores indígenas de café de la sierra nororiente de Puebla. Problemas y alternativas. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Colegio de Postgraduados. Colegio de Postgraduados.

Becker-Raterink, S. M.-R. (Gesellschaft Fur Technische Zusammen arbeit (GTZ)). (1991). La roya del cafeto. Conocimiento y control. Rossdorf, Alemania. Deutsche, 281.

Berthouly, M. (1997). Biotecnologías y técnicas de reproducción de. Memorias del XVII Simposio Latinoamericano de Caficultura. Heredia, Costa Rica, 25-49.

BIOAGRO. (2002). Estrategias de control de la roya del cafeto con la aplicación de fungicida protector y sistémico.

Bock. (1962). Dispersal of uredospores of *Hemileia Vastatrix* under field conditions. *Trans. Brit. Mycol* , 45; 63-74.

Carvajal, J. F. (1984). Cafeto-cultivo y fertilización. Berna Suiza. Instituto Internacional de la Potasa., 134-138 y 254.

Castillo Zapata, J. (1992). Virulencia de *Hemileia vastatrix* determinada por medio de plantas diferenciales de café en Colombia. *Cenicafé (Colombia)*, 114-124.

CONABIO. (2017). Banco Nacional de Germoplasma Vegetal. Obtenido de www.conabio.gob.mx/remib/bangev-uach.html

Coronado, J. A. (2000). Coronado, James, Análisis de las investigaciones en Fito protección publicadas en la Revista MIP (Manejo Integrado de Plagas). Editorial Limusa. Mex.

- Coste, R. (1968). Le caféier. G.P. Maisonneuve et Larose. Pris: 310 p.
- Cui J, Bahrami AK, Pringle EG, Hernandez-Guzman G, Bender CL, et al. 2005. *Pseudomonas syringae* manipulates systemic plant defenses against pathogens and herbivores. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:1791–96
- Etienne H, B. E. (1999). Aportes de la. Desafíos de la caficultura en Centroamérica. Bertrand B, Rapidel B, eds. IICA.. San José, Costa Rica, 457-495.
- Falcón, A., Ramírez, M. A., Márquez, R., & Hernández, M. (2002). Chitosan and its hydrolysate at tobacco-*Phytophthora parasitica* interaction. Cultivos Tropicales, 23: 61-66.
- Fischersworing H, B., & Robkamp R, R. (2001). Guía para la caficultura ecológica. 3 Ed. Popayán, GTZ.
- García S., B. F. (2006). Factores que limitan la certificación de café orgánico en el esquema de comercio justo en cinco organizaciones de México. Revista Mexicana del Caribe X (19)., 205-226.
- Girón, I. (1998). Desarrollo y maduración de embriones somáticos de híbridos F1 de *Coffea arabica* para una producción masal. Magister Scientiae. Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical, 92.
- H. Etienne, F. A. (2002). Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, 138ñ.
- Huerta.ECOSUR., P. (2016). Como contener la roya del café. Obtenido de <http://biblioteca.clacso.edu.ar/gsd/cgi-bin/library.cgi?c=mx/mx-049&a=d&d=article1662oai:>
<http://revistas.ecosur.mx/ecofronteras/index.php/eco/article/view/1662>
- Juma C, M. J. (1994). Tissue Culture for Coffee: The case of Uganda. Biotechnology and Development Monitor, 19-20.
- Kunkel BN, Brooks DM. 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. Curr. Opin. Plant Biol. 5:325–31.

- León, F. F. (2015). Respuesta del cultivo de rosa (*Rosa* sp.), a tres fuentes de fosfitos en aplicación al suelo y follaje como inductores de resistencia y calidad de flor. Ayora, Pichincha (pág. 92). Ecuador: Quito: UCE.
- Li, H. Y. (2001). Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(2):269 - 274.
- Li, Y., & X. G. Chen, N. L. (2007). Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates. *Carbohydrate Polymer*, 67: 227–232.
- Lorenzo, J. G. (1998). Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 54: 197-200.
- Madindra. (1988). Obtenido de <http://cenida.una.edu.ni/Tesis/tnh10b456.pdf>
- Marra, R. A. (2006). Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. *Current Genetics*, 50:307-321.
- Mestries B., F. (2006). Migración internacional y campesinado cafetalero en México. Fases circuitos y trayectorias migratorias *Análisis Económico XXI* (46).
- Mordocco, B. J. (2009). Development of a temporary immersion system (RITA®) for mass production of sugarcane (*Saccharum spp. interspecific hybrids*). *In Vitro Cell Dev*, 450-457.
- Nomura K, Melotto M, He S-Y. 2005. Suppression of host defense in compatible plant *Pseudomonas syringae* interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8:361–68.
- Pérez, P. (2005). Cadenas Globales y Café en México. *Cadenas Globales y Café en México*, 69-86.
- Porrás, A. P. (2009). Importancia de los Grupos fenólicos en los alimentos. *Temas selectos de ingeniería en alimentos*, 1: 121-134.
- Quiroz-Figueroa. (2006). Direct Somatic Embryogenesis in *Coffea canephora*. *Methods in Molecular Biology* (pág. 318).

- Rodríguez-Pedroso, A. T. (2009). Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. *Chapingo Ser.Hortic* 3: 307-317.
- Roller, S. a. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 47: 67–77.
- Rozo., E. C. (2012). Aggressiveness and genetic diversity of *Hemileia vastatrix* during an epidemic in colombia. *Journal of phytopathology*, 160: 732-740.
- SAGARPA. (2016). Panorama Agroalimentario I cafe 2016. Dirección de Investigación y evaluación Económica y Sectorial, 34.
- SENASICA. (2016). Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix Berkeley y Broome*). Dirección General de Sanidad Vegetal. Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanotaria . México D.F. Ficha Técnica No.40, 23.
- SIA-SAGARPA. (2015). Convención Internacional del Café en México.
- Silva- Acuña. (1990). Control Químico de la Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*) con el uso de fungicida sistémico y uno protector. *Fitopatología Venezolana* 3, 2: 22-27.
- Schulze-Lefert P. 2004. Knocking on heaven's wall: pathogenesis of and resistance to biotrophic fungi at the cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:377–83.
- Slusarenko AJ, Fraser RSS, Van Loon LC. 2000. Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. Dordrecht: Kluwer. 620 pp.
- Solano, W. (2001). Efecto de las Características de Cultivo en Suspensión. Universidad de Costa Rica, 50-87.
- Sosa, L. (1995). Cooperativa Tosepan Titataniske: Plan de conversión de café orgánico. Conferencia Internacional sobre café orgánico (memoria). AMAE, IFOAM, UACH, 77–79.
- USDA. (2016). PRODUCCIÓN MUNDIAL DE CAFÉ, 2003/04 -2016/17. PROGRAMA Agroalimentario, 37.

Vázquez, M., César, S., Azcón, R., & Barea, J. (2000). Interactions between *arbuscular mycorrhizal fungi* and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in *The rhizosphere* of maize plants. *Applied Soil Ecology*, 15:261-272.

Vera, G. (2014). *Mecanismos de defensa inducidos*. Zapopan.

2. CAPÍTULO 2.

2.1 Evaluación de germinación y desarrollo de plántulas café (*Coffea arabica*) en diferentes sistemas de propagación in vitro.

2.1.1 Resumen

Se evaluó la germinación y el desarrollo de cafeto en diferentes sistemas de propagación convencional y biotecnológica, todas las semillas se sometieron a un tratamiento de desinfección y se colocaron en sustrato (estéril y no estéril), en papel filtro, en un sistema cerrado con medio (semisólido) y en el sistema de inmersión temporal (SIT) bajo condiciones in vitro (25°C en fotoperiodo, 16h luz) durante 40 días. A los 14 días de evaluación se obtuvo el 100% de germinación en todos los sistemas, excepto en sustrato no estéril (8.33% de germinación), en cuanto al desarrollo de la plántula el único sistema que desarrollo los cotiledones y hojas verdaderas fue el SIT, mientras que en los otros sistemas ninguno desarrollo os cotiledones, hasta el último día de evaluación, por lo que el mejor tratamiento para obtener plántulas en menor tiempo es el SIT.

Palabras clave: *Coffea arabica*, sustrato, Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), germinación *in vitro*, Papel filtro, plántulas, cotiledones.

2.1.2 Introducción

El café (*Coffea arabica*.) es una planta originaria de Etiopía donde se desarrolla a una altura de 1,000 a 2,000 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) y a una temperatura de 10 °C a 20 °C, las variedades y especies de café se desarrollan y adaptan bien en las regiones de la zona tropical. (Haarer, A. E., 1958)

En los últimos 10 años el café reportó su nivel mínimo en producción a nivel nacional con 835.380 Toneladas de café en cerezo. México cuenta con condiciones ideales para el cultivo del café, con zonas montañosas del sureste del país que se encuentran a altitudes mayores a 900 metros sobre el nivel del

mar, así como temperaturas que van de los 17.5 a 25.3°C. La caficultura en el país representa una actividad fundamental en el sector agrícola, no sólo por el valor de su producción, sino además por ser un importante generador de divisas, además por las bondades que ofrece al ser un cultivo de gran relevancia ambiental, puesto que el 99% de los predios cafetaleros se establecen bajo sombra (SIA-SAGARPA., 2015).

Por otra parte la producción de café reportó su nivel mínimo desde que se tiene registro uno de los principales factores que explican la disminución de la producción nacional durante la década reciente son la disminución de la superficie cosechada y la reducción de la productividad de los cafetales, relacionada principalmente con la avanzada edad de las plantaciones y afectaciones de la roya de la hoja de café, causada por el hongo *Hemileia vastatrix* (*Uredinales*) es la principal enfermedad de variedades susceptibles de *Coffea arabica* alrededor del mundo. Aunque todo su ciclo de vida ocurre en las hojas, la clorosis y la defoliación afectan el llenado y la maduración de granos de café, reduciendo el tamaño y la calidad del grano (SAGARPA, 2016).

En la naturaleza, el café se reproduce por semillas (Coste, 1968). En *Coffea arabica*, después de un proceso de selección relativamente largo, unos veinte años como mínimo, las variedades comerciales son propagadas por semillas en viveros. Esta selección permite obtener una variedad generalmente estable y homocigótica con los caracteres buscados (Etienne *et al.*, 1999). Otra de las técnicas usadas en la multiplicación de plantas, es la propagación vegetativa, que permiten la multiplicación idéntica o clonación del material a gran escala (Etienne *et al.*, 1999; Solano, 2001). La multiplicación vegetativa juega un papel importante en especies perennes como el café, el cual puede ser propagado vegetativamente por medio de estacas o injerto (Coste, 1968; Solano, 2001). Los nuevos avances en la biotecnología generaron nuevas técnicas en propagación de plantas entre las cuales se encuentra la propagación por microesquejes, que consiste en el establecimiento de nudos o entrenudos proveniente del vástago de la planta, con el fin de obtener nuevos vástagos mediante el desarrollo de yemas preexistentes, las cuales podrán, a su vez, proporcionar nuevos esquejes,

o ser enraizados, obteniéndose así múltiples plantas idénticas a la planta madre (García y Rafael, 1989; Solano, 2001).

La propagación in vitro es una herramienta muy efectiva para generar plantas en la mayor parte del año, sin embargo, la tendencia por introducir nuevas tecnologías ha sido cada vez más progresiva, por lo que se implementó la semiautomatización de la micropropagación por sistemas de inmersión temporal (SIT) que ofrece una estrategia practica en la reducción de costos de producción (Mordocco, 2009). Los SIT son biorreactores semiautomatizados diseñados para la propagación masiva de tejidos, embriones u organelos con medio líquido. El principio de estos sistemas es la inmersión de explantes tiempo y frecuencia determinado. Se ha demostrado que los SIT son herramientas poderosas para la micropropagación de plantas (Lorenzo, 1998).

Debido a la lenta y baja propagación de plantas de café en vivero con altos problemas fitosanitarios como la roya de café (*Hemileia vastatrix*) y por la baja germinación al ser una semilla recalcitrante, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas mediante el uso de herramientas biotecnológicas (técnicas de cultivo de tejidos in vitro en medio semisólido y SIT), como alternativas para la rápida propagación clonal de cafetos, libre de patógenos e independiente de la influencia estacional del ambiente para satisfacer la demanda de plántulas con mejor calidad, libres de enfermedades y en menor tiempo. Por lo anterior en este trabajo se evaluaron diferentes estrategias de propagación de semillas de café (*Coffea arábica*)

2.1.3 Materiales y métodos

2.1.3.1 Material vegetal.

Se recolectaron semillas de café (*Coffea arabica* var. *Typica*) de huertos de traspatio ubicados con las coordenadas (20°24'44"N 103°23'30"W), Municipio de Tlajomulco Zúñiga, perteneciente a la región centro del estado de Jalisco. Las semillas se trasladaron a las instalaciones del Tecnológico Nacional de México Campus Tlajomulco en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Planta Piloto para ser procesadas.



Figura 2.1 Recolecta de café (*Coffea arabica*) en huertas de traspatio San Miguel Cuyutlán, Tlajomulco de Zúñiga Jalisco.

A). Planta de Café (*Coffea arabica*), B). Semillas de café

Las semillas se lavaron con agua corriente, se despulparon manualmente (eliminación de pericarpio, pulpa, capa de pectina y pergamino) y se sometieron a una solución de cloro al 10% con 1mL de tween 80 por litro de solución durante 15 min, posteriormente se enjuagaron con agua corriente y se secaron en un secador de charolas (marca Polinox modelo TABIM094) a una temperatura de $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, ver figura 2.2, posteriormente las semillas se conservaron en un frasco de vidrio a temperatura ambiente (aproximadamente a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$) para su posterior uso.



Figura 2.2 Proceso de cosecha, lavado, despulpe y secado de semillas de café

2.1.3.2 Sistema de Inmersión temporal (SIT).

Para el armado de biorreactores, Sistema de Inmersión Temporal (SIT), se efectuó de acuerdo a Berthouly y colaboradores (2005). Se emplearon frascos de vidrio con capacidad de medio litro con tapas metálicas, se realizaron dos orificios a la tapa, en los cuales se fijaron fitting de plástico para fijar las mangueras al sistema con su respectivo filtro hidrofóbico de 0.22 micras. Se

realizó la conexión de dos frascos a través de las mangueras (ver figura 2.3A), y se instalaron en el sistema previamente armado, conectado a un compresor de aire para permitir los recambios de medio de un frasco a otro para permitir la inmersión del explante en el medio de cultivo (ver figura 2.3B).

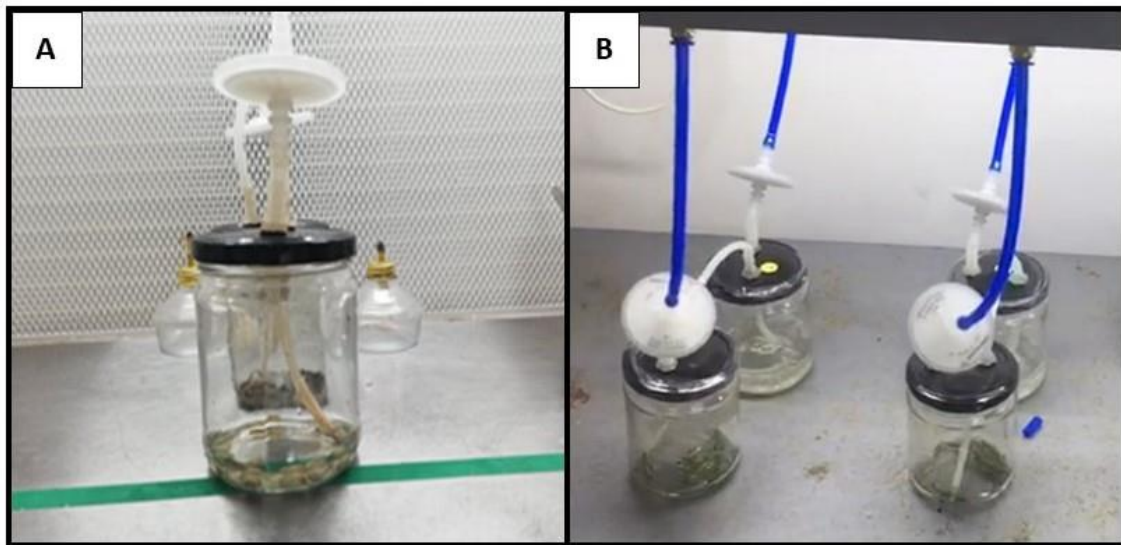


Figura 2.3 Armado de biorreactores tipo Sistemas de Inmersión temporal (SIT).

A. Frascos gemelos conectados entre sí por medio de mangueras y filtros; B. Biorreactores tipo SIT conectados al compresor

2.1.3.3 Protocolo de desinfección de semillas de café

Para el establecimiento de las semillas en condiciones *in vitro*, las semillas despulpadas y secas (ver sección 2.1.3.1.) se les eliminó manualmente el endocarpio (pergamino) y se sometieron a un proceso de desinfección en condiciones asépticas con soluciones estériles, se colocaron las semillas en una solución desinfectante con benomilo (1g L^{-1}) y estreptomina (0.3 g L^{-1}) durante 20 minutos, posteriormente se realizaron 3 enjuagues con agua destilada, enseguida se colocaron en una solución al 30% de cloro comercial (cloralex) durante 20 minutos y se les dio tres enjuagues con agua destilada, después se sometieron en etanol al 70% por 2 minutos y se realizaron nuevamente 3 enjuagues con agua destilada, finalmente se transfirieron en una solución con 0.1 g L^{-1} ácido ascórbico y 0.15 g L^{-1} ácido cítrico durante 1 minuto y se transfirieron en el medio semisólido en condiciones de obscuridad a $27\pm^{\circ}\text{C}$

2.1.3.4 Preparación de Medio de Cultivo para la germinación

Se preparó medio de cultivo ZG para la germinación de la semilla de café (Quiroz et al., 2006) suplementado con 0.1 mg L^{-1} de ácido naftalenacético (ANA) y 0.5 mg L^{-1} de cinetina, también se adicionó 30 g L^{-1} de sacarosa y 4 g L^{-1} de gelrite. Se ajustó el pH a 5.8 antes de adicional el gelificante, en el caso del medio semisólido y para los biorreactores se realizó el mismo medio de cultivo sin adicionar el gelificante. Para el caso de los otros tratamientos se preparó una mezcla de sustrato al 60% de peat moss, 20% perlita y 20% dolomita, agregándole agua destilada para llevar el sustrato a capacidad de campo para su posterior esterilización a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ a 117 kPa , durante 20 minutos.

2.1.3.5 Establecimiento del Experimento

Una vez desinfectadas las semillas fueron transferidas a los siguientes tratamientos: TG0 (Control) Sustrato no estéril 2:1:1 (Peat moss, Perlita y Dolomita). TG1. Sustrato estéril; TG2. Semillas en papel filtro, TG3. Semillas en medio semisólido y TG4. Semillas en biorreactor (SIT), tiempo de inmersión 1 minuto cada 6 horas. Los tratamientos TG0, TG1, TG2, TG3 se mantuvieron en un sistema cerrado (sin intercambio gaseoso), además todos los tratamientos se mantuvieron en las siguientes condiciones $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo 16h durante 22 días. La evaluación de la germinación se realizó los días 3, 5, 7, 10, 15 y 22, se consideró que la semilla germinó cuando la radícula rompe la testa (ver figura 2.4).

2.1.3.6 Evaluación de Desarrollo de Café

Después de germinadas las semillas se evaluaron a los 40 días los siguientes parámetros de desarrollo de la plántula: longitud de la planta (LP), longitud del hipocótilo (LHP), número de cotiledones desarrollados (C), número de hojas verdaderas (HV), número de raíces (NR), longitud de raíz principal (LRP), peso fresco (P-F) de cada uno de los tratamientos. Cabe aclarar que el parámetro de L-P se consideró la longitud a partir de la base del tallo hasta el ápice de la plántula.

2.1.3.7 Diseño Experimental

Para el experimento de germinación de semillas y desarrollo de plántulas el diseño experimental fue de bloques completamente al azar, los datos presentados corresponden a la media de cuatro replicas, cada una con 3 semillas. Los datos fueron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias fue determinada por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

2.1.4 Resultados y discusiones

Durante la evaluación de la germinación de semillas de café (*Coffea arábica*), se consideró que la semilla germinó, cuando se observaba la protusión de la radícula, figura 2.4D-E, mientras que en la figura 2.4A-C, se muestran las semillas sin germinar, es decir que la radícula aún no ha logrado romper las cubiertas seminales de la semilla. Una vez establecido el criterio de germinación se observó que en el tratamiento T0 (sustrato son esterilizar), no se presentó germinación de semilla hasta el día 14 con un 8.33% de germinación de semilla, esto pudo deberse a que en el sustrato no estéril probablemente se encontraban microorganismos que pudieron afectar el proceso de germinación de la semilla. Para el sustrato estéril (TG1) el día 7 presentó un 25% de germinación incrementándose el día 11 y 14 con un 91.7 y 100% respectivamente. En el caso de la germinación de semilla en papel filtro (T2) fue el segundo tratamiento que tardo más tiempo en germinar, presentando una germinación de 8.33%, 41.67% y 100% en los días 7, 11 y 14 respectivamente. En el caso de tratamiento en medio de cultivo (T3), se aceleró el proceso comparado con los otros tratamientos (TG0, TG1 y TG2), en el que se obtuvo 41.67% de germinación desde el día 7 y el día 11 se obtuvo el 100% de germinación de semilla. El tratamiento en biorreactor aceleró la germinación obteniéndose 83% de germinación desde el día 7 y en el día 11 ya se tenía un porcentaje de germinación del 100%.

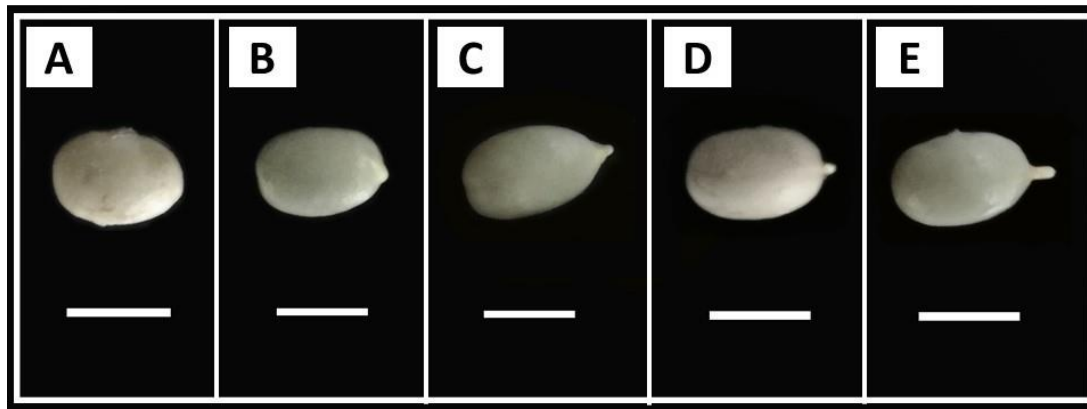


Figura 2.4 Determinación del inicio de la germinación en semillas de café (*Coffea arabica*).

(A-C) *Semillas no germinadas*, (D-E). *Semillas germinadas*.

La semilla cigótica, contiene una planta embrionaria en su condición inactiva y la germinación es la reanudación de su crecimiento. La planta joven, protegida por diferentes capas de tejidos, tiene reservas para el metabolismo. La germinación inicia con la imbibición de agua, posteriormente con el alargamiento celular y finalmente con el aumento en el número de células, finalizando con la protrusión de la radícula (Toole et al., 1956). De acuerdo con lo anterior en este experimento el tratamiento en sustrato estéril (T1) y papel filtro (T2), son semillas que al germinar bajo estas condiciones activaron su metabolismo durante la imbibición y emplearon únicamente las reservas del endospermo de la semilla para promover la división y crecimiento celular para lograr la germinación, ya que el sustrato y el papel filtro no contiene componentes que puedan promover o acelerar el proceso de germinación.

En el caso de medio de cultivo semisólido y líquido, este último empleado en el SIT contiene macronutrientes, micronutrientes, sacarosa, vitaminas y reguladores de crecimiento (ANA y cinetina), estos componentes son un aporte adicional para la semilla de café, los cuales favorecen la germinación acortando los tiempos e incrementando el número de semillas que logran la germinación. Antes de la imbibición, la mayoría de las células en tejidos meristemáticos de embriones de semillas (las únicas poblaciones celulares que proliferan) tienen un contenido de ADN G1 y metabólicamente se encuentran en un estado similar a G0, caracterizado por la ausencia de señales que favorezcan la proliferación

celular. Sin embargo, la imbibición no provoca una entrada inmediata en el ciclo. En cambio, hay un retraso de hasta varias horas antes de que la fase S se vuelva evidente (Vázquez y Sánchez, 2003). En investigaciones previas se ha demostrado que la adición de reguladores de crecimiento como auxinas (ANA) y citocininas (cinetina) tiene un efecto positivo durante la activación de ciclo celular (transición de la fase G1 a la fase S) durante la germinación, acortando los tiempos de la protusión de raíz y el porcentaje de germinación (Baíza *et al.*, 1989; Reyes *et al.*, 1991; Nikolić *et al.*, 2006). Esto se puede observar en los resultados obtenidos en los tratamientos con medio de cultivo adicionado con citocinina (cinetina) y auxina (ANA) en los tratamiento TG3 y TG4 (SIT) en el que se aceleró el porcentaje de germinación obteniéndose un 100% de germinación desde el día 11, Figura 2.5, además cabe resaltar que dentro de las vitaminas que incluye el medio de cultivo, se encuentra la biotina que es necesaria para la germinación de semillas ya que tiene un papel fundamental en bloquear enzimas que inhiben la germinación de semillas, 7-ceto-8-aminopelargónico, KAPA (Kucera *et al.*, 2005), además de las vitaminas también contiene reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas) que promueven la división celular, acelerando el proceso de germinación (Mok y Mok, 2001; Chiwocha *et al.*, 2005; Kucera *et al.*, 2005; Belin *et al.*, 2009; Subbiah y Reddy, 2010), haciendo más eficiente el proceso de germinación de semillas en los tratamiento con medio de cultivo (TG3. medio semisólido y TG4 medio líquido).

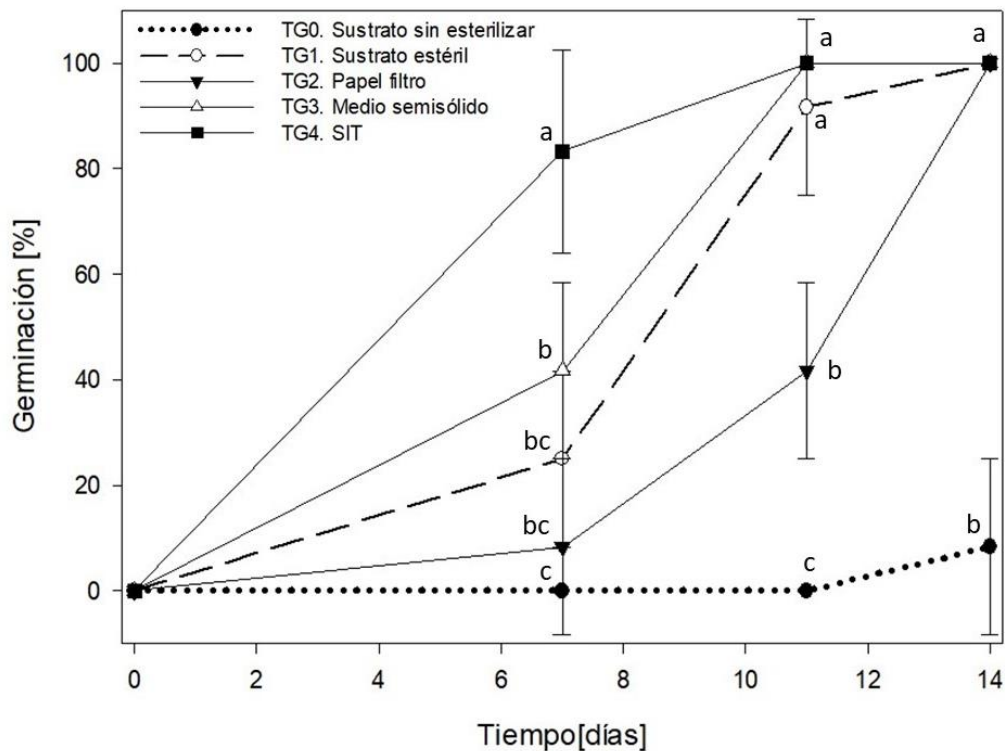


Figura 2.5 Porcentaje de germinación de semillas de café (*Coffea arabica*) evaluados los días 7, 11, 14 días

En la evaluación respecto a la longitud en el desarrollo de las plantas en diferentes tratamientos (figura 2.6) nos permite apreciar la elongación de la planta completa tomando como referencia tanto el desarrollo de la raíz como el del área foliar y se tiene que en el tratamiento TG4 (biorreactor) es mayor el desarrollo que en los demás tratamientos (TG0, TG2, TG3). En el caso del tratamiento de sustrato estéril (TG1) se observó una altura similar que la del tratamiento TG4, sin embargo, este tratamiento no desarrollo aún los cotiledones en el día 40 de la evaluación. Este resultado puede deberse a que las plántulas de café en el biorreactor (TG4) al encontrarse en un sistema semiabierto permite el intercambio gaseoso, acelerando el desarrollo de la plántula. En el caso del tratamiento TG3 (medio semisólido), el cual se encuentra en un sistema cerrado en el que se carece de un intercambio gaseoso, presenta un desarrollo similar que las plántulas observadas en el sustrato estéril (TG1). En esta etapa de desarrollo de la plántula los cotiledones aún proporcionan energía a la plántula, en las primeras partes de la semilla que emergen del suelo son los cotiledones,

que caracterizan el crecimiento de la plántula epigeal, y se requieren de 3 a 4 semanas para que los cotiledones agoten por completo el endospermo y estén libres de cualquier residuo del mismo (Eira, M.T.S *et al.*, 2006), por lo que la energía que la plántula pudiera obtener del sustrato y del medio de cultivo es un complemento en esta etapa. Probablemente después de que se terminen las reservas que proporcionan los cotiledones se puedan observar las diferencias de desarrollo de la plántula en el sustrato y en el medio de cultivo semisólido. En el caso de los tratamientos TG0 al TG2, las semillas tardan más en desarrollar la plántula de café, esto puede deberse a que el sustrato no estéril pudo contener microorganismos que tuvieron un efecto negativo durante la germinación, en el caso del papel filtro, este carece de nutrientes complementarios a los que contiene la semilla para acelerar el desarrollo de la plántula.

Cuadro 2.1 Parámetros de desarrollo de café (*Coffea arabica*)

40 días de Desarrollo							
T	L-P* [cm]	LHP	C	HV	NR*	LRP*	P-F*
TG0	1.20±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.0±0.0 ^b	0.0±0.0 ^b	0.33±0.14 ^c	0.09±0.05 ^b	0.36±0.03 ^c
TG1	5.65±0.19 ^b	4.46±0.19 ^b	0.0±0.0 ^b	0.0±0.0 ^b	9.17±0.65 ^b	4.60±0.36 ^b	0.64±0.07 ^b
TG2	3.27±0.12 ^c	2.07±0.12 ^b	0.0±0.0 ^b	0.0±0.0 ^b	2.50±0.19 ^c	3.52±0.23 ^b	0.56±0.03 ^{bc}
TG3	4.65±0.18 ^{bc}	3.25±0.18 ^b	0.0±0.0 ^b	0.0±0.0 ^b	7.50±0.51 ^b	3.38±0.16 ^b	0.72±0.08 ^b
TG4	5.85±0.16 ^a	4.14±0.23 ^a	2.0±0.0 ^a	1.17±0.52 ^a	17.60±1.59 ^a	8.18±0.38 ^a	1.55±0.4 ^a

L-P (Longitud de planta), LHP (Longitud de hipocótilo), C (Número de cotiledones desarrollados) HV (Número de hojas verdaderas), NR (Número de raíces), LRP (Longitud de raíz principal), P-F (Peso fresco).

*En el cuadro se representan las medias con su desviación estándar, las diferentes letras entre columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

En cuanto al crecimiento de raíz en plantas de café es fundamental para tener plantas más vigorosas y con mayores posibilidades de adaptación *ex vitro* por lo que el tratamiento TG4 (SIT) presentó el mayor número de raíces en comparación con el TG3 que tienen el mismo medio con la diferencia de que en tratamiento TG4 si hubo intercambio de gases y oxigenación. En el caso del tratamiento con sustrato estéril (TG1) presenta un desarrollo del sistema radicular similar al del medio semisólido (TG3), el cual se puede deber principalmente por las condiciones de oscuridad que se presenta en el interior del sustrato, estas tienden a desarrollar más. en cuanto al tratamiento TG2 el

desarrollo es mínimo por la falta de nutrientes la planta solo consume el almacén de almidones que le da el endospermo (fig. 2.6), en cuanto al tratamiento TG0 al ser el tratamiento que tardo más tiempo en germinar el desarrollo de la plántula es mínimo, ya que en este periodo de tiempo muchas de ellas apenas están germinando.

Durante el desarrollo de las plántulas de café se tuvo un mejor crecimiento con respecto al peso fresco acumulado durante cuarenta días, fue en el biorreactor (TG4) con 1.55g, comparado con los demás tratamientos (Cuadro 2.1), seguido de los tratamientos TG1, TG2 y TG3 con 0.64, 0.56 y 0.72g respectivamente, el tratamiento que presentó el menor peso fresco fue el tratamiento TG0 con 0.36g.

En cuanto a hojas se puede observar que las plantas germinadas en los tratamientos TG0, TG1, TG2 y TG3 al día 40 aún no generaban ni los cotiledones, mientras que en el Biorreactor algunas llegaron a formar de 3 a 4 hojas verdaderas, por lo cual se aceleró la germinación y desarrollo de la plántula en este sistema (Figura 2.6).

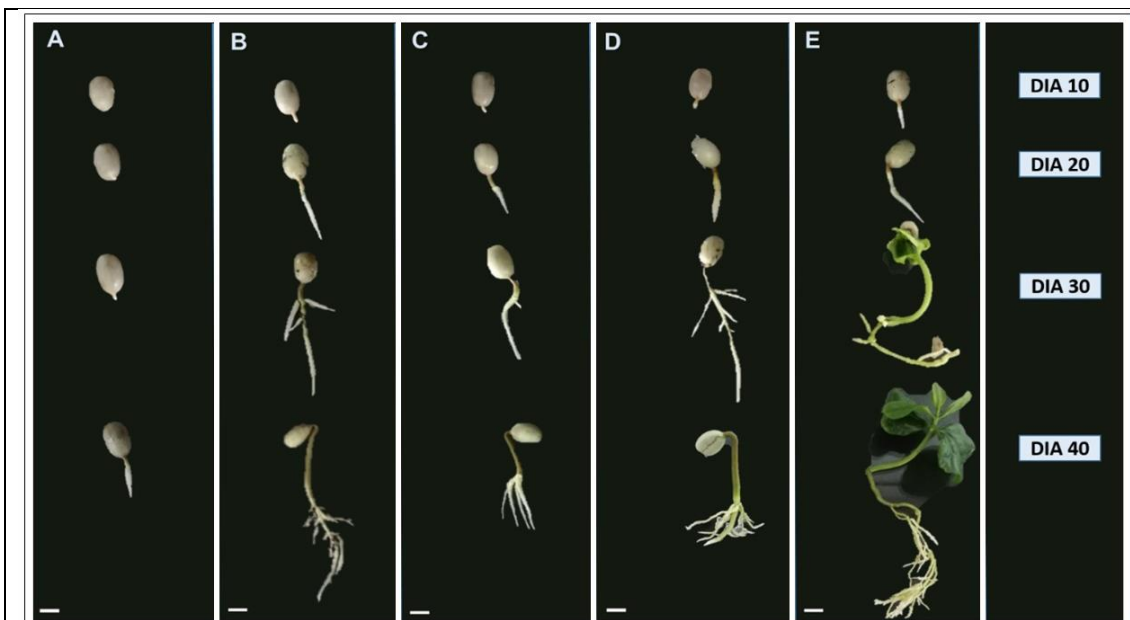


Figura 2.6 Comparación de la germinación y desarrollo de plantas de café en diferentes sistemas de propagación.

A) TG0. Control, B) TG1. Germinación en sustrato estéril, C) TG2 Germinación en papel filtro, D) TG3. Germinación en medio semisólido, E) TG4. Germinación en (SIT). Bar = 1 cm

Existen diversas formas en la propagación in vitro de obtener plantas de importancia económica en cultivo de café se han reportado desde hace tiempo distintas formas de obtener plantas, ya sea a partir de estacas ó semillas (Solano, 2001). Otra de las técnicas más novedosas es la multiplicación in vitro a partir de células embriogénicas somáticas directas e indirectas, algunos de los inconvenientes de estas formas de propagación es la constante mutación que pueda ocurrir por el uso de reguladores de crecimiento y por el avance simultaneo de generaciones, que en cultivo de café el mercado exige estrictamente la uniformidad genética, para que no se tengan variaciones en el sabor del producto final. Otro de los inconvenientes al usar células embriogénicas es el tiempo para la obtención de embriones que tarda de 13 a 15 semanas y solo se obtienen de 1 a 10 por explante (Etienne *et al.*, 1999) que una vez obtenidos pasan por otras 6 semanas para generar plantas diferenciadas, pero sin haber generado raíz (Sondahl *et al.*, 1991; Denchev *et al.*, 1992; Berthouly *et al.*, 1999; Quiroz- Figueroa *et al.*, 2002).

Una de las técnicas usadas para la obtención de plantas de forma más rápida que también cuenta con sus desventajas al no haber material suficiente todo el año es a partir de semillas o embriones de semillas. La cual genera una ventaja al tener ya formado el embrión en la semilla, en la técnica de embriogénesis somática que reporta (Quiroz- Figueroa *et al.*, 2000) obtienen una planta ya formada a partir de un embrión en 25 semanas sin desarrollo de raíz y para el caso de germinación directa a partir de embriones de semillas usando el sistema de Biorreactores (SIT), obtenemos una planta ya formada con un buen sistema radicular lista para aclimatación en tan solo 8 semanas.

Existen reportes de propagación en biorreactores (SIT) en diseño Rita (Etienne-Barry *et al.*, 1999) en el cual generan de 50 a 200 plantas por biorreactor a partir de embriogénesis somática indirecta con el único inconveniente que no generan suficiente sistema radicular el cual se ve como desventaja al momento de la aclimatación, que en el caso de propagación por embriones de semilla y en sistema biorreactores (SIT) tipo gemelos, pudiéramos generar en un estudio la

misma cantidad de plantas pero en menor tiempo con buen sistema radicular y foliar listas para aclimatación.

De acuerdo con los estudios realizados por (Debergh and Maene, 1981; Etienne *et al.*, 1997) en el cual hacen la comparación de siembra directa de plántulas y embriogénesis somática directa, la siembra directa tarda hasta 4 meses en desarrollar una plántula completa con el beneficio de ser una planta con buena adaptación pero menor desarrollo y menor número de plantas, comparada con la embriogénesis somática directa en el cual se obtienen mayor número de plántulas de mejor calidad y con mayor adaptación *ex-vitro* y desarrollo, con el inconveniente de ser una técnica muy costosa de mayor riesgo de contaminación por la manipulación. En este estudio se realizó la siembra directa en sustrato en comparación con los biorreactores (SIT) tipo gemelos y resulto ser una técnica con mayor eficacia al tener plantas ya formadas con varias hojas verdaderas en 40 días con solo una manipulación reduciendo los costos de producción al tener un desarrollo más rápido en biorreactor. Que si se compara con la embriogénesis somática directa y la conversión a plántulas en biorreactor en el estudio realizado por (Etienne-Barry *et al.*, 1999) en la cual obtienen mayor número de plantas, el inconveniente en nuestro estudio sería el material por ser semillas. Aunque en otro estudio se podría realizar una comparativa con los diseños de biorreactores tipo gemelos que se pueden hacer más espaciosos y los Rita para comparar la eficacia entre los dos y también se podrían variar los medios utilizados por (Etienne-Barry *et al.*, 1999) y (Quiroz- Figueroa *et al.*, 200) para tener una mejor técnica con menor manipulación, obtención de más plantas y menos costosa.

2.1.5 Conclusiones

Se realizó un proceso de desinfección para la propagación de plantas a partir de semillas recolectadas directo de campo con los cuidados pertinentes para evitar la oxidación de las semillas y obtener una alta germinación.

Las plantas propagadas con el método convencional y medio semisólido el desarrollo es muy lento debido a que son plantas semileñosas, sin embargo, el empleo de biorreactores promueve la germinación como su metabolismo para incrementar el desarrollo general de la planta.

Las plantas germinadas y desarrolladas en biorreactores (SIT) tuvieron 4.3 veces más de peso fresco que germinadas por el método convencional (control). El peso es un parámetro muy importante en la propagación de plantas por que determina que tan vigorosas son las plantas para poder adaptarse a condiciones ex vitro.

Las plantas en biorreactor (SIT) generaron los cotiledones a los 30 días mientras que en los otros tratamientos y control lo desarrollaron a los 50 y 60.

Las plantas en biorreactor (SIT) generaron mejor sistema radicular por lo cual se adaptaron más rápidamente en la etapa de aclimatación mientras que en nuestros tratamientos y control generaron pocas raíces lo cual la adaptación fue un poco más complicado.

2.1.6 Bibliografía

Baíza, A.M., Vázquez-Ramos, J.M. and Sánchez de Jiménez, E., 1989. DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *Journal of Plant Physiology* 135; 416–421. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(89\)80097-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(89)80097-5)

Belin C, Megies C, Hauserova E, Lopez-Molina L. 2009. Abscisic acid represses growth of the Arabidopsis embryonic axis after germination by enhancing auxin signaling. *Plant Cell*, 21(8): 2253–68. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.067702>

Berthouly, M. y Etienne, H. 2005. *Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation*, *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, edit. Springer Netherlands, pp. 165-195.

Coste, R. (1968). *Le caféier*. G.P. Maisonneuve et Larose. Pris: 310 p.

Eira, M.T.S.; Amaral da Silva, E.A.; de Castro, R.D.; Dussert, S.; Walters, C.; Bewley, J.D.; Hilhorst, H.W.M. Coffee seed physiology. *Braz. J. Plant Physiol.* 2006, 18, 149–163.

Etienne H, B. E. (1999). Aportes de la. *Desafíos de la caficultura en Centroamérica*. Bertrand B, Rapidel B, eds. IICA.. San José, Costa Rica, 457-495.

Etienne-Barry, D., Bertrand, B., Vasquez, N. et al. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. *Plant Cell Reports* 19, 111–117 (1999).

García S., B. F. (2006). Factores que limitan la certificación de café orgánico en el esquema de comercio justo en cinco organizaciones de México. *Revista Mexicana del Caribe* X (19).., 205-226.

Kucera B., Cohn M.A., Leubner-Metzger G., 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci. Res.*, 15(4);281–307. <https://doi.org/10.1079/SSR2005218>

Lorenzo, J. G. (1998). Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 54: 197-200.

Haarer, A. E. *Modern Coffee production*. Leonard Hill. (1958)

Mordocco, B. J. (2009). Development of a temporary immersion system (RITA®) for mass production of sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids). *In Vitro Cell Dev*, 450-457.

Nikolić, R., Mitić, N., Miletić, R. and Nešković M., 2006. Effects of Cytokinins on In Vitro Seed Germination and Early Seedling Morphogenesis in *Lotus corniculatus* L.. *J Plant Growth Regul* 25(3);187-194. <https://doi.org/10.1007/s00344-005-0129-4>

Reyes, J., Jiménez-García, L.F., González, M.A. and Vázquez-Ramos, J.M. (1991) Benzyladenine-stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize. *Seed Science Research* 1, 113–117. <https://doi.org/10.1017/S096025850000074X>

SAGARPA. (2016). *Panorama Agroalimentario I café 2016*. Dirección de Investigación y evaluación Económica y Sectorial, 34.

SIA-SAGARPA. (2015). *Convención Internacional del Café en México*.

Subbiah V., Reddy K.J., 2010. Interactions between ethylene, abscisic acid and cytokinin during germination and seedling establishment in *Arabidopsis*. *J. Biosci.* 35:451–458. <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0050-2>

Solano, W. (2001). *Efecto de las Características de Cultivo en Suspensión*. Universidad de Costa Rica, 50-87 .

Toole, E. H., Hendricks, S. B., Borthwick, H. A., & Toole, V. K., 1956. Physiology of Seed Germination, *Annual Review of Plant Physiology*, 7(1): 299–324. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.07.060156.001503>

Quiroz-Figueroa. (2006). Direct Somatic Embryogenesis in *Coffea canephora*. *Methods in Molecular Biology* (pág. 318).

Vázquez-Ramos, J. M. and de la Paz Sánchez, M., 2003. The cell cycle and seed germination. *Seed Science Research* 13:113-130.
<https://doi.org/10.1079/SSR2003130>

3. CAPÍTULO 3.

3.1 Bioestimulación en el desarrollo de plántulas de café mediante cepas nativas de *Trichoderma sp.*

3.1.1 Resumen

El uso de cepas de *Trichoderma* en el control biológico de enfermedades vegetales ha sido ampliamente estudiado. Además, se ha reportado su efecto bioestimulante de algunas cepas sobre el crecimiento vegetal. La búsqueda de cepas que tengan ambas propiedades significa una alternativa para la disminución del uso de agroquímicos en el manejo de los cultivos, como se requiere en el control de la roya del café (*Hemileia vastatrix*). En este estudio, se realizaron aislamientos de *Trichoderma* con medio selectivo a partir de muestras de rizósfera proveniente de cafetales de la región de Tila, Chiapas. Se seleccionaron 8 aislamientos para ser evaluados como posibles bioestimulantes en el desarrollo de plantas de *Coffea arabica* var. *Typica*. Se colocaron semillas para germinación in vitro y se confrontaron con los diferentes aislamientos de *Trichoderma* para evaluar su efecto sobre la germinación de las semillas. Una vez germinadas, se transfirieron a sustrato estéril en cuarto de aclimatación. Después se transfirieron a macetas con sustrato estéril y se re-inocularon con cada aislamiento correspondiente (1×10^6 esporas mL⁻¹). Transcurridos 40 días se evaluó el desarrollo de área foliar, número de hojas y peso fresco de las plántulas. Se observó una estimulación en la germinación y en el crecimiento de las plántulas de café en 4 aislamientos de *Trichoderma*. A estos aislamientos se les determinará su potencial en la protección para la infección de la roya del café.

Palabras clave: *Trichoderma sp.*, bioestimulación, aislamientos, cepas.

3.1.2 Introducción

El cultivo de café en México es uno de los más estratégicos. México es el 11° productor mundial y considerado como uno de los países productores de café orgánico, su producción emplea a más de 500 mil productores de 15 entidades federativas y 480 municipios. Actualmente hay 15 estados productores de café:

al sur del país, Chiapas es el principal estado productor que aporta el 41% del volumen nacional, seguido por Veracruz (24%) y Puebla con un 15.3% (SAGARPA, 2016)

Por otra parte, el gran impacto ambiental de los sistemas de cultivo en los últimos años ha ido en aumento por el uso desmedido de las aplicaciones químicas de fertilizantes en el suelo para el incremento de la productividad (Gastal *et al.*, 2002).

Existen diversas herramientas las cuales nos permiten optimizar el aprovechamiento de fertilizantes asociado al uso de compuestos y microorganismos considerados capaces de mejorar la absorción de nutrientes de las plantas y el crecimiento de los cultivos, especialmente bajo condiciones adversas del suelo. Estos se conocen como metabólicos potenciadores y bioestimulantes. (Miller, 1990).

La interacción planta- microorganismo en la rizósfera son clave para determinar una buena sanidad vegetal, productividad y la fertilidad del suelo (Souza *et al.*, 2015).

El mecanismo por el cual los microorganismos promueven la planta el crecimiento se ha estudiado previamente para ambas bacterias (Crozier *et al.*, 1988; Ahmad *et al.*, 2005; Idris *et al.*, 2007) y hongos (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Salazar-Badillo *et al.*, 2015). Se ha sugerido que más del 80% de las bacterias de la rizósfera sintetizan ácido indol-3-acético (IAA) (Patten y Glick, 1996).

Por otra parte, *Trichoderma* es un género de hongos saprotróficos que también han sido ampliamente estudiado por promover el crecimiento de las plantas, además de su actividad de biocontrol, actuando ya sea por la producción de compuestos antimicrobianos o el parasitismo de hongos patógenos de plantas (Handelsman y Stabb. 1996)

Trichoderma spp. se han encontrado capaces de mejorar la solubilidad de los micronutrientes del suelo como Zn, Cu, Fe y Mn.¹⁴ *Trichoderma spp.* también puede producir metabolitos con actividades hormonales como ácido indol-3-

acético o análogos de auxina (Hoyos-Carvajal et al., 2009) aunque la promoción del crecimiento vegetal de plantas en sistemas basados en suelo es menor Convinciente. (Hoyos-Carvajal et al., 2009) mostró que muchas de las cepas de *Trichoderma* son capaces de sintetizar IAA pero solo una pocos pueden promover el crecimiento de las plantas. Esta interacción provocada lleva a una mayor producción de componentes de defensa, sintetizados a través del metabolismo secundario del hongo donde se ha encontrado al AIA entre otros (Benítez et al., 2004), (Kilian et al., (2006).

Por esta razón, las cepas de *Trichoderma spp.* han adquirido un alto valor comercial, abarcando nuevas tecnologías para la producción masiva de productos de este hongo (Cruz 2007). Aunque su uso través de productos donde se tiene como componente activo esporas de *Trichoderma spp.* En diferentes medios de crecimiento, ya sea de forma sólida o líquida (PROINPA 2012).

Por consiguiente, se ha visto necesario la búsqueda de formas alternativas de obtener dichos beneficios para el cultivo de café orgánico nacional. Los objetivos de este estudio fueron investigar la diversidad de especies de *Trichodermas* asociadas a la rizósfera de suelos productores de café del sur de México de la región de Ocosingo, estado de Chiapas y el efecto de estas cepas sobre el crecimiento en vitroplantas evaluando el desarrollo de raíz, área foliar, numero de raíces, numero de hojas, peso fresco y peso seco de cada uno de los tratamientos con las diferentes cepas obtenidas.

3.1.3 Metodología

3.1.3.1 Muestreo en suelo y aislamiento.

Se recolectaron muestras de rizósfera de suelo en lugares de cultivo de cafetales en la región de Ocosingo estado de Chiapas, estas fueron llevadas al laboratorio de biotecnología vegetal de CIATEJ y se almacenaron a una temperatura de 4°C hasta su uso. Se realizaron una serie de diluciones en agua destilada estéril de cada una de las muestras de suelo (hasta la dilución 10^{-3}), de cada dilución se tomaron 5 mL de la muestra y se colocaron en la superficie del medio selectivo para *Trichodermas* "TSM" (Elad et al., 1982). Las cajas de Petri

fueron incubadas a 28 ± 2 °C durante 96 horas. Se purificaron morfológicamente las diferentes colonias que aparecen en las placas en el medio papa dextrosa agar (PDA). Los aislados purificados se conservaron a 4°C para ser utilizados durante el estudio.

3.1.3.2 Características fenotípicas de los aislados.

Las características fueron identificadas mediante la observación microscópica usando la técnica del microcultivo, que consiste en colocar una porción de un medio de cultivo entre 1-1.5 cm de agar y se coloca sobre un portaobjeto, se toma un repique (un trozo pequeño) del hongo y se coloca en el medio de cultivo y se coloca encima un cubreobjetos, se mantiene en una cámara húmeda a 28 ± 2 °C durante 72 horas para ser observados al microscopio.

3.1.3.3 Condiciones de crecimiento y preparación del inóculo.

Una vez identificados los hongos se transfirieron al medio papa dextrosa agar (PDA) incubados a 28 ± 2 °C durante 8 días para la maduración del hongo en el medio. Una vez esporulada la cepa, se colocaron 5 mL de una solución agua destilada y tween 80 a una concentración de 0.1% (v/v) en cada una de las cepas aisladas para extraer las esporas, se realizó un conteo de esporas ajustando las soluciones de 1×10^7 y se conservaron a 4°C para su posterior uso.

3.1.3.4 Producción de material vegetal.

Se recolectan las semillas directamente de los cafetales *Coffea arabica var. Typica*. De la región centro del estado de Jalisco, Municipio de Tlajomulco Zúñiga, de huertos de traspatio ubicados con las coordenadas ($20^{\circ}24'44''N$ $103^{\circ}23'30''W$) y se llevaron a las instalaciones de la planta piloto en el laboratorio de cultivo de tejidos del Instituto Tecnológico Nacional de México, Campus Tlajomulco de Zúñiga, Jal. Para ser procesadas. Las semillas de café se despulparon y se sometieron a una solución de cloro al 10% con tween 80 al 0.1%(v/v) por 15 min y posteriormente se enjuagaron con agua corriente y se

secaron en un secador de charolas (marca Polinox modelo TABIM094) a una temperatura de $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, una vez secas las semillas se guardaron en un frasco de vidrio a una temperatura ambiente de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, para su posterior uso.

3.1.3.5 Inoculación inicial de *Trichodermas* en semillas de café.

Para el establecimiento de las semillas in-vitro se les dio un proceso de desinfección el cual consistió en quitar el endocarpio (pergamino) de cada una de las semillas en condiciones asépticas se colocaron en una solución de 1 g L^{-1} de benomilo (fungicida) más 0.3 g L^{-1} de estreptomina (Antibiótico) durante 20 min, posteriormente se les dio 3 enjuagues con agua destilada estéril, enseguida se colocaron en una solución de agua destilada e hipoclorito de sodio a una concentración al 30% durante 20 minutos y se les dio tres enjuagues con agua destilada estéril, después transfirieron en una solución de etanol al 70% por 2 minutos y se realizaron nuevamente 3 enjuagues con agua destilada estéril, finalmente se sumergieron en una solución antioxidante previamente estéril de 0.1 mg L^{-1} de ácido ascórbico y 0.15 mg L^{-1} de ácido cítrico durante 1 minuto, después se transfirieron al medio de cultivo.

Se evaluó el efecto en la germinación de semillas de café (*Coffea arabica*) in vitro en medio mínimo en presencia del hongo (*Trichoderma* spp). Las semillas fueron colocadas en un extremo de la caja Petri y en el extremo contrario se colocó un pequeño trozo del hongo de 5 mm, en la parte central se colocó un papel filtro estéril como barrera para hacer más lenta la colonización de hongo (*Trichoderma* spp) a las raíces, posteriormente se colocaron en una cámara de incubación a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 15 días para evaluar el efecto que tenía el hongo en la germinación de semillas de café.

3.1.3.6 Aclimatación de plántulas in vitro en sustrato.

Una vez enraizadas y colonizadas las semillas por el hongo (*Trichoderma* spp) correspondiente a cada uno de los tratamientos aproximadamente a los 10 días después de la inoculación, estas fueron trasplantadas para terminar el

proceso de germinación en sustrato estéril (proporción 6:2:1 peat moss, arena y vermiculita) en contenedores con capacidad de 250 mL. Las plantas fueron colocadas bajo condiciones controladas en cámaras de crecimiento (25 ± 2 °C, fotoperiodo 16 h luz/ 8 h oscuridad) durante 22 días.

3.1.3.7 Re-inoculación de *Trichodermas sp* en plantas aclimatadas y establecimiento del experimento.

Con plantas germinadas de un mes y medio se procedió a montar el experimento, en el cual se tomaron 7 plantas por cada uno de los 8 tratamientos con las cepas aisladas, en el control se colocaron 7 plantas inoculadas con 5 mL de agua destilada estéril y como testigo se utilizó la cepa comercial *Trichoderma harzianum* (T22) aislada a partir del producto PHC T-22, en los tratamientos y testigo se agregaron 5 ml de la solución de esporas de cada cepa a una concentración de 1×10^7 y se pasaron a condiciones de invernadero por 40 días para su posterior evaluación.

3.1.3.8 Evaluación de desarrollo de café.

Las plantas estuvieron en condiciones de invernadero con riegos tres veces (100mL/ planta) cada semana sin fertilización durante 40 días para determinar el efecto de la interacción planta – hongo en el desarrollo de la plántula, evaluándose la longitud de la planta, el número de hojas, el peso fresco y el peso seco.

3.1.3.9 Diseño experimental

Para el experimento de germinación de semillas y desarrollo de plántulas el diseño experimental fue de bloques completamente al azar, los datos presentados corresponden a la media de cuatro replicas, cada una con 3 semillas. Los datos fueron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias fue determinada por la prueba de LSD ($P<0.05$).

3.2 Resultados y discusión

Las cepas de *Trichoderma* fueron identificadas mediante la técnica de establecida por Kirk y colaboradores (2011). Se observó un crecimiento rápido de 5 a 6 días en cajas de Petri en medio PDA a 25 °C de aspecto blanco que posteriormente al madurar generaron conidios a los 8 días, tomando una coloración azul verdosa en forma de anillos los cuales nos permitieron detectar a simple vista las cepas pertenecientes a *Trichoderma spp.* Durante la observación en microscopio se confirmó la presencia de 8 cepas del género *Trichoderma sp.*, de acuerdo a las estructuras microscópicas descritas por (Sutton *et al.*, 1998), los *Trichodermas* aislados visualmente tomaron diferentes formas y coloraciones por las diferentes zonas en donde se recolectaron las muestras de suelo fig. 3.1 por lo que se podría asociarse a cepas de diferentes especies esto se debe a la producción de metabolitos secundarios ya que la producción de estos es un complejo asociado al desarrollo morfológico de cada cepa (Vinale *et al.*, 2009), y (Vessey, 2003).

La producción de reguladores del crecimiento de la planta por microorganismos es un mecanismo importante, muchas veces asociado a la estimulación durante el crecimiento como indica (Sánchez *et al.*, 2005).

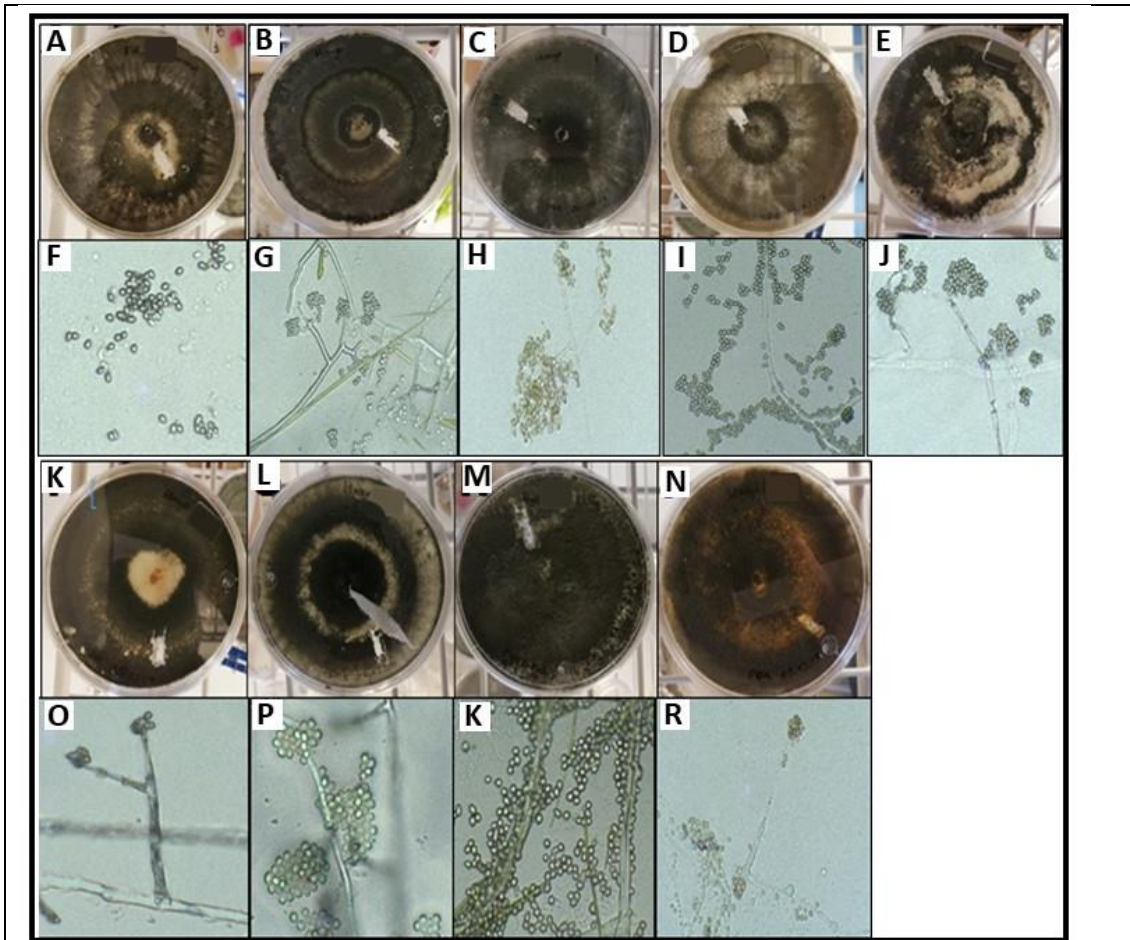


Figura 3.1 Morfología colonial y microscópica de cepas aisladas de *Trichoderma spp.* (A-E y K-N) Morfología colonial de cepas de *Trichoderma spp.* en medio PDA; (F-J y O-R) Morfología microscópica de cepas de *Trichoderma spp.*; **A-F)** *Trichoderma* comercial, cepa TH22, **B-G)** Cepa LE 21, **C-H)** Cepa LE 39, **D-I)** Cepa LE 42, **E-J)** Cepa LE 47, **K-O)** Cepa LE 59, **L-P)** Cepa LE 63, **M-K)** Cepa LE 98, **N-R)** Cepa LE 116.

Los efectos en el porcentaje de germinación en semillas de café a los 15 días después de la siembra e inoculación de los aislados en cajas petri en medio mínimo muestra un efecto negativo en la germinación de semillas de café de la interacción (planta-hongo) de los aislados de T1 (LE21), T3 (LE42), T5 (LE59), T6 (LE63) y T8 (LE116) afectando de un 10% a un 30% el porcentaje de germinación, comparado con el control presento un 100% de germinación, igual que los tratamientos T2 (LE39), T4 (LE47), T7 (LE98) y el testigo (cepa comercial Th.22), Fig. 3.2.

En este estudio se puede observar que las semillas inoculadas al inicio en condiciones in vitro pueden tener un efecto negativo en la germinación, que puede deberse por la producción de metabolitos, como carbohidratos, aminoácidos y algunas auxinas que afectan la germinación y desarrollo de la planta, debido a su acción como reguladores de crecimiento que al estar en estas condiciones los aislados de *Trichoderma spp.* probablemente generaron algún metabolito en concentraciones elevadas para la planta, que afectaron negativamente, este efecto también se observó en estudios realizados en cultivo de tomate mostraron efectos inhibitorios en la germinación (Rasool, *et al.*, 2011, Vinale, *et al.*, 2008). En otros estudios realizados de pruebas de germinación de trigo fortificado con cepas de Trichodermas en suelo reducen los efectos mencionados anteriormente al ser un sistema abierto y ser plantas de siembra directa teniendo un resultado contundente de que algunas cepas producen altas concentraciones de metabolitos que inhiben la germinación en sistemas compactos o cerrados que en suelo favorece la germinación y vigor consistente con resultados obtenidos por otros autores (Hajieghrari, 2010; Ousley *et al.*, 1994; Barker, 1988).

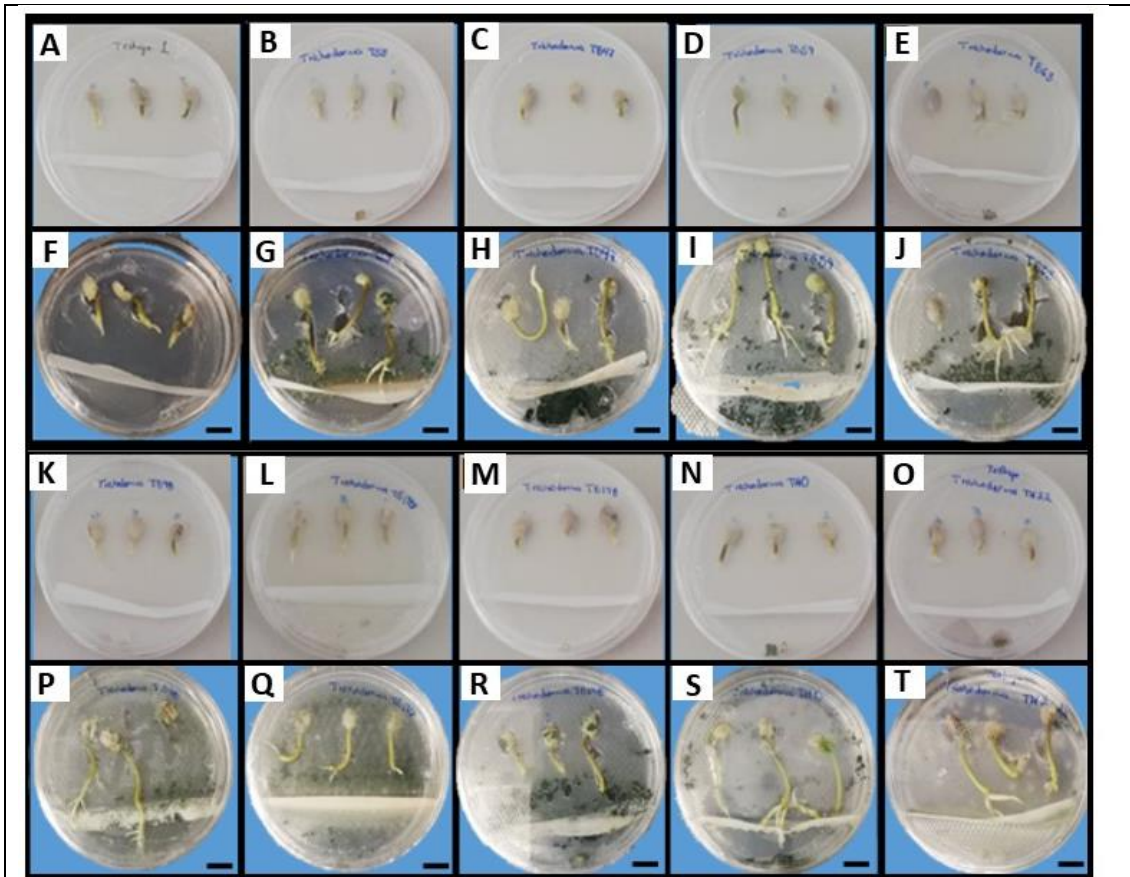


Figura 3.2 Colonización de cepas de *Trichoderma* ssp. durante la germinación de semillas de café en medio MS (sin sacarosa).

(A-E y K-O) Inicio de germinación de las semillas de café (8 días) , (F-J y P-T) Desarrollo de plántulas a partir de semillas de café después de 15 días, **A-F)** Control, **B-G)** Testigo cepa comercial TH 22, **C-H)** LE 21, **D-I)** LE 39, **E-J)** LE 42, **K-P)** LE 47, **L-Q)** LE 59, **M-R)** LE63, **N-S)** LE98, **O-T)** LE116. Bar =1cm

Durante la germinación se puede observar que algunas de las cepas muestran intoxicación durante el proceso de germinación como es el caso del testigo (TH22), T2 (LE39), T4 (LE47) y T7 (LE98). Que pudiera estar relacionado a la producción de metabolitos secundarios como AIA reportado en artículos (Benítez et al. 2004., Kilian et al. 2006) que al ser germinadas in vitro y colonizadas en esta misma condición la producción de metabolitos del hongo satura el medio de cultivo produciendo este efecto.

Para el caso de las semillas que si lograron germinar en el sistema cerrado ocurren algunas diferencias para los parámetros evaluados como es el caso de la producción de raíces secundarias y el número de estas pudiendo observar que para los tratamientos T7 (LE98) y el T8 (LE116) muestra diferencias significativas para ambos casos comparado con los demás tratamientos, control y testigo cuadro 3.1, por lo que se puede determinar que las cepas con diferencia pudieran estar relacionadas con una mayor producción de auxinas causantes de formar raíces secundarias a temprana edad en el proceso de germinación que se traspolan a un buen vigor de plantas obtenidas a partir de estas cepas, efectos obtenidos con otros aislados de *Trichodermas spp.* en cultivos como maíz y chicharos (Zheng, *et al.*, 2000; Clear, *et al.*, 2005), los cuales son inoculados y puestos a germinación directa en sustrato.

Cuadro 3.1 Germinación y desarrollo de plántulas de café (*Coffea arábica*) en presencia de cepas nativas de *Trichoderma*, 15 días después de la inoculación.

TRATAMIENTO	PG*	LRP*	RS*	S*	LHE*
Control	100%±0.00 ^a	0.51±0.17 ^a	0.0%±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	1.74±0.29 ^a
Testigo	67%±0.00 ^b	0.34±0.17 ^a	22.0%±0.15 ^{ab}	0.44±0.29 ^{ab}	1.28±0.34 ^{ab}
T1 LE21	100%±0.00 ^a	0.54±0.21 ^a	33.0%±0.17 ^{ab}	0.77±0.40 ^{ab}	1.63±0.31 ^{ab}
T2 LE39	89%±0.11 ^{ab}	0.85±0.28 ^a	22.0%±0.15 ^{ab}	0.44±0.29 ^{ab}	1.11±0.33 ^{ab}
T3 LE42	100%±0.00 ^a	0.81±0.31 ^a	22.0%±0.15 ^{ab}	0.44±0.34 ^{ab}	1.84±0.31 ^a
T4 LE47	89%±0.11 ^{ab}	0.41±0.15 ^a	0.0%±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	1.46±0.39 ^{ab}
T5 LE59	100%±0.00 ^a	0.66±0.24 ^a	11.0%±0.11 ^{ab}	0.44±0.44 ^{ab}	1.67±0.34 ^{ab}
T6 LE63	100%±0.00 ^a	0.38±0.26 ^a	22.0%±0.15 ^{ab}	0.89±0.59 ^{ab}	0.85±0.23 ^b
T7 LE98	89%±0.11 ^{ab}	0.58±0.24 ^a	44.0%±0.18 ^a	1.11±0.45 ^a	1.58±0.28 ^{ab}
T8 LE116	100%±0.00 ^a	0.76±0.17 ^a	44.0%±0.18 ^a	0.66±0.33 ^{ab}	1.65±0.19 ^{ab}

PG (% de germinación), LRP (Longitud de raíz primaria), RS (Presencia de raíces secundarias), S (Número de raíces secundarias), LHE (Longitud del epicótilo).

*En el cuadro se representan las medias con su desviación estándar y las diferentes letras entre columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Los efectos en el desarrollo de plantas obtenidas del proceso de aclimatación y reinoculadas con su cepa correspondiente fueron evaluados a los 40 días los siguientes parámetros; longitud de la planta (LP), número de hojas (NH), peso fresco y peso seco tanto del área foliar como radicular. Los tratamientos T2 (LE39), T4 (LE47) y el T7(LE98) muestran un efecto positivo en los parámetros de desarrollo evaluados y presentan diferencias significativas comparado con el

control y el testigo. Dichas cepas pueden estar bioestimulando el desarrollo del sistema radicular como el sistema foliar en el cultivo de café cuadro 3.2, esto también se puede observar con otros estudios en el que los aislados de *Trichoderma* puede estimular el desarrollo general de las plantas en sustrato en plantas de maíz, chícharo, tomate y lechuga, (Zheng, *et al.*, 2000; Clear, *et al.*, 2005, Rasool *et al.*, 2011; Ortuño *et al.*, 2013). El resultado observado en este estudio reveló que el desarrollo de la raíz de las plantas en ciertos aislados pueden fortalecer el sistema de desarrollo de raíces que la planta usara para una mejor exploración de nutrientes al ser establecidas en suelo en condiciones de campo. El desarrollo del sistema radicular con cepas de *Trichodermas* se asocia a la producción de algunos ácidos orgánicos en la misma rizósfera como: ácidos glucónico, cítrico y / o fumárico que al mismo tiempo disminuyen pH del suelo, conduciendo al un aumento solubilidad del compuestos insoluble y disponibilidad de nutrientes , que se mejoran durante la absorción y transporte que van de la raíz a las partes aéreas, junto con los bioestimulantes producto de las cepas, y planta misma que mejora el crecimiento (Vinale *et al.*, 2008).

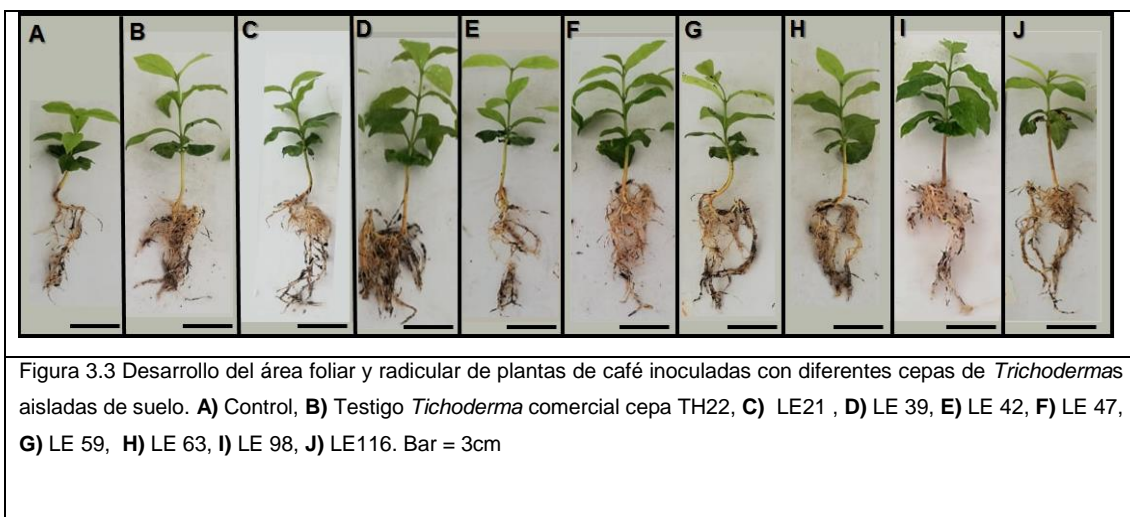
Cuadro 3.2 Germinación y desarrollo de plántulas de café (*Coffea arábica*) en presencia de cepas nativas de *Trichoderma*.

T	LP*	NH*	PF_AF*	PS_AF*	PF_R*	PS_R*
Control	4.58±0.17 ^{bc}	6.85±0.40 ^c	0.73±0.04 ^c	0.16±0.01 ^d	0.78±0.09 ^c	0.08±0.01 ^b
Testigo	5.08±0.27 ^{ab}	7.42±0.36 ^{bc}	0.97±0.11 ^{abc}	0.23±0.03 ^{abcd}	1.24±0.22 ^{abc}	0.14±0.02 ^{ab}
T1 LE21	4.95±0.55 ^{ab}	7.71±0.28 ^{bc}	0.93±0.08 ^{abc}	0.21±0.02 ^{abcd}	1.09±0.16 ^{abc}	0.22±0.09 ^a
T2 LE39	5.54±0.24 ^a	8.57±0.36 ^{ab}	1.16±0.10 ^a	0.27±0.02 ^a	1.47±0.15 ^a	0.15±0.01 ^{ab}
T3 LE42	5.00±0.44 ^{bc}	8.57±0.57 ^{ab}	0.81±0.03 ^{bc}	0.17±0.01 ^{cd}	0.93±0.09 ^{bc}	0.18±0.08 ^{ab}
T4 LE47	5.54±0.15 ^a	9.14±0.40 ^a	1.08±0.10 ^{ab}	0.25±0.02 ^{ab}	1.50±0.17 ^a	0.14±0.01 ^{ab}
T5 LE59	5.00±0.34 ^{ab}	8.57±0.57 ^{ab}	1.01±0.09 ^{ab}	0.24±0.02 ^{abc}	1.34±0.11 ^{ab}	0.13±0.01 ^{ab}
T6 LE63	3.98±0.29 ^c	7.42±0.57 ^{bc}	0.88±0.11 ^{bc}	0.19±0.02 ^{bcd}	1.37±0.20 ^{ab}	0.12±0.01 ^{ab}
T7 LE98	3.78±0.38 ^c	6.85±0.59 ^c	0.95±0.15 ^{abc}	0.21±0.03 ^{abcd}	1.44±0.21 ^a	0.13±0.01 ^{ab}
T8 LE116	4.62±0.19 ^{abc}	7.14±0.40 ^c	0.97±0.07 ^{abc}	0.22±0.02 ^{abcd}	1.37±0.13 ^{ab}	0.12±0.01 ^{ab}

T (Tratamientos), LP (Longitud de planta), NH (Número de hojas), PF_AF (Peso fresco de área foliar), PS_AF (Peso seco de área foliar), PF_R (Peso fresco de raíz), PS_R (Peso seco de raíz).

*En el cuadro se representan las medias con su desviación estándar y las diferentes letras entre columnas indican diferencias significativas (P < 0.05).

Por el contrario, en el caso de los aislados T1 (LE21), T3 (LE42), LE(63) LE(116) no presentan diferencias significativas en la mayoría de los parámetros evaluados con el control, esto se podría explicar que cepa *Trichoderma*, dependía principalmente en la capacidad de *Trichoderma* para sobrevivir y desarrollarse en la rizosfera (Harman, 2006; Harman et al., 2004). La colonización de raíces por *Trichoderma* podría ser un resultado no solo de los exudados de la raíz como carbohidratos y aminoácidos, sino también por muchos factores que afectó la interacción *Trichoderma*-planta en especial con la planta de café. Fig.3.3.



3.2.1 Conclusiones

El uso de aislados de *Trichodermas* para la bioestimulación en plantas puede que dependa del tipo de cepa y su interacción planta-hongo para causar efectos positivos para su desarrollo como también no cause en su totalidad algún efecto al ser diferentes en su comportamiento una vez que están en contacto con la rizósfera, como también su capacidad para poder adaptarse a las condiciones a las que la estamos sometiendo puesto que en cierto aspecto se está modificando tanto la temperatura como el tipo de suelo de donde se aislaron por lo cual son factores que puedan depender de su habitad natural de donde se aislaron.

Que en el caso de los aislados que si tienen potencial de bioestimulación como adaptación a las condiciones evaluadas podrían ser candidatas a próximas evaluaciones para observar su efecto en la planta como inductor de defensa natural para el control del hongo causante de la roya de café y poder emplearlo como una nueva alternativa para los productores caficultores de la zona y algunos otros lugares.

Los aislados tanto los que no resultaron con potencial bioestimulante como los que sí lo presentaron podrían ser candidatos para evaluaciones en la misma región de donde se tomaron para evaluarlos en campo así podríamos tener una alternativa de bastante ayuda para los productores para un mejor desarrollo y aprovechamiento en cuanto a la nutrición y manejo de cafetales en la zona.

3.2.2 Bibliografía

Ahmad, F., Ahmad, I., and Khan, M. S. (2005). Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turkish J. Biol.* 29, 29–34.

Barker R (1988). *Trichoderma* spp. as plant stimulants. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 7: 97-106.

Benítez T, Rincón AM, Limon MC, Codón AC. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Department of Genetics, University of Sevilla, Spain. *Int Microbiol*; 7:249-260.

Contreras-Cornejo, H. A., López-Bucio, J. S., Méndez-Bravo, A., MacíasRodríguez, L., Ramos-Vega, M., Guevara-García, A. A., et al. (2015). Mitogen-activated protein kinase 6 and ethylene and auxin signaling pathways are involved in *Arabidopsis* root-system architecture alterations by *Trichoderma atroviride*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 28, 701–710. doi: 10.1094/MPMI-01-15-0005-R

Clear F, Valic N (2005). Effects of *Trichoderma* spp and *Gliocladium roseum* culture filtrates on seed germination of vegetables and maize. *J. Plant Dis. Prot.* 112(4): 343-350.

Crozier, A., Arruda, P., Jasmim, J. M., Monteiro, A. M., and Sandberg, G. (1988). Analysis of indole-3-acetic-acid and related indoles in culture-medium from *Azospirillum-lipoferum* and *Azospirillum-brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2833–2837.

Cruz L. (2007). Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C; 133 pp.

Gastal F and Lemaire G, N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *J Exp Bot* 53:789–799 (2002).

- Harman GE (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathol.* 96(2):190-194.
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviewer*, 2: 43-56.
- Hajieghrari B (2010). Effects of some Iranian *Trichoderma* isolates on maize seed germination and seedling vigor. *Afr. J. Biotechnol.* 9(28): 4342-4347
- Hoyos-Carvajal L, Orduz S and Bissett J, (2009). Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biol Control* 51:409–416.
- Idris, E. E., Iglesias, D. J., Talon, M., and Borriss, R. (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 619–626. doi: 10.1094/MPMI-20-6-0619.
- Kilian M, Steiner U, Krebs B, Junge H, Schmiedeknecht G, Hain R. (2006). FZB24® *Bacillus subtilis*-mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutznachrichten Bayer*, 1/00.1.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA. 2011. *Dictionary of the fungi*. 10th ed. UK: Wallingford; p. 131.
- Lieckfeldt E, Samuels GJ, Nirenberg HI, Petrini O. 1999. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species. *Appl Environ Microbiol.* 65:2418–2428.
- Miller RH, Soil microbiological inputs for sustainable agricultural systems, in *Sustainable Agricultural Systems*, ed. by Edwards CA, Lal R, Madden P, Miller RH and House G. Soil and Water Conservation Society, Ankeny, IA, pp. 614–623 (1990).
- Ousley MA, Lynch JM, Whipps JM (1994). Potential of *Trichoderma* spp. as consistent plant growth stimulators. *Biol. Fertil. Soils*, 17: 85- 90
- Otuño Noel, Miranda Claudia, Claros Mayra (2013). Selecting strains of *Trichoderma* spp. generating secondary metabolites of interest for use as a

growth promoter in plants grown. *Journal of the selva andina biosphere*. 1 (1):16-32.

Patten, C. L., and Glick, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42, 207–220. doi: 10.1139/m96-032

PROINPA,(2012). *Informes Anuales Promoción e Investigación de Productos Andinos*.

Rasool Azarmi, Behzad Hajierghrari, Abolfazl Giglou.(2011).Effect of *Trichoderma* isolates on Tomato seedling growth response and nutrient uptake. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(31), pp. 5850-5855.

SAGARPA. (2016). *Panorama Agroalimentario I café 2016*. Dirección de Investigación y evaluación Económica y Sectorial , 34.

Salazar-Badillo, F. B., Sánchez-Rangel, D., Becerra-Flora, A., López-Gómez, M., Nieto-Jacobo, F., Mendoza-Mendoza, A., et al. (2015). *Arabidopsis thaliana* polyamine content is modified by the interaction with different *Trichoderma* species. *Plant Physiol. Biochem.* 95, 49–56. doi: 10.1016/j.plaphy.2015.07.003.

Souza, R., Ambrosini, A., and Passaglia, L. M. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet. Mol. Biol.* 38, 401–419. doi: 10.1590/S1415-475738420150053.

Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG. 1998. *Guide to clinically significant fungi*. 1st ed. Baltimore: Williams & Wilkins.

Zheng Z, Shetty K (2000). Enhancement of pea (*Pisum sativum*) seedling vigor and associated phenolic content by extraction of apple pomace fermented with *Trichoderma* spp. *Proc. Bioch.* 36: 79- 84.

4. CAPÍTULO 4.

4.1 Evaluación de condiciones de infección del agente causal de roya de café (*Hemileia vastatrix*) para el incremento de inóculo.

4.1.1 Resumen

La roya de café es una de las enfermedades devastadoras para el cultivo de café a nivel mundial, es causada por el hongo *Hemileia vastatrix* biotrofo. La roya al igual que otro parasito obligado necesita condiciones muy estrictas para poder cumplir su ciclo de vida y poder propagar la enfermedad, como lo es la temperatura, luz y humedad relativa. En este estudio se realizó una evaluación de las condiciones de temperatura, luz y humedad 20°C con fotoperiodo 16h luz/ 8h oscuridad (incubador), 25°C con fotoperiodo 16h luz/ 8h oscuridad (incubador), temperatura y luz variable (Invernadero), para incrementar el inóculo de la roya de café que se requiere para posteriores ensayos. Se utilizaron plantas de seis meses de edad *Coffea arabica* var. *Typica* las cuales se inocularon en una sola hoja de la parte central de la planta con una solución de 1×10^6 uredinosporas mL⁻¹ utilizando un total de 10 plantas por tratamiento. El inóculo inicial fue extraído de plantas enfermas provenientes del estado de Colima. Las plantas fueron evaluadas los días 15, 22, 30, y día 40 después de la inoculación, la evaluación fue visual y consistió en contar el número de manchas cloróticas presentes en la hoja infectada, de acuerdo con los resultados las plantas del tratamiento 2 son las óptimas para el incremento de la enfermedad al observarse en los días evaluados un mayor número de manchas cloróticas síntomas primarios de la enfermedad en comparación con los demás tratamientos y controles.

4.1.2 Introducción

La roya del café es causada por el hongo *Hemileia vastatrix* que afecta las hojas de la planta de café y se considera la enfermedad más importante en el cultivo a nivel mundial. Este hongo causa defoliación y reduce el rendimiento de los cafetos (Avelino *et al.*, 2015).

La roya es un parásito obligado que afecta las especies de género *Coffea* siendo *C. arabica* la más atacada (Panstruga 2003; Avelino y Rivas, 2013). Los primeros síntomas de la roya aparecen en el envés de las hojas, por donde penetra el hongo a través de las estomas; dichos síntomas se manifiestan como pequeñas lesiones amarillentas que con el tiempo coalescen y producen uredosporas de color anaranjado (Avelino *et al.*, 1999). En el haz de la hoja, se visualizan manchas cloróticas; posteriormente, las lesiones se necrosan reduciendo la capacidad fotosintética de la planta. En etapas avanzadas, la enfermedad causa la defoliación de las plantas (Avelino *et al.*, 1999).

La roya causa pérdidas primarias donde hay muerte lenta de ramas y la cosecha de ese período llega a su fin, pero la muerte de ramas conduce a pérdidas secundarias donde se compromete la producción del siguiente ciclo (Avelino y Rivas 2013).

La epidemia de la roya puede ser severa incluso con poco inóculo primario, ya que se intensifica con el mayor número de ciclos que se puedan dar en el año, el cual depende de las condiciones adecuadas al patógeno, temperatura, intensidad de luz y humedad (Avelino, *et al.*, 2006).

Sin embargo, los efectos de la nutrición en plantas y su reacción ante las enfermedades son controversiales y complejos. La nutrición en plantas podría aumentar o reducir la resistencia fisiológica a los patógenos, dependiendo de la forma de atacar de estos (Avelino *et al.*, 2011). También podría afectar las epidemias a través del efecto de la nutrición sobre el crecimiento del hospedero (Ferrandino, 2008).

Las royas necesitan mantener las células del hospedero vivas para alimentarse de ellas (parásitos biotróficos), esto resulta en una asociación íntima hongo planta (Mendgen *et al.* 2000). Las células infectadas mueren al final del ciclo del parásito. En general los parásitos biotróficos están favorecidos por una nutrición adecuada que estimula el metabolismo de las células del hospedero, mientras que los parásitos necrotróficos están desfavorecidos cuando la nutrición vuelve las células más difíciles de degradar (Dordas 2008; Avelino *et al.* 2011).

La severidad de las recientes epidemias de la roya en Centroamérica y México ha ocasionado pérdidas del 40 al 50% en el rendimiento del cultivo (Cressey, 2013). De acuerdo a la Organización Internacional del Café (OIC, 2015), los factores económicos (descapitalización de productores) y agronómicos (falta de manejo del cultivo) han contribuido a alcanzar dichas pérdidas.

Derivado a este problema se han empleado estrategias de control, genético, químico, biológico, e inducción de resistencia con moléculas, para la mitigación de esta enfermedad, por lo que el objetivo de este capítulo es evaluar las condiciones de infección que necesita la roya de café para incrementar el inoculo infectivo que será usado en posteriores experimentos de control biológico e inducción de resistencia en condiciones de laboratorio.

4.1.3 Metodología

4.1.3.1 Material vegetal.

Se utilizaron plantas de café *Coffea arabica* provenientes de germinación de semillas in-vitro que posteriormente fueron aclimatadas en invernadero de seis meses de edad en las instalaciones del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ). Estas plantas fueron colocadas en macetas bajo condiciones de invernadero, en sustrato esteril a una proporción de 6:2:1 peatmoss, arena y vermiculita respectivamente para su posterior evaluación.

4.1.3.2 Material biológico.

Se utilizó la cepa patogénica *Hemileia vastatrix* aislada de plantas con síntomas de enfermedad de la roya de café. Las plantas con síntomas de la enfermedad fueron traídas del municipio de Colima de zonas cafetaleras del estado de Colima. Este aislamiento fue conservado en plantas vivas al ser un hongo que se conserva en tejido vivo y fueron colocadas en condiciones controladas a una temperatura constante de 25°C y un fotoperiodo de 16H luz/ 8H oscuridad hasta su uso.

4.1.3.3 Preparación del inóculo.

Para la obtención del inóculo para la evaluación de condiciones de infección de la roya de café se ubicaron los síntomas por el envés de las hojas enfermas y se les dio cuidadosamente un barrido a las pustulas regiones donde están aglomeradas las estructuras reproductivas de la roya (uredinosporas) recolectando el inóculo sobre una hoja de papel encerada para que sea más fácil la recuperación de la mayor cantidad de inóculo. Una vez recolectado el inóculo se puso en tubos falcom en una solución de tween 80 más agua destilada estéril a una concentración de 1mL L⁻¹ y se cuantificó en la cámara Neubauer ajustando a 1x10⁶ esporas/mL⁻¹ para su posterior uso.

4.1.4 Inoculación de roya (*Hemileia vastatrix*) en plantas de café.

Las plantas de café fueron regadas un día antes de la inoculación con abundante agua y estiladas durante la noche, el mismo día de la preparación del inóculo (*Hemileia vastatrix*) fueron inoculadas con 1mL de la suspensión del hongo a una concentración final de 1x10⁶ uredinosporas/mL. La suspensión se agregó directamente en el envés hoja de la parte central de la planta haciendo un pequeño corte transversal de 2 mm en la punta de esa hoja inoculada para mantenerla identificada. Las plantas fueron colocadas en las condiciones correspondientes a cada uno de los tratamientos.

4.1.4.1 Adaptación de condiciones climáticas.

Para la adaptación de condiciones climáticas tanto temperatura, luz y humedad las plantas fueron colocadas en diferentes puntos, para el caso de temperatura

y luz las plantas fueron colocadas en la incubadora a 20°C con fotoperiodo (16h luz/ 8h oscuridad), para las plantas que no requerían luz se les colocó una bolsa de plástico color negra para evitar el paso de luz, en la siguiente condición las plantas fueron transferidas en la incubadora a 25°C con fotoperiodo (16h luz/ 8h oscuridad) y para las plantas en condiciones de oscuridad se les colocó una bolsa de plástico color negro, la otra condición de temperatura fue variable en cuanto a luz y temperatura en el invernadero con malla sombra, considerando que el experimento se realizó en el mes de Octubre del 2019 la temperatura mínima promedio es de 13°C durante la noche y la máxima es de 30°C en el día. Para mantener una humedad relativa alta (80-90% HR) se colocó sobre las plantas una bolsa de plástico transparente con agua asperjada sobre las paredes para que generara un microambiente húmedo y asperjando agua una vez por semana, los tratamientos se especifican a continuación:

Cuadro 4.1 Condiciones para establecer el proceso de infección de roya

Tratamiento	Inoculación de roya (uridenosporas/mL)	Condiciones ambientales		
		Luz/oscuridad	Temperatura (°C)	Incubadora / invernadero
Control (C1)	S/l	Oscuridad	20	Incubadora
Control (C2)	S/l	Oscuridad	25	Incubadora
Control (C3)	S/l	Oscuridad	13 a 30	Invernadero
T1	1x10 ⁶	16h luz / 8h oscuridad	20	Incubadora
T2	1x10 ⁶	16h luz / 8h oscuridad	25	Incubadora
T3	1x10 ⁶	16h luz / 8h oscuridad	13 a 30	Invernadero
T4	1x10 ⁶	Oscuridad	20	Incubadora
T5	1x10 ⁶	Oscuridad	25	Incubadora
T6	1x10 ⁶	Oscuridad	13 a 30	Invernadero

T. tratamiento; C. Control; S/l. Sin inóculo

4.1.4.2 *Diseño experimental.*

Para el experimento de incremento de inóculo de roya en diferentes condiciones el diseño experimental fue de bloques al azar, los datos presentados corresponden a la media de diez replicas por tratamiento. Los datos fueron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias fue determinada por la prueba de LSD (P<0.05).

4.1.5 Resultados y discusión

La germinación de las uredinosporas de la roya se ve altamente afectadas por las condiciones de temperatura, luz y humedad por lo que fue necesario tomar rangos distintos y combinaciones de las condiciones ya descritas, estudios realizados para entender la infección causada por la roya muestran que las temperaturas óptimas para que este proceso se lleve a cabo interaccionan con una alta humedad, temperaturas que van de los 18°C a los 27°C y periodos cortos de luz (Santacreo R., et. al. 1983). En el caso de la roya el proceso de infección se da de la siguiente manera, Fig.4.1 infección de roya escala Sinavef . Como se puede ver en los resultados de este estudio solamente se lograron observar amarillamiento y necrosis de sitios puntuales en el envés de las hojas como síntomas de inicio de la enfermedad causada por la roya. En otros estudios se hace mención que en algunas evaluaciones la roya puede tardar entre 40 y 60 días para que inicie la fase reproductiva del hongo produciendo estructuras amarillas y polvorosas para continuar el ciclo de infección de este hongo (Moreno de Alas. G 1985).

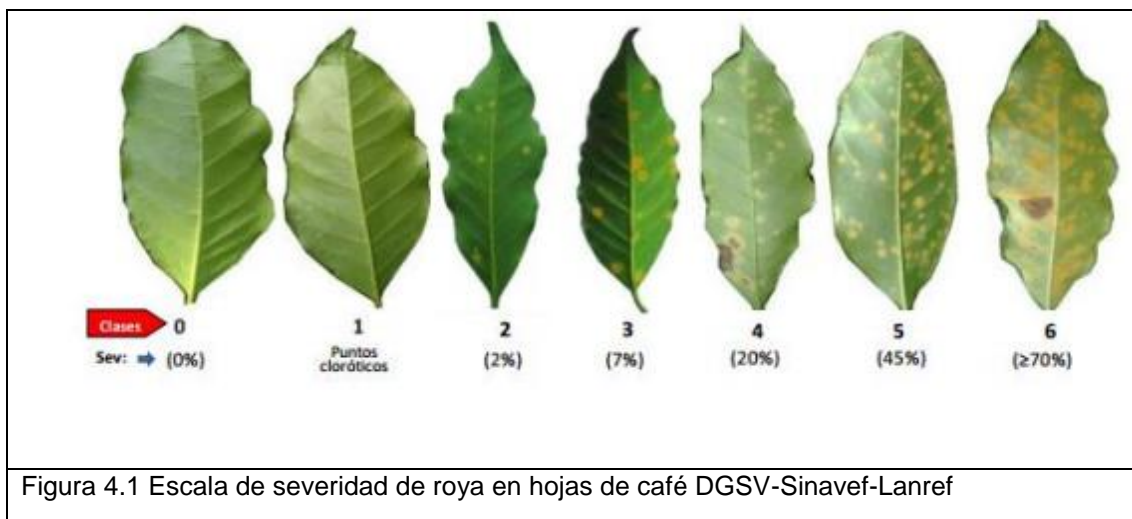


Figura 4.1 Escala de severidad de roya en hojas de café DGSV-Sinavef-Lanref

En este estudio evaluando solo 40 días y se puede observar que el rango óptimo de en donde se producen síntomas relacionados con la infección de la roya ocurre entre el día 22 al día 40 después de la infección. Cuadro 4.2.

Cuadro 4.2 Evaluación de la severidad de roya en plantas de café

Conteo de manchas cloróticas y necróticas				
T	Día 15	Día 22	Día 30	Día 40
Control 1	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
Control 2	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^c	0.90±0.54 ^{bc}
Control 3	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^c	0.20±0.13 ^c
H 1	0.00±0.00 ^b	0.40±0.30 ^b	0.70±0.33 ^{bc}	2.10±0.70 ^{bc}
H2	1.30±0.39 ^a	2.30±0.36 ^a	3.40±0.56 ^a	5.20±0.71 ^a
H3	0.50±0.26 ^b	1.00±0.42 ^b	1.60±0.63 ^b	3.50±1.1 ^{ab}
H4	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
H5	0.20±0.20 ^b	0.20±0.20 ^b	0.20±0.20 ^{bc}	0.40±0.30 ^c
H6	0.00±0.00 ^b	0.50±0.34 ^b	0.50±0.34 ^{bc}	0.80±0.41 ^c

Las hojas evaluadas en los diferentes tratamientos muestra como las hojas intermedias, la humedad relativa alta, luz y temperaturas favorece la infección del hongo provocando lesiones en diferentes puntos de las hojas como el caso del tratamiento H2 y H3 en donde el hongo presenta un daño de un 45 % y 20% respectivamente de acuerdo a la escala de severidad ubicando a estos dos tratamientos en el nivel 5 y 4 de este rango, de acuerdo con lo reportado por Jong y colaboradores (1987) la formación de un apresorio sobre el estoma parece necesaria para que se realice la penetración. Temperaturas frescas entre 13°C y 16°C son favorables a esta formación. La alternancia de altas temperaturas (22-28°C, lo que favorece la germinación de las esporas) y bajas temperaturas (13- 16°C, favoreciendo la formación del apresorio) permite que la infección tenga lugar en menos de 6 horas por lo que la presencia tanto en invernadero como en temperaturas controladas se logra apreciar los daños causados por el hongo, en condiciones de invernadero se generan menor número de lesiones con mayor área de daño, mientras que en condiciones controladas (25°C en incubadora) se presentaban mayor número de manchas con menor área de daño, esto puede deberse porque ocurre una mayor germinación de esporas, las cuales generan mayor número de apresorios, causando mayor número de lesiones.

En condiciones de invernadero con temperaturas variables (entre 13°C y 30°C) las temperaturas mínimas favorecen el desarrollo del hongo, sin embargo, las temperaturas elevadas inhiben el crecimiento de la roya, como consecuencia se tiene una menor penetración de apresorios y una menor germinación de esporas.

Fig. 4.2.

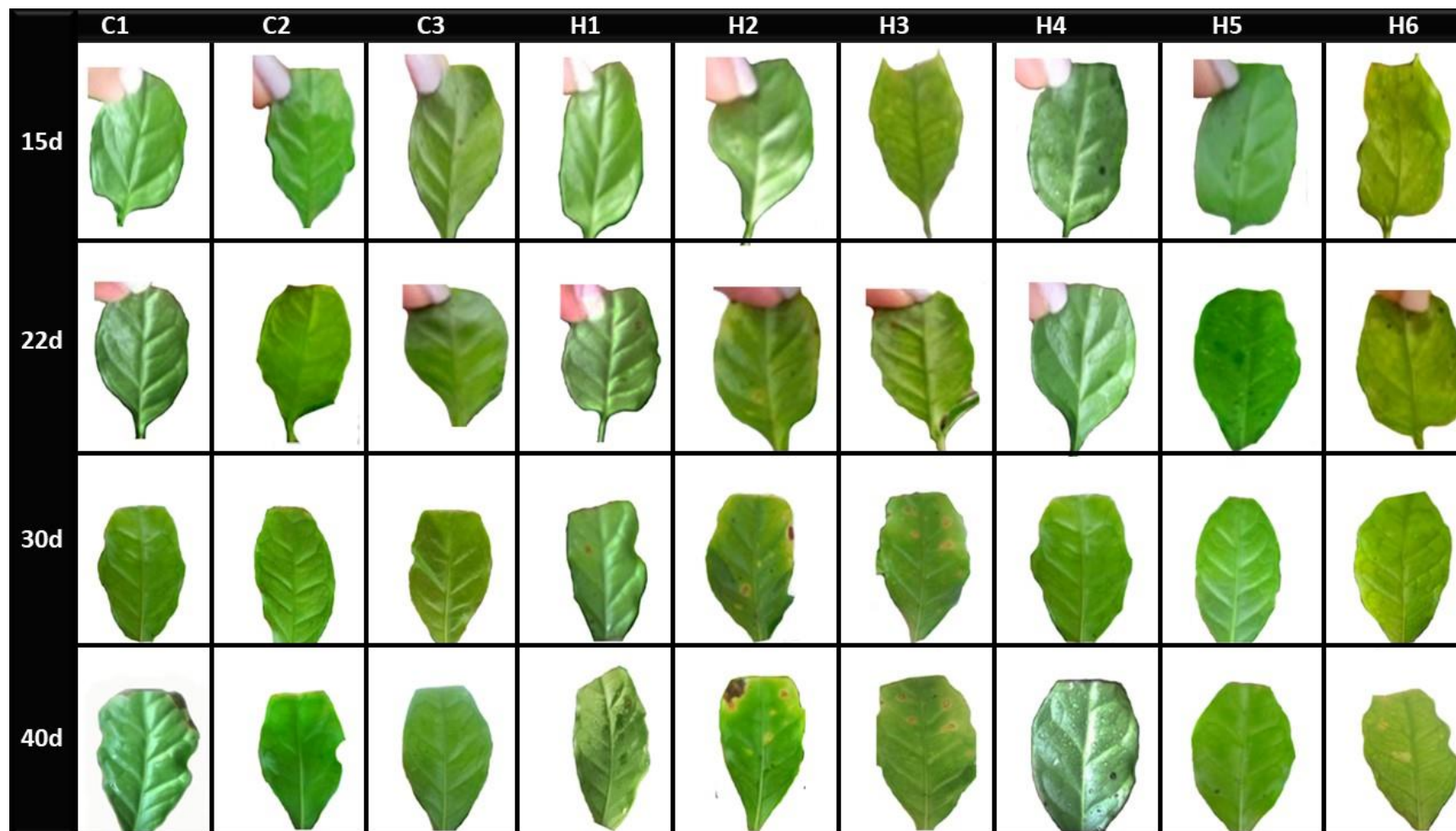


Figura 4.2 Evaluación y seguimiento de la infección de roya en hojas de cafeto hasta el día 40.

Para el caso de los demás tratamientos la enfermedad presento baja o nula incidencia debido al principal factor de baja humedad (aproximadamente 30% HR) como en el caso de los controles (c1 c2 y c3), además se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo (16h luz y 8 oscuridad). En caso de los tratamientos H4, H5 y H6 se mantuvo una humedad elevada (aprox entre 80 y 90% HR), en condiciones de oscuridad. En condiciones de baja humedad la enfermedad no se desarrolla, debido a que las uredinosporas de roya no logran completar su ciclo de germinación y colonización, efecto que se ha observado por algunos autores, en el que la dispersión de la roya en tiempo de lluvias la enfermedad incrementa y en tiempo de seca disminuye drásticamente los síntomas de la infección (Avelino *et al.*, 1991, Galvez *et al.*, 1980, Holguin, F., 1985, Santacreo *et al.*, 1983.) , el factor luz también es de suma importancia ya que algunos autores asocian que la baja intensidad de luz beneficia la germinación de las uredinosporas de roya y a su vez la luz permite la colonización y formación de austerios de esta manera explican por qué la roya incrementa su propagación en días más cortos del año (Salgado *et al.*, 2007, Soto-Pinto *et al.*, 2002, Staver *et al.*, 2001). En nuestro caso se podría explicar que los tratamientos sin luz presentaron germinación de la roya, pero debido a la falta de luz el hongo no logró colonizar los tejidos de hoja por lo que termino muriendo el inoculo germinado y no logró infectar la hoja.

4.1.6 Conclusiones

Los estudios previos realizados en esta evaluación son una alternativa para trabajar con este tipo de hongos que al comportarse como biotrofos o parasitos obligados se pueda conservar esta enfermedad con suficiente viabilidad en tejido vivo y así seguir generando nuevas modelos de investigación que nos ayude a mitigar su desarrollo y control de esta enfermedad devastadora para los cultivos de café en campo. Al investigar el comportamiento de dicho hongo, entender la forma de como infecta y las condiciones necesarias que requiere para desarrollar la enfermedad en plantas de café, se pueden realizar distintos ensayos en los

cuales se puedan evaluar distintas moléculas que nos ayuden reducir los síntomas o erradicar por completo la enfermedad.

En cuanto a este estudio el seguimiento de la infección se efectuó hasta el día 40, en el cual se observó las primeras etapas de infección de la roya (manchas cloróticas y necróticas de la hoja), sin embargo, no se lograron apreciar las uredinosporas (partes reproductivas del hongo) que aparecen en el envés de las hoja, esto puede deberse a que la infección no completo su ciclo hasta el día 40 de evaluación, por lo que se sugiere extender el periodo de evaluación hasta el día 90.

Para los parámetros evaluados el tratamiento H2 (25°C, alta humedad y fotoperiodo) fue el que presentó una mejor evolución de los síntomas de la roya, por lo que se sugiere que las próximas evaluaciones se establezcan bajo estas condiciones, para lograr resultados más certeros y confiables que ayuden a comprender en condiciones controladas el comportamiento de la roya, que nos permita hacer mejores predicciones al momento de evaluar en campo y generar estrategias efectivas para controlar la enfermedad.

4.1.7 Bibliografía

Avelino J, Cristancho M, Georgiou S, Imbach P, Aguilar L, Bornemann G, Läderac P, Anzueto F, Hruska AJ and Morales C. 2015. The coffee rust crisis in Colombia and Central America (2008-2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security* 7: 303-321. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0446-9>

Avelino, J.; Muller, R.; Eskes, A.; Santacreo, R.; Holguin, F. 1999b. La roya anaranjada del cafeto: mito y realidad. *DESAFIOS de la caficultura en Centroamérica*.

Avelino, J.; Zelaya, H.; Merlo, A.; Pineda, A.; Ordóñez, M.; Savary, S. 2006. The intensity of a coffee rust epidemic is dependent on production situations. *Ecological modelling* 197(3): 431-447.

Avelino, J.; Hoopen, G.M.T.; DeClerck, F.A.J. 2011. Ecological Mechanisms for Pest and Disease Control in Coffee and Cacao Agroecosystems of the Neotropics. *MEASURING ECOSYSTEM SERVICES*: 92-118.

Avelino, J.; Rivas, G. 2013. La roya anaranjada del cafeto <http://hal.archives-ouvertes.fr/hal01071036>, 47 p.

Cressey D. 2013. Coffee rust regains foothold: researchers marshal technology in bid to thwart fungal outbreak in Central America. *Nature* 493 (7434):587. Disponible en línea: <http://www2.tap-ecosur.edu.mx/mip/Plagas/Roya/pdfs/Notas/Coffee%20rust%20regains.pdf>.

Dordas, C. 2008. Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. *Agron. Sustain* (28): 33–46.

Ferrandino, F.J. 2008. Effect of crop growth and canopy filtration on the dynamics of plant disease epidemics spread by aerially dispersed spores. *Phytopathology* 98: 492-503.

Holguín, F., 1985. Epidemiología de la roya del cafeto bajo diferentes condiciones ecológicas, in: 2 Reunión Regional del PROMECAFE sobre el Control de la Roya del Cafeto, IICA: Tegucigalpa, Honduras. p. 150-158.

Mendgen, K.; Struck, C.; Voegelé, R.T.; Hahn, M. 2000. Biotrophy and rust haustoria. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (46): 141-145.

OIC. 2015. Informe sobre el brote de la roya del café en Centroamérica y Plan de acción para combatirla. Organización Internacional del Café. Disponible en línea: [http:// www.ico.org](http://www.ico.org).

Moreno de Alas, G., 1985. Evaluación de la influencia de las variables climáticas en el comportamiento epidemiológico de la roya del cafeto en una zona climática de El Salvador, in: VIII Simposio Latinoamericano sobre Caficultura, IICA: Granada, Nicaragua. p. 165-172.

Panstruga, R. 2003. Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 320-326.

Santacreo, R., Polanco, E., y Oseguera, S., 1983. Periodo de incubación y generación de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. en tres zonas cafetaleras de Honduras, Centro América, in: VI Simposio Latinoamericano sobre Caficultura, IICA: Panamá, Panamá. p. 109-127.

Soto-Pinto, L., Perfecto, I., y Caballero-Nieto, J., 2002. Shade over coffee: its effects on berry borer, leaf rust and spontaneous herbs in Chiapas, Mexico. *Agroforestry Systems*. 55(1): 37-45

5. CAPÍTULO 5.

5.1 Evaluación de la efectividad biológica de bioestimulantes (quitosano) en la inducción de resistencia a la roya del café (*Hemileia vastatrix*).

5.1.1 Resumen

México es uno de los principales productores de café a nivel mundial. La producción de este grano disminuye debido a la enfermedad de la roya causada por el hongo (*Hemileia vastatrix*). Se evaluó la efectividad biológica del quitosano para inducir en café una respuesta de resistencia ante la roya, para esto se hicieron aplicaciones foliares de quitosano de 0.01% y 0.05% en plantas de café *Coffea arabica* var. Criolla de 6 meses de edad y como control se usó agua destilada estéril, diez días después de la aplicación se muestrearon hojas por tratamientos y control para esto se usó la técnica de discos, se cortaron 30 discos de 5mm de diámetro por tratamiento, se les dio una previa desinfección para ser inoculados con una solución 1×10^6 de uredinosporas de roya, para el control se aplicó agua destilada estéril. Una vez inoculados los discos se pusieron en placas de petri con papel filtro para mantener hidratado el disco se incubaron a 22 °C durante 24 horas en oscuridad y se transfirieron a fotoperiodo 8/16. Transcurridos 30 días se evaluó la severidad de la enfermedad en los discos, la cual para nuestro control en algunos discos hubo infección total del área en comparación con nuestros tratamientos de quitosano que se redujo un 80 y 90%. Este resultado nos muestra la factibilidad de usar el quitosano para disminuir la enfermedad de la roya.

5.1.2 Introducción

México es el décimo productor de café a nivel mundial. La producción de este grano disminuye debido a la enfermedad de la roya causada por el hongo (*Hemileia vastatrix*).

El impacto económico de *H. vastatrix* en el cultivo del café no sólo se debe a la reducción de la cantidad y la calidad de la producción, sino también a la necesidad de implementar costosas medidas de control en los cultivares susceptibles (CABI, 2016).

La roya es la enfermedad más destructiva del cafeto y la de mayor importancia económica a nivel mundial, debido a que provoca la caída prematura de las hojas, propiciando la reducción de la capacidad fotosintética, así como el debilitamiento de árboles enfermos y en infecciones severas puede ocasionar muerte regresiva en ramas e incluso la muerte de árboles (APS, 2011).

Actualmente, los métodos de control se basan en mejorar variedades para aumentar la resistencia de la planta (Gatica-Arias *et al.*, 2017) escapando de la enfermedad a través de la plantación de café en altitudes más altas y aplicaciones de fungicidas. Los pesticidas químicos han provocado un grave impacto ambiental a nivel mundial. Sin embargo, la integración de productos y moléculas naturales con actividad antifúngica contra *H. vastatrix*, reduce o elimina el impacto de la aplicación de fungicidas convencionales y estos a su vez representa una alternativa más para el control de enfermedades (Ştefan *et al.*, 2015; Cosoveanu *et al.*, 2016).

El quitosano es un biopolímero policatiónico compuesto de glucosamina y N-acetilglucosamina unidades derivadas de la quitina, que es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza y un componente de conchas y exoesqueletos de crustáceos, insectos, hongos y levaduras (Khosravi *et al.*, 2017).

Existe abundante literatura sobre su desarrollo comercial como biomaterial para alimentos y sobre su uso en los sectores farmacéutico, médico, textil, agrícola y medioambiental (Jiménez *et al.*, 2020). En agricultura, varios estudios informaron

que el quitosano es único sus propiedades biológicas lo convierten en un componente esencial para una nueva generación de productos que tienen un bajo impacto ambiental. El quitosano inhibe el crecimiento y desarrollo de diferentes fitopatógenos, incluidos hongos, oomicetos y bacterias. Además, activa el sistema inmunológico de las plantas, otorgando protección contra un amplio espectro de patógenos (Beatrice *et al.*, 2017).

Para disminuir los ataques de patógenos, las plantas poseen propiedades químicas, físicas y enzimáticas respuestas defensivas. Este sistema inmunológico puede inducirse cuando el patrón de la membrana celular los receptores de reconocimiento (PRR) reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) durante la patogénesis, lo que resulta en la aparición de inmunidad activada por PAMP (PTI). Sin embargo, los patógenos tienen efectores que inhiben la PTI, lo que resulta en la aparición de enfermedades (López *et al.*, 2021).

La inducción de la respuesta de defensa se puede lograr mediante elicitores o inductores de defensa de las plantas, que modulan algunas respuestas en las plantas, y el quitosano está en este grupo. El polímero se reconoce como una respuesta molecular asociada a microbios (MAMP) porque su estructura es muy similar a la de los fragmentos de la pared celular de los hongos (Xoca *et al.*, 2019). El quitosano ha demostrado su actividad como inductor de defensa en cultivos como el caucho, jengibre, berenjena, vid y *Arabidopsis thaliana* (Kuyyogsu *et al.*, 2018, Liu *et al.*, 2016, Jannat *et al.*, 2018, Lucini *et al.*, 2018, Jia *et al.*, 2016).

Por lo que en este trabajo el objetivo fue evaluar la respuesta de quitosano de alta densidad en dos concentraciones para reducir o controlar la enfermedad de *H. vastatrix* en discos de hojas de plantas de café y observar que ocurre microscópicamente cuando se lleva la interacción *H. vastatrix-Coffea arabica* en plantas tratadas con y sin quitosano.

5.1.3 Metodología

5.1.4 Material vegetal

Las plantas de café (*Coffea arabica*) fueron obtenidas a partir de semillas germinadas en condiciones in vitro, la preparación del medio de cultivo y las condiciones fueron de acuerdo con Quiroz y colaboradores (2006) con sales del medio MS (Murashige and Skoog, 1962) suplementado con vitaminas Morel (Morel, 1965), 25mg/L de cisteína HCL, 3% (p/v) de sacarosa, 0.1mg/L ácido naftalen acético (ANA), 0.5mg/L de cinetina y 0.25%(p/v) de gelrite. El pH del medio fue ajustado a 5.8 y después fue autoclaveado por 20 min a 120°C. Las condiciones del cultivo fueron en fotoperiodo de 16h a 25±2°C, y los explantes fueron subcultivados cada dos meses, cuando las plántulas desarrollaron las primeras hojas verdaderas (3 meses), estas fueron transferidas en macetas con sustrato estéril en una proporción de 6:2:1 peatmoss, arena y vermiculita respectivamente. Las plántulas se colocaron en el cuarto de incubación en condiciones de fotoperiodo (16h luz) a una temperatura de 25±2°C para su posterior evaluación.

5.1.5 Material biológico.

Se utilizó la cepa patogénica *Hemileia vastatrix* aislada de plantas enfermas de café (*Coffea arabica*) con síntomas de roya (*Hemileia vastatrix*), las plantas fueron obtenidas de zonas cafetaleras del Estado de Colima y trasladadas al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Zapopan Jalisco, México. La cepa de *Hemileia vastatrix* fue conservada hasta su uso a través de reinfecciones de plantas de café susceptibles a la roya bajo condiciones controladas con un fotoperiodo (16h luz) a una temperatura constante de 25°C. La suspensión de esporas de *H. vastatrix* empleada para el bioensayo de efectividad biológica se realizó de la siguiente manera: las esporas de hongos se tomaron de hojas infectadas y se resuspendieron en 0.05%(v/v) tween 20, posteriormente se realizó el conteo de esporas en la cámara de Neubauer para efectuar el ajuste de la concentración a 1×10^6 urideno esporas/mL.

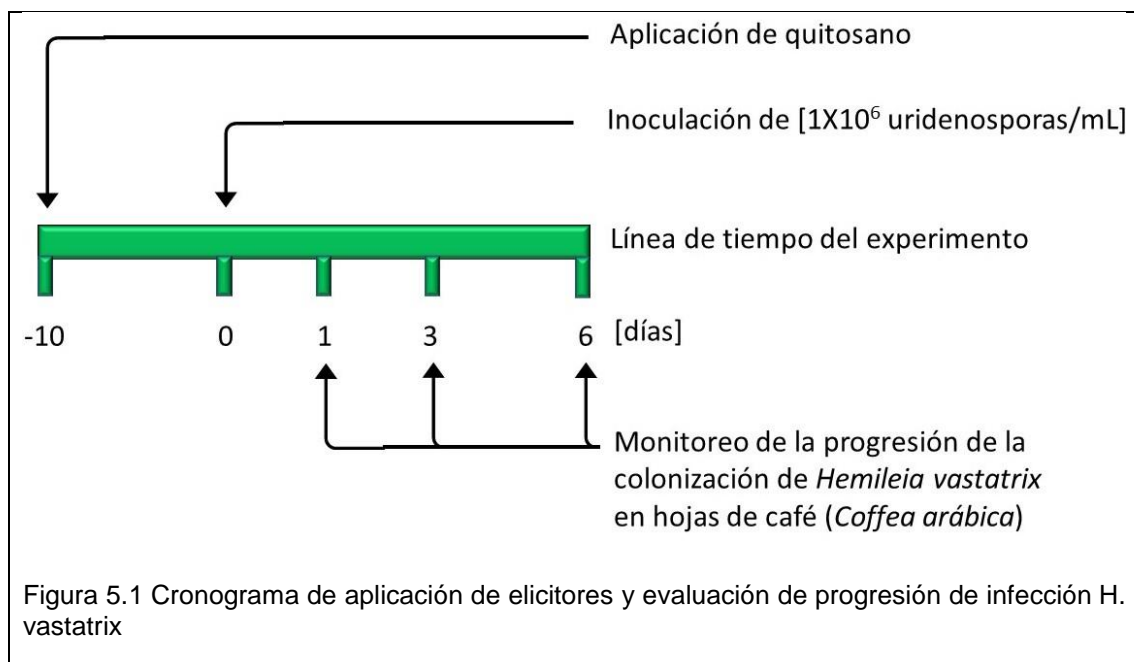
5.1.6 Solución de quitosano

Se diluyó el quitosano de alto peso molecular (Sigma-Aldrich) en 1% (p/v) en 0.4M de ácido acético y se llevó a una concentración final de 0.01 y 0.05%(v/v).

5.1.7 Bioensayo de efectividad biológica con quitosano *in vitro*

Se utilizaron plantas de café (*Coffea arabica*) con seis meses de edad (con 6 a 7 hojas). Para el experimento del bioensayo de efectividad biológica con quitosano se establecieron los siguientes tratamientos: TEF1. Control (agua destilada); TEF2. 0.01%(v/v) quitosano de alto peso molecular; TEF3: 0.05%(v/v) de quitosano de alto peso molecular. De acuerdo al cronograma (Fig. 5.1) en el día -10 (menos diez) se les aplicó de forma foliar a las plantas de café con seis meses de edad, 3mL de la solución correspondiente a cada tratamiento (TEF1, TEF2 y TEF3) . Transcurridos diez días después de la aplicación del quitosano, el monitoreo de la progresión de la colonización de *H. vastatrix* se realizó a partir de secciones de hoja cortadas de las plantas tratadas previamente con elicitores de acuerdo con los tratamientos TEF1, TEF2 y TEF3, como se indica a continuación: la evaluación de efectividad biológica se realizó a partir de las

secciones de hoja (Eskes y Toma-Braghini 1981; Ramiro D.A et al., 2009), de la siguiente manera, se cortaron hojas maduras de plantas de café sana (*Coffea arabica*), las cuales se desinfectaron en condiciones asépticas con etanol al 70° durante 1 minuto y posteriormente se realizó un enjuague con agua destilada estéril. Una vez desinfectadas las hojas de café fueron cortadas en forma de círculo con ayuda de un sacabocados, posteriormente cada sección de hoja (disco foliar con 1.5cm de diámetro) fueron inoculadas con 100 microlitros de una suspensión de esporas de *H. vastatrix* (1×10^6 uridenosporas /mL), posteriormente se colocaron en una cámara húmeda en condiciones de fotoperiodo (16h luz) o es en oscuridad? a una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Durante el bioensayo se realizaron muestreos de hojas al día 1, 3 y 6 días para realizar observaciones en el microscopio de fluorescencia.



5.1.8 Tinción de muestra para observación de microscopio.

El monitoreo de la progresión de la colonización de *Hemileia vastatrix* en las hojas de café fue por medio de una tinción descrita por Nowiki y colaboradores (2012), con modificaciones menores, el tejido (hojas de café) de los tratamientos del bioensayo de efectividad biológica se colocaron en una solución fijadora de

4% de formaldehído-alcohol-acético (FAA) en 0.2M de regulador de fosfatos (pH 7.2) durante 7 días en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$). Posteriormente las muestras se rehidrataron de manera escalonada (15 minutos cada paso) empleando 96, 80, 70 y 50% de etanol en agua. Después se colocaron las hojas en una solución de azul de tripano de lactofenol (10mL de agua, 10mL de ácido láctico, 10mL de glicerol, 10g de fenol, 10mg de azul tripán) durante 12h, en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente (25°C), transcurrido este tiempo el colorante de azul de tripano es reemplazado con hidrato de cloral (1g por cm^{-3}), posteriormente se tiñó el tejido durante la noche (6h) a temperatura ambiente con azul de anilina (0.05%) en 150mM de KH_2PO_4 con pH 9 y se destiñe con una solución de 150mM de KH_2PO_4 con pH 9.5 durante 15 minutos, Posteriormente las muestras se colocaron en solución Uvitex 2B al 0.01% durante 1 minuto en condiciones de oscuridad. Se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril durante 5 minutos cada uno para retirar el exceso de Uvitex 2B. Finalmente se coloca la muestra en un portaobjetos y se adiciona unas gotas de solución de lactoglicerol (20 ácido, 40 glicerol, 40 agua destilada estéril).

Para la observación de imágenes en el microscopio confocal Leica, Modelo TCS SPE, utilizando las condiciones establecidas para azul de tripano, 488nm de excitación y 512nm de emisión. Para el azul de anilina se utilizó, 408nm de excitación y 513-530nm de emisión. Las imágenes de la serie Z se recogieron a intervalos de 0.7-1micrometro a través de las muestras. Todas las imágenes se procesaron con EZ C1 free-viewer; las cuantificaciones digitales empleadas por ImageJ (Nowiki et al., 2012).

5.1.9 Resultados y discusión

En este ensayo se realizó un análisis descriptivo con las imágenes observadas al microscopio y se tomaron las muestras más representativas de cada uno de los tratamientos en donde se observa el comportamiento de la roya al inicio de la infección con Quitosano alto peso molecular a concentración 0.05% y 0.01% y el control con agua destilada.

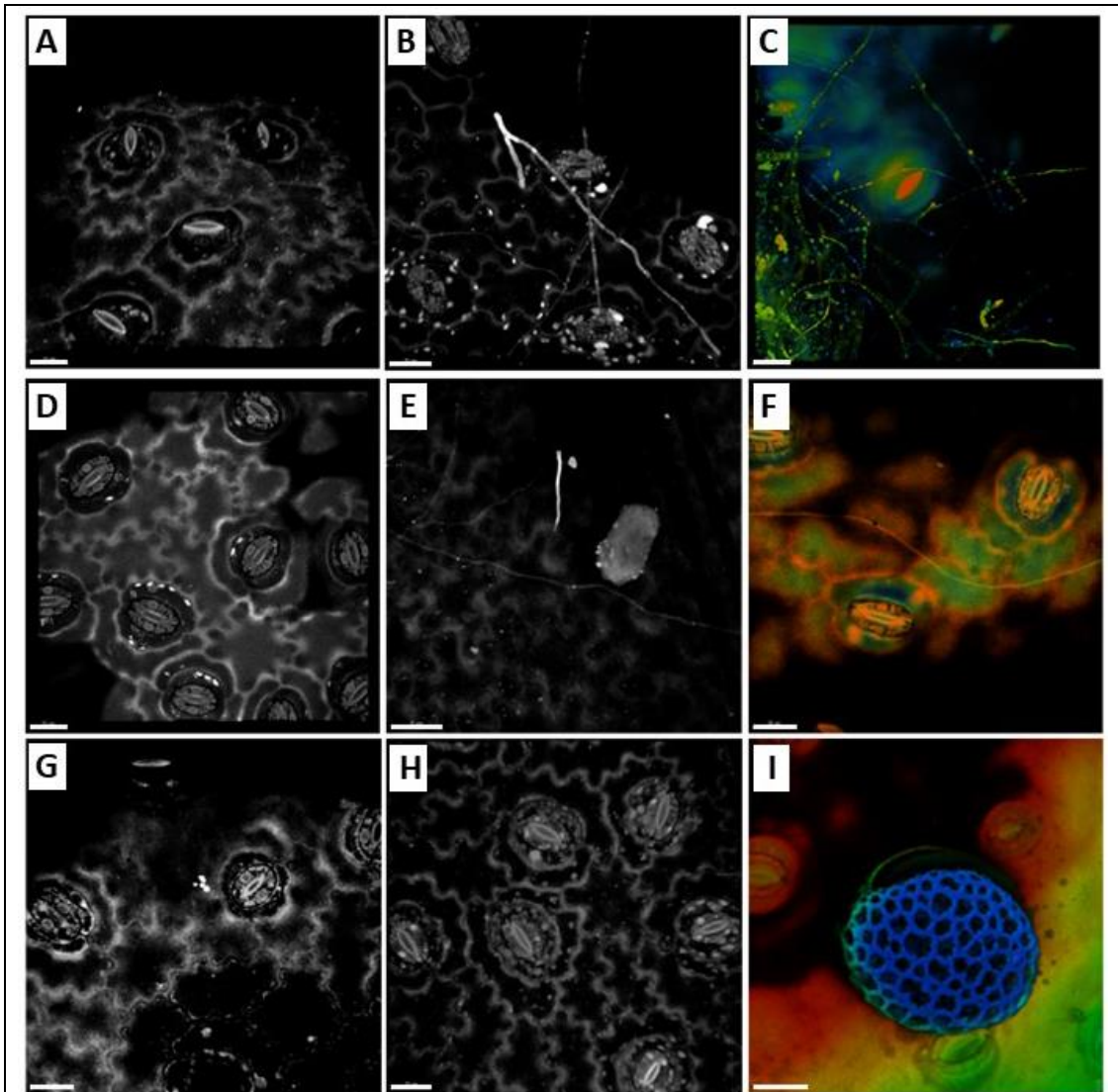


Figura 5.2 Proceso de infección de roya en plantas susceptibles de café. Las plantas fueron inoculadas con una suspensión de esporas de *Hemileia vastatrix* (1×10^6 uridenosporas / mL), y fueron observadas en el microscopio confocal. A-C) Tratamiento control (TEF1) sin quitosano, D-F) Tratamiento TEF2, pretratamiento con 0.01% de quitosano de alto peso molecular, G-I) Tratamiento TEF3, pretratamiento con 0.05% de quitosano de alto peso molecular. A, D y G) Un día después de la inoculación (ddi) con uridenosporas (B, E y H) 3 ddi con uridenosporas (C, F e I) 6 ddi con uridenosporas

En el día 1, 24 horas de haber infectado la solución de uridenosporas de roya se puede observar como en todos los tratamientos y control el tejido está sano y sin presencia de austerios, debido al poco tiempo de haber hecho la inoculación según reportes mencionan que la uridenospora de roya tarda 6 horas en iniciar la germinación y alrededor de 48 en iniciar la infección (Oviedo et al 2016). , por

lo que se realizó otro muestreo a las 72 horas o tres días y seis días después obteniendo algunos resultados interesantes (Fig. 5.2), para el control TEF1, se puede observar como se encuentra un alto contenido de micelio colonizando algunos estomas por lo que se puede comprobar que el inoculo era viable al momento de la inoculación, en el tratamiento TEF2 con quitosano al 0.01 se puede observar la presencia de esporas germinadas pero las hifas aún no están colonizando a los estomas de esa sección del tejido y para el tratamiento TEF3 sigue observándose el tejido sano sin presencia de hifas del hongo al día 3, para el caso de día 6 siguen siendo parecidas las imágenes entre los tratamientos del día 3 pero el tratamiento TEF1 se observa como el tejido está totalmente colonizado por el hongo y algunas hifas se encuentran penetrando los estomas por lo que a este tiempo debe de haber infectado el hongo al tejido, formando austorios que le permitirán desarrollar la enfermedad, para el caso TEF2 se sigue observando presencia de hifas pero el tejido se encuentra sano y aun no se ve la presencia de hifas penetrando al tejido, y para el tratamiento TEF3 el tejido aún está sano con presencia de uredinosporas sin germinar y sin presencia de hifas.

Este resultado en cuanto a la observación microscópica muestra que para el caso de nuestro control PEF1 está ocurriendo la infección de la roya en comparación con los tratamientos PEF2 Y PEF3, lo interesante en estos últimos tratamientos con concentraciones distintas de quitosano muestran que para el tratamiento PEF2 con quitosano al 0.01% pudiera estar ocurriendo alguna inducción que no le permite al hongo penetrar el tejido y solo crecen las hifas sobre el tejido buscando alguna entrada por los estomas, y en el tratamiento PEF2 a la concentración de quitosano 0.05% se observa el tejido sano y presencia de esporas que no germinaron por lo que esta concentración de quitosano pudiera estar causando alguna inhibición en la germinación de esporas de roya. Estudios realizados por otros investigadores indican que el poder fungicida del quitosano influye directamente sobre los hongos afectando la germinación, esporulación y aumento del micelio. Dicha acción fungicida se debe a la interacción de los grupos amino que en medio ácido se cargan de forma positiva, con los residuos de macromoléculas en la pared de los hongos, lo cual

modifica la permeabilidad de la membrana plasmática y altera las funciones normales del hongo; también se ha encontrado que altera las células del patógeno causando deficiencia en su formación (Guerra-Sánchez, Vega-Pérez, Velázquez-del Valle, & Hernández-Lauzardo, 2008; Lárez Velasquez, 2008; Sánchez-Domínguez, Bautista-Baños, & Castillo Ocampo, 2007; Yien, Zin, Sarwar, & Katas, 2012; Ziani, Fernández-Pan, Royo, & Mate, 2009).

5.1.10 Conclusiones

Con estas pruebas en hojas se logró monitorear el avance de la enfermedad causada por la roya desde el día de su inoculación hasta el día de su infección y tener un amplio panorama de como ocurre el proceso de colonización del hongo en la hoja.

Se generó una respuesta de los mecanismos que está ejerciendo la planta al ser inducida con quitosano a dos concentraciones a comparación de nuestro control el cual si logra ser infectado por el hongo.

Las diferentes concentraciones de quitosano tuvieron respuestas diferentes sobre la inducción temprana en hojas la cual por las observaciones se puede tomar la concentración de 0.05 % que fue la que mejor respuesta de inducción nos generó al momento de la inoculación del *Hemileia vastatrix* en próximas investigaciones.

El método de doble tinción descrito por Nowiki *et al* (2012) es una buena herramienta para entender como ocurre la interacción planta patógeno como es el caso de *Hemileia vastatrix* y cómo es que la planta reacciona ante la infección.

5.1.11 Bibliografía

- APS. 2011. The American Phytopathological Society. Coffee rust (*Hemileia vastatrix*). En línea: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/CoffeeRust.aspx>.
- Beatrice, C.; Linthorst, J.M.H.; Cinzia, F.; Luca, R. Enhancement of PR1 and PR5 gene expressions by chitosan treatment in kiwifruit plants inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Eur. J. Plant Pathol.* 2017, 148, 163–179.
- CABI. 2016. Crop Protection Compendium. CAB International, Wallingford, UK, 2016. En línea: <http://www.cabi.org/compendia/cpc/>.
- Cosoveanu, A., Nita, C.E., Iacomi, B.M., Rodriguez Sabina S., Cabrera, R. 2016. Active fungal endophytes against phytopathogenic fungi-dwellers of Romanian and Canarian *Artemisia* spp. *Scientific Papers. Series B, Horticulture, Volume LX*, Print ISSN 2285-5653, 291-298.
- Eskes AB, Toma-BraghiniM, 1981. Assessment methods for resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk.&Br.). *FAO Plant Protection Bulletin* 29, 56–66.
- Nowicki M., Lichočka M., Marzena NOWAKOWSKA, Urszula KŁOSIŃSKA, Gatica-Arias, A.M., Vargas-Segura, C., SanchezAguilar, K., Tapia-Fernandez, A., Araya, E. and Valdez-Melara, M.F., 2017. Application of Chemical Mutagenesis to Increase the Resistance of Coffee (*Coffea arabica* L.) to Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*). In *in vitro cellular and developmental biology animal*. Springer vol. 53, S55-S55, 233.
- Jia, X.; Meng, Q.; Zeng, H.; Wang, W.; Yin, H. Chitosan oligosaccharide induces resistance to Tobacco mosaic virus in *Arabidopsis* via the salicylic acid-mediated signalling pathway. *Sci. Rep.* 2016, 6, 26144.
- Khosravi, F.; Dehestani, A.; Gharanjik, S. Molecular responses of *Phytophthora capsici*-challenged cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants as influenced by resistance inducer application. *J. Plant Mol. Breed.* 2017, 5, 1–10.
- Liu, Y.; Wisniewski, M.; Kennedy, J.F.; Jiang, Y.; Tang, J.; Liu, J. Chitosan and oligochitosan enhance ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) resistance to rhizome rot caused by *Fusarium oxysporum* in storage. *Carbohydr. Polym.* 2016, 151, 474–479.

López-Velázquez, J.C.; Haro-González, J.N.; García-Morales, S.; Espinosa-Andrews, H.; Navarro-López, D.E.; Montero-Cortés, M.I.; Qui-Zapata, J.A. Evaluation of the Physicochemical Properties of Chitosans in Inducing the Defense Response of *Coffea arabica* against the Fungus *Hemileia vastatrix*. *Polymers* 2021, 13, 1940. <https://doi.org/10.3390/polym13121940>.

Lucini, L.; Baccolo, G.; Roupael, Y.; Colla, G.; Bavaresco, L.; Trevisan, M. Chitosan treatment elicited defence mechanisms, pentacyclic triterpenoids and stilbene accumulation in grape (*Vitis vinifera* L.) bunches. *Phytochemistry* 2018, 156, 1–8.

MOREL, G.M. Clonal propagation of orchids by meristems culture. *Cymbidium Soc News*, 1965, vol. 20, p. 3-11.

MURASHIGE, Toshio and SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, July 1962, vol. 15, no. 3, p. 473-497.

Paulina GOLIK, Elżbieta U. KOZIK, 2012. A SIMPLE DUAL STAIN FOR DETAILED INVESTIGATIONS OF PLANT-FUNGAL PATHOGEN INTERACTIONS. *Vegetable Crops Research Bulletin* 77; 61-74. DOI: 10.2478/v10032-012-0016-z.

Quiroz-Figueroa F, Monforte-González M, Galaz-Avalos RM, Loyola-Vargas VM. Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Methods Mol Biol*. 2006;318:111-7. doi: 10.1385/1-59259-959-1:111. PMID: 16673910.

Ramiro, D.A., J. Escoute, A.-S. Petitot, M. Nicole, M. P. Maluf and D. Fernandez (2009). Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. *Plant Pathology* 58:944-955.

Ștefan, A. L., Paica, A., Iacob, F., Iacomî, B. M. 2015. Sustainable use of fungicides and biocontrol agents for *Botrytis* gray mold management in grapes. *Scientific Papers. Series B, Horticulture, Volume LIX*, Print ISSN 2285-5653, 159-162.

6. CAPÍTULO 6.

6.1 Discusión general y conclusiones

El café es un cultivo de gran importancia en México, es uno de sus principales problemas fitosanitarios es la roya amarilla del cafeto causada por el parasito obligado (*Hemileia vastatrix*). La Roya es la enfermedad más destructiva del cafeto y la de mayor importancia económica a nivel mundial, debido a que provoca la reducción en la producción de este fruto. Sin embargo, el manejo químico tiene el inconveniente de su toxicidad y un impacto negativo del medio ambiente. Por este motivo, se hace necesario el desarrollo y evaluación de nuevas tecnologías para el control de la enfermedad de bajo impacto ambiental.

Por lo que el objetivo general de esta investigación fue evaluar diferentes bioestimulantes e inductores en el control de la roya (*Hemileia vastatrix*) en plantas de café provenientes vivero como plantas propagadas in vitro.

Existen investigaciones que emplean bioestimulantes e inductores para el control de la enfermedad de la roya, desarrollados a nivel de campo con resultados favorables, sin embargo, las condiciones a nivel campo no son controladas y no se asegura la sanidad de las plantas, por lo que en este proyecto se buscó establecer un estudio a partir de plantas sanas propagadas in vitro, las cuales se logró su aclimatación y desarrollo en invernadero. Estas plantas fueron empleadas para efectuar la inducción de resistencia con quitosano frente a la roya (*Hemileia vastatrix*) y se evaluó el daño de la enfermedad en presencia y ausencia de quitosano.

Para el establecimiento y propagación de plantas sanas de café se tomó como iniciativa la propagación de plantas a partir de semillas, ya que se contaba con suficiente material para su propagación. De acuerdo con los estudios anteriores se ha efectuado la comparación de la germinación de semillas cigóticas para la obtención de plántulas y la embriogénesis somática directa. En la germinación de semillas se ha observado que tarda hasta 4 meses en desarrollar una plántula completa con una buena adaptación en campo, sin embargo presenta un menor desarrollo y se tiene un menor número de plantas, comparada con la embriogénesis somática directa en el cual se obtienen mayor número de

plántulas de mejor calidad y se tiene una buena adaptación a condiciones ex vitro y un buen desarrollo, con el inconveniente de ser una técnica en la que se tarda más tiempo en obtener plantas adaptadas en invernadero, además de que se incrementan los costos y existe un mayor riesgo de contaminación por la manipulación que se tiene (Etienne *et al.*, 1997). En este estudio se realizó la comparación de la germinación de semillas cigóticas en diferentes sistemas convencionales y biotecnológicos. En las técnicas biotecnológicas se empleó el uso de biorreactores (SIT) tipo gemelos y resultó ser una técnica con mayor eficacia, al reducir los tiempos para obtener plantas con varias hojas verdaderas a los 40 días, la ventaja de esta estrategia es que se reduce la manipulación y los costos de producción al tener un desarrollo más rápido en el biorreactor. Para continuar con la optimización de la propagación de plantas a partir de semilla se sugiere efectuar estudios comparativos de la propagación in vitro empleando diferentes diseños (RITA) y capacidad de biorreactores, para eficientar el proceso y obtener mayor número de plantas con un mayor desarrollo, las cuales se podrían emplear como explantes para la propagación por microesqueje, para obtener plantas clonales con estabilidad genética. Además se podrían modificar los medios reportados en la actualidad (Etienne-Barry *et al.*, 1999; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002).

Por otro lado, es importante mencionar que en muchas ocasiones la adaptación de plantas in vitro a condiciones ex vitro puede dificultarse, si las plantas no tienen un buen desarrollo, actualmente existen diversas herramientas las cuales nos permiten optimizar el aprovechamiento de fertilizantes asociado al uso de compuestos y microorganismos considerados capaces de mejorar la absorción de nutrientes de las plantas y el crecimiento de los cultivos, especialmente bajo condiciones adversas del suelo, estos se conocen como metabolitos potenciadores y bioestimulantes (Miller, 1990). Tomando en consideración el beneficio que aportan los microorganismos para el desarrollo de plantas, se realizó un experimento con cepas aisladas del género *Trichoderma* de distintas localidades de la región cafetalera del estado de Chiapas para evaluar si presentaban un efecto bioestimulante en el desarrollo de vitroplantas de café en condiciones de invernadero.

Los efectos en el desarrollo de plantas obtenidas del proceso de aclimatación y reinoculadas con su cepa correspondiente fueron evaluadas a los 40 días los parámetros de crecimiento (longitud de la planta, número de hojas, peso fresco y peso seco tanto del área foliar como radicular). Los tratamientos T2 (LE39), T4 (LE47) y el T7(LE98) muestran un efecto positivo en los parámetros de desarrollo evaluados y presentan diferencias significativas comparado con el control y el testigo. Dichas cepas bioestimularon el desarrollo del sistema radicular como el sistema foliar en las plántulas de café, esto también se puede observar en otros estudios en el que los aislados de *Trichoderma* estimularon el desarrollo general de plantas de maíz, chícharo, tomate y lechuga en sustrato (Zheng, *et al.*, 2000; Clear, *et al.*, 2005, Rasool *et al.*, 2011; Ortuño *et al.*, 2013).

Tomando en cuenta las características microscópicas descritas por Sutton y colaboradores (1998), los *Trichodermas* aislados de la región de Chiapas las cuales se identificaron, con base a sus características morfológicas (colonial y microscópica), visualmente presentaron diferentes formas y coloraciones por las diferentes zonas en donde se recolectaron las muestras de suelo, por lo que podría asociarse a cepas de diferentes especies, esto se debe a la producción de metabolitos secundarios, ya que la producción de estos es un complejo asociado al desarrollo morfológico de cada cepa (Vinale *et al.*, 2009; Vessey, 2003).

La producción de reguladores del crecimiento de la planta por microorganismos es un mecanismo importante, muchas veces asociado a la estimulación durante el crecimiento (Sánchez *et al.*, 2005). Al mostrar estas cepas un efecto bioestimulante y de acuerdo a la revisión de literatura enfocada a la protección que ha sido descrita en diferentes especies del género *Trichoderma* asociado a la inducción de defensa vegetal (Nawrocka y Malolepsza,2013) como Resistencia Sistémica Inducida (ISR) y en otras ocasiones se considera como Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), se podrían considerar algunas pruebas para evaluar estas cepas como posibles inductores de resistencia y así mitigar los daños causados por la infección de roya en el cultivo de café.

Otro tema importante a considerar en estudios futuros, es el incremento del inóculo de la roya, al ser es un parásito obligado que afecta las especies de género *Coffea* siendo *C. arabica* la más atacada (Panstruga 2003; Avelino y Rivas, 2013). La única manera de mantener preservada la roya y con buena viabilidad, es mediante plantas infectadas, pero existen ciertas condiciones para que se lleve a cabo esta infección de forma natural ya que las uredinosporas de roya se ve altamente afectadas por las condiciones de temperatura, luz y humedad (Santacreo R., et. al. 1983), por lo que fue necesario tomar rangos distintos y combinaciones de las condiciones descritas en estudios realizados anteriores, para mantener el inóculo de la roya. Por lo que en este estudio se evaluó durante 40 días la estrategias de infección de roya en plántulas de invernadero, bajo diferentes condiciones, en donde se pueden observar que el rango óptimo en el que se observan los síntomas relacionados con la infección de la roya ocurre entre el día 22 al día 40 después de la infección.

Las hojas evaluadas en los diferentes tratamientos muestra como las hojas intermedias, la humedad relativa alta, luz y temperaturas favorece la infección del hongo provocando lesiones en diferentes puntos de las hojas como el caso del tratamiento H2 y H3 en donde el hongo presenta un daño de un 45 % y 20% respectivamente de acuerdo a la escala de severidad ubicando a estos dos tratamientos en el nivel 5 y 4 de este rango. Debido a que la evaluación solamente se efectuó hasta los 40 días solamente se logró apreciar los primeros síntomas de la roya, por lo que se sugiere para estudios futuros extender el tiempo de evaluación entre 60 y 80 días para lograr observar la etapa reproductiva del hongo (esporulación), por otro lado se sugiere variar los tiempo de fotoperiodo simulando los días cortos, que es donde se presenta la roya en plantas de café, como se menciona en algunos estudios realizados para entender la infección causada por la roya, ya que mencionan que las temperaturas óptimas para que este proceso infectivo se lleve a cabo interaccionan con una alta humedad, temperaturas que van de los 18°C a los 27°C y periodos cortos de luz (Santacreo R., et. al., 1983).

Por otro lado, el quitosano inhibe el crecimiento y desarrollo de diferentes fitopatógenos, incluidos hongos, oomicetos y bacterias. Además, activa el sistema inmunológico de las plantas, otorgando protección contra un amplio espectro de patógenos (Beatrice *et al.*, 2017). La inducción de la respuesta de defensa se puede lograr mediante elicitores o inductores de defensa de las plantas, que modulan algunas respuestas en las plantas, y el quitosano está en este grupo. De aquí parte la idea de emplear el quitosano como un potencial compuesto para inducir resistencia a plantas para mitigar el ataque de la roya en etapas preventivas por lo que en el análisis utilizando el quitosano como un potencial inductor de respuesta se empleó una doble tinción con azul de tripano y lactofenol y Uvitex 2B al 0.01%, tinción descrita por (Nowiki *et al.*, 2012), así a través de la observación microscópica se monitoreo el comportamiento de la roya con y sin quitosano.

Una vez obtenidos los datos del comportamiento de la infección de la roya con quitosano (alto peso molecular a concentración 0.05% y 0.01%) y sin quitosano (agua destilada estéril) en hojas de café, de acuerdo a los muestreos día 1 (24 horas) de haber infectado la solución de uredinosporas de roya se puede observar que en todos los tratamientos y control el tejido se encuentran sanos (sin presencia de haustorios), debido a que la roya tarda 6 horas en iniciar la germinación y alrededor de 48 horas en iniciar la infección, por lo anterior no se observó infectada la hoja de la plántula del cafeto en el primer día (Oviedo *et al.*, 2016). Por lo que se realizó otro muestreo a los tres y seis días después de la infección, obteniendo algunos resultados interesantes en el último muestreo (día 6), en el tratamiento TEF1 se observa como el tejido está totalmente colonizado por el hongo y algunas hifas se encuentran penetrando los estomas por lo que en este periodo de tiempo el tejido foliar se mostró infectado por el hongo, formando haustorios que le permitieron desarrollar la enfermedad, para el caso TEF2 se observó la presencia de hifas, sin embargo, el tejido foliar se encuentra sano y no se ve la presencia de hifas penetrando el tejido. Para el tratamiento TEF3 el tejido foliar se observó sano, con la presencia de uredinosporas sin germinar y sin la presencia de hifas.

En cuanto a la observación microscópica se mostró que para el caso del control (PEF1), está iniciándose el proceso de infección de la roya, mientras que los tratamientos PEF2 Y PEF3, tratados con quitosano, no presentan síntomas de la enfermedad, lo interesante en estos últimos tratamientos con distintas concentraciones de quitosano muestran que para el tratamiento PEF2, con quitosano al 0.01%, pudiera estar ocurriendo alguna inducción de resistencia en la plántula del cafeto, que no le permite al hongo penetrar el tejido y solamente crecen las hifas sobre el tejido foliar, buscando penetrar por los estomas. En el tratamiento PEF3, en el que se empleó una concentración de quitosano al 0.05%, se observó el tejido sano y la presencia de esporas que no lograron germinar, por lo que esta concentración de quitosano pudiera estar causando alguna inhibición en la germinación de esporas de roya.

Con base a estos resultados obtenidos, se sugiere que para estudios futuros se considere incrementar el periodo de evaluación del proceso de infección de la roya en vitroplántulas en condiciones de invernadero y empleando la concentración de 0.01% de quitosano, con la finalidad de recabar datos del avance de la enfermedad de la roya durante varios días hasta que se presente la fase reproductiva del hongo, para tener un amplio panorama de la eficiencia del quitosano como inductor de defensa en cultivo de café.

Otro estudio pendiente a considerar, son los estudios a nivel bioquímico, como son las pruebas enzimáticas (Glucanasas, quitinasas y peroxidasas) para comprender más a fondo el efecto de quitosano en café, estos estudios podrían ayudar a comprender como se activan los mecanismos de defensa de la planta.

Tomando en consideración estos experimentos realizados y con base a la literatura, el quitosano de alto peso molecular podría ser una buena estrategia preventiva de la roya de café en campo, si las pruebas a nivel campo resultaran efectivas en la prevención de la roya, se podría considerar el quitosano como un producto que se aplique a nivel campo para mitigar los problemas causados por el hongo *Hemileia vastatrix*, para generar nuevas alternativas para la prevención de la roya y así reducir el uso de agroquímicos para dar al cultivo mayor valor agregado utilizando fuentes más amigables con el medio ambiente.

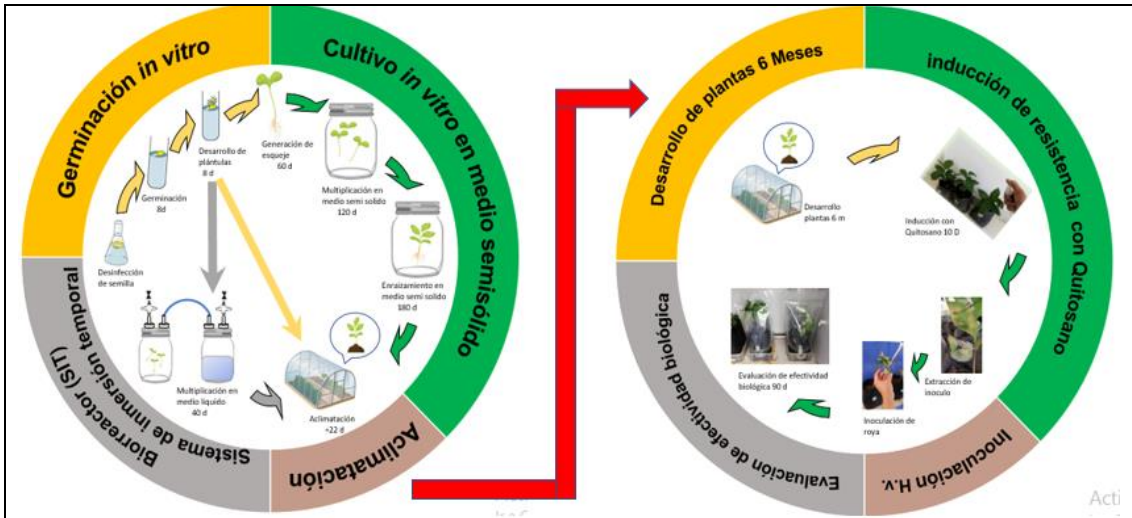


Figura 6.1 Propuesta de investigación de estudios de efectividad biológica para el control de la roya del café

6.1.1 Bibliografía

Avelino, J.; Rivas, G. 2013. La roya anaranjada del cafeto <http://hal.archives-ouvertes.fr/hal01071036>, 47 p.

Beatrice, C.; Linthorst, J.M.H.; Cinzia, F.; Luca, R. Enhancement of PR1 and PR5 gene expressions by chitosan treatment in kiwifruit plants inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Eur. J. Plant Pathol.* 2017, 148, 163–179.

Clear F, Valic N (2005). Effects of *Trichoderma* spp and *Gliocladium roseum* culture filtrates on seed germination of vegetables and maize. *J. Plant Dis. Prot.* 112(4): 343-350.

Etienne-Barry, D., Bertrand, B., Vasquez, N. et al. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. *Plant Cell Reports* 19, 111–117 (1999).

Miller RH, Soil microbiological inputs for sustainable agricultural systems, in *Sustainable Agricultural Systems*, ed. by Edwards CA, Lal R, Madden P, Miller RH and House G. Soil and Water Conservation Society, Ankeny, IA, pp. 614–623 (1990).

Nowicki M., Foolad M.R., Nowakowska M., Kozik E.U. 2012a. Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: An Unauthenticated | 217.96.28.119 Download Date | 5/24/13 11:30 AM M. NOWICKI et al. – A SIMPLE DUAL STAIN FOR DETAILED... 73 overview of pathology and resistance breeding. *Plant Disease* 96: 4-17. [DOI: 10.1094/PDIS-05-11-0458]

Panstruga, R. 2003. Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 320-326.

Quiroz-Figueroa, F. R., Fuentes-Cerda, C. F. J., Rojas-Herrera, R., and LoyolaVargas, V. M. (2002) Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep.* 20, 1141–1149.

Sánchez J, Valencia H, Valero N. Reducción de ácido indolacético por microorganismos solubilizadores de fosfatos presentes en la rizósfera de *Espeletia graniflora* y *Calamagrotis effuse* del Páramo El Granizo. En: Bonilla M,

Editor. Estrategias adaptativas de plantas del páramo y del bosque altoandino en la cordillera oriental de Colombia. Bogotá: Unibiblos. 2005; 177- 193 pp.

Santacreo, R., Polanco, E., y Oseguera, S., 1983. Periodo de incubación y generación de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. en tres zonas cafetaleras de Honduras, Centro América, in: VI Simposio Latinoamericano sobre Caficultura, IICA: Panamá, Panamá. p. 109-127.

Vessey JK. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*. 2003; 255:571-586.

Vinale F, Flematti G, Sivasithamparamb K, Lorito M, Marra R, et al. Harzianic Acid, an Antifungal and Plant Growth Promoting Metabolite from *Trichoderma Harzianum*. *J Nat Prod*. 2009; 72:2032-2035.

Zheng Z, Shetty K (2000). Enhancement of pea (*Pisum sativum*) seedling vigor and associated phenolic content by extraction of apple pomace fermented with *Trichoderma* spp. *Proc. Bioch*. 36: 79- 84.