

**Diversidad endomicorrícica en plantas de café (*Coffea arabica* L.)
infestadas con roya (*Hemileia vastatrix*)
Endomycorrhizal diversity in coffee plants (*Coffea arabica* L.) infected with
rust (*Hemileia vastatrix*)**

Sonia Herrera Monroy¹, Rogelio Castro Brindis², Jesús Pérez Moreno³ y Eduardo Valdés Velarde⁴

Palabras clave: *Coffea arabica* L.; *Hemileia vastatrix*; biodiversidad; comunidad; endomicorrizas
Keywords: *Coffea arabica* L.; *Hemileia vastatrix*; biodiversity; community; endomycorrhizal

Recepción: 16-08-2018 / Aceptación: 23-01-2019

Resumen

El café (*Coffea arabica* L.) es uno de los productos agrícolas más importantes en el mundo, ya que más de 56 países se dedican a su cultivo y es el principal *commodity* agrícola desde el periodo 1962-1989; y la roya anaranjada del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome) es la enfermedad más devastadora de este cultivo. En Centroamérica, las pérdidas causadas por este patógeno fueron de hasta el 50 % en el ciclo productivo 2011-2012. La producción de café en el estado de Veracruz decreció 8 % desde el 2011 debido a infestaciones por roya, en consecuencia se han realizado investigaciones sobre microorganismos benéficos que brinden tolerancia hacia el patógeno, cuya obtención y aplicación no represente riesgo de deterioro del recurso suelo. En este sentido, las endomicorrizas cumplen con dichos requisitos, sin embargo es necesario conocer la diversidad y condiciones de asociación con la especie agrícola de interés para que el manejo sea efectivo. Por ello el objetivo fue caracterizar poblaciones endomicorrícicas presentes en plantas de café (*Coffea arabica* L.) variedad Typica con y sin signos de infección por roya en Ixhuatlán del café, Veracruz. Se identificaron 37 especies que corresponden a 14 géneros de endomicorrizas, siendo los más comunes *Acaulospora* y *Rhizophagus*, este último es el más frecuente en plantas sin signos de infección por roya. También se encontró mayor porcentaje de colonización en raíz y densidad de esporas en plantas sin signos de infección (7.70 % y 661.68 esporas/100 g de suelo, respectivamente) pero el índice de diversidad de Shannon (*H*) y el de Simpson (*D*) no señalan que las poblaciones endomicorrícicas encontradas sean diversas. Estos resultados muestran que las plantas que interactúan en simbiosis con micorrizas son capaces de

¹ Universidad Autónoma Chapingo, Estudiante del Doctorado en Ciencias en Horticultura. Texcoco, México. E-mail: sonia.herrera.monroy3@gmail.com

² Universidad Autónoma Chapingo, Doctor en Ciencias en Fisiología Vegetal. Texcoco, México

³ Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco, México

⁴ Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México

tolerar mejor el estrés biótico y abiótico, además la prevalencia de ciertos géneros endomicorrícicos en plantas de café con características fisiológicas particulares da pauta para profundizar en el estudio de la simbiosis diferencial establecida entre plantas y microorganismos.

Abstract

Coffee (*Coffea arabica* L.) is one of the most important agricultural products in the world, since more than 56 countries are dedicated to its cultivation and it is the main agricultural commodity since the period 1962-1989 and coffee orange rust (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome) is the most devastating disease for this crop. In Central America, the losses caused by this pathogen were up to 50% in the 2011-2012 production cycle. Coffee production in the state of Veracruz decreased by 8% since 2011 due to rust infestations, consequently research has been carried out on beneficial microorganisms that provide tolerance to the pathogen, whose obtaining and application does not represent a risk of deterioration of the soil resource. Therefore, the endomycorrhizal meet these requirements, however it is necessary to know the diversity and conditions of association with the agricultural species of interest so that the management is effective. The objective was to characterize endomycorrhic populations present in coffee plants (*C. arabica* L.) Typica variety with and without signs of rust infection in Ixhuatlán del café, Veracruz. We identified 37 species that correspond to 14 genera of endomycorrhizal, being the most common *Acaulospora* and *Rhizophagus*, the latter being the most frequent in plants without signs of rust infection. A higher percentage of root colonization and spore density was also found in plants without signs of infection (7.70% and 661.68 spores / 100 g of soil, respectively) but the Shannon (H) diversity index and the Simpson (D) does not indicate that the endomycorrhizal populations found are diverse. These results show that the plants that interact in symbiosis with mycorrhiza are able to tolerate better the biotic and abiotic stress, besides the prevalence of certain endomycorrhizal genera in coffee plants with particular physiological characteristics gives a guideline to deepen the study of the established differential symbiosis between plants and microorganisms.

Introducción

El café (*Coffea arabica* L.) es uno de los productos agrícolas más importantes en el mundo, ya que más de 56 países se dedican a su cultivo y es el principal *commodity* agrícola desde las negociaciones llevadas a cabo por los principales países productores y consumidores en el periodo 1962-1989 (Talbot, 2011, 72). A pesar de ello la roya anaranjada (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome) causó pérdidas en la producción de este cultivo de hasta el 50 % en el ciclo 2011-2012, por lo que en la actualidad se considera la enfermedad más devastadora.

En México la producción de café (*Coffea arabica* L.) es de 1.8 millones de sacos al año, se cultiva en 15 estados, pero el 91.4 % del volumen y 93.3 % del valor se concentran en Chiapas, Veracruz, Puebla y Oaxaca; con un consumo per cápita de 1.3 Kg (FIRA, 2016). En el periodo 2002-2012 la producción de café verde decreció un 77.5 % (FAOSTAT, 2016), lo que obligó a cafecultores a implementar prácticas que reactivaran la producción. En el mismo periodo, se registró un descenso en la producción de café en grano del 8 % en el estado de Veracruz, pero logró solucionarse de forma parcial debido a programas gubernamentales que incentivaron la renovación de huertas y la poda para reducir sombreo (SAGARPA, 2013).

A pesar de esto, durante el periodo 2013-2015 la demanda de productos y bebidas derivadas de café no fue cubierta, dado que hubo un decremento de la producción del 32 %, la principal causa fue la infestación de roya (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome) y efectos del cambio climático (SAGARPA, 2013), lo que también provocó especulación y caída en los precios nacionales del producto (Imagen agropecuaria, 2017).

A raíz de la crisis cafetalera se iniciaron investigaciones con técnicas alternativas como la agrohomeopatía, cuyo principio protector radica en la aplicación de productos orgánicos patógenos en bajas concentraciones y dinamizados, las ventajas de esta técnica radican en su fácil obtención, bajo costo y eficacia en la prevención de plagas y enfermedades (Ruíz-Espinoza, 2011, 7), a pesar de esto, el tratamiento debe ser largo y constante. Otras tecnologías desarrolladas son el uso de microorganismos con efecto supresor de la roya anaranjada del cafeto (Jackson *et al.*, 2012, 89; Silva *et al.*, 2012, 62; Haddad *et al.*, 2014, 139) así como la implementación de inoculantes edáficos locales que permiten mantener el vigor de las plantas reduciendo de esta manera el riesgo de infestación pero con bajo impacto en el microbioma del suelo (Trejo-Aguilar, 2003, 25); es decir, que su aplicación no altera de manera significativa la composición de las poblaciones de microorganismos edáficos locales. Cabe resaltar que el

principal componente de estos inoculantes son las endomicorrizas cuyas propiedades, cuando forman asociaciones mutualistas con plantas, son el incremento en absorción de minerales (principalmente fósforo), así como tolerancia a patógenos y a estrés abiótico, mientras mejoran la calidad química y física del suelo (Rilling *et al.*, 2015, 1385) así como el crecimiento de las plantas (Dobo *et al.*, 2018, 526).

El perfeccionamiento de las tecnologías anteriormente mencionadas aún está en proceso y es necesario que las investigaciones relacionadas se centren en mostrar datos relevantes sobre las dinámicas de los macro y microorganismos involucrados (como las ocurridas entre microorganismos asociados a plantas enfermas vs. sanas), pues solo después de conocer los recursos biológicos y las inter-relaciones a profundidad, se podrá hacer un uso adecuado de ellos sin tener un impacto ecológico negativo. Con la intención de contribuir al desarrollo de este campo de estudio, se llevó a cabo una investigación en Ixhuatlán del café, Veracruz, cuyo objetivo fue caracterizar las poblaciones endomicorrícicas asociadas a plantas de café criollo (*C. arabica* L. var. *Typica*), con y sin signos de infección con roya (*H. vastatrix*).

Materiales y Método

Área de estudio

El estudio se situó en Ixhuatlán del café, Veracruz de Ignacio de la Llave en tres parcelas con características edáficas y de plantación similares (sombreo de vegetación natural, edad del huerto 4 años y con variedad *Typica*), identificadas como 1, 2 y 3 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Ubicación de las parcelas muestreadas en este estudio

Parcela	Ubicación	Altitud (msnm)
1	19° 03' 11.72" N 96° 55' 1.6 " O	1 220
2	19° 05' 00" N 96° 54' 13.6" O	1 204
3	19° 03' 42.3" N 96° 55' 56.4" O	1 225

La selección del área de estudio se basó en la representatividad de las condiciones edafoclimáticas de la zona cafetalera de altura en Veracruz, donde el clima predominante es templado húmedo con lluvias todo el año, acentuadas en verano y temperaturas anuales de 16 a

22 °C (INEGI, 2015). La mayor proporción de suelos son cambisoles y andosoles vérticos (INEGI, 2015), cuya característica en común es la susceptibilidad a la erosión.

Muestreo de suelo

El muestreo se llevó a cabo en una superficie de 100 m² por parcela, siguiendo las recomendaciones de Trejo-Aguilar *et al.* (2008, 17); es decir, se seleccionaron áreas de interés con relieve y tipo de suelo visualmente homogéneo, después se marcaron al azar 20 plantas de café criollo (*C. arabica* L. var. *Typica*) por área: 10 sin signos de infección por roya y 10 con síntomas severos de ésta; el objetivo de seleccionar de esta manera las plantas fue describir y comparar la diversidad de endomicorrizas presentes en cada tipo.

De cada planta se obtuvo una muestra de suelo compuesta por tres submuestras tomadas a 15 cm de distancia radial del tronco y a 15 cm de profundidad, en dirección norte, sur-este y suroeste, teniendo como eje al tronco de la planta. El muestreo se diseñó de esa forma pues el mayor número de raíces absorbentes y que forman asociación con micorrizas se localizan entre 15 cm y 30 cm de distancia del tronco (Bolaños-B. *et al.*, 2000, 247).

Las submuestras se mezclaron y homogenizaron por cuarteo hasta obtener aproximadamente 2 Kg de suelo y 80 a 100 g de raíces por muestra. Los 2 Kg de suelo se dividieron para su análisis en tres partes; 500 g donde se realizó la caracterización fisicoquímica, 100 g para la identificación y conteo preliminar de esporas endomicorrícicas, los 1.4 Kg restantes se usaron para la multiplicación de esporas e identificación de géneros no detectados en el primer conteo. Por último, en las muestras de raíces se determinó el porcentaje de colonización de endomicorrizas.

Caracterización fisicoquímica del suelo

Las características físicas determinadas en los suelos fueron: profundidad efectiva determinada excavando cinco pozos, en áreas al azar de cada parcela hasta encontrar material que obstruyera el desarrollo de las raíces (roca dura, cascajo o tepetate), Color (determinado en seco y húmedo mediante el Sistema de Notación Munsell), Textura (método del hidrómetro de Bouyoucos) y Densidad aparente (Dap.) por el método de probeta (Klute, 1986, 365).

Las características químicas evaluadas fueron: pH relación 1:2 mediante el potenciómetro con electrodo de vidrio (Litelier, 1967, 35-37), conductividad eléctrica (C.E.) en extracto de

saturación usando potenciómetro (Richars, 1962, 13), nitrógeno total (N) mediante destilación por arrastre de vapor Kjendahl modificado por Bremner, 1965 (Tavera, 1985, 15; Muñoz *et al.*, 2007, 59), fósforo extractable (P) determinado con el método Mehlich 1 (Muñoz *et al.*, 2007, 65; Etchevers, 2010, 25), cationes solubles (Ca^{++} y Mg^{++}) con el método volumétrico del versenato desarrollado por Cheng y Bray, 1951 (Muñoz *et al.*, 2007, 55), potasio (K^+) y sodio (Na^+) solubles determinados en el resto del extracto de suelo obtenido con el método volumétrico del versenato y leídos por el método de espectrofotómetro de flama, y finalmente elementos intercambiables (Ca^{++} , Mg^{++} y K^+) extraídos con acetato de amonio y determinados con espectrofotómetro de flama (Muñoz *et al.*, 2007, 53; Etchevers, 2010, 29).

Identificación de hongos endomicorrícicos arbusculares

La raíces muestreadas se sometieron a clareo-tinción con la técnica propuesta por Phillips y Hayman (1970, 159) modificada para raíces de café, este proceso consistió en lavar raicillas con hidróxido de potasio (KOH) al 10 % hasta que su color cambió de marrón a amarillo claro, posteriormente con ácido clorhídrico (HCl) al 10 % hasta observarlas blancas y finalmente teñidas con solución de azul de tripano al 0.05 % por 1 hora para hacer visibles las estructuras fúngicas o cuerpos colonizantes (vesículas, hifas y arbusculos).

Las raíces clareadas y teñidas fueron colocadas en cajas Petri con agua destilada para seleccionar aquellas cuyo diámetro fuera uniforme, posteriormente se cortaron en fragmentos de 1 cm y se seleccionaron 25 de estos al azar para después montarlos verticalmente en portaobjetos con una gota de glicerol. La preparación se rotulo y se observó al microscopio óptico a 40X para contar las estructuras fúngicas presentes. Dicha observación se efectuó mediante cuatro pasajes equidistantes de lente del microscopio o intersecciones por laminilla y contando cada estructura encontrada del endófito (vesícula, hifa o arbusculo).

El porcentaje de colonización se obtuvo al sustituir los datos obtenidos del conteo de estructuras en la siguiente formula:

$$\% \text{ de colonización} = \frac{\text{No. de observaciones con endófito}}{\text{No. total de intersecciones observados}} \times 100$$

Los resultados se transformaron con la formula $(\% \text{ de colonización} + 0.5)^{0.5}$ para cumplir con los supuestos de normalidad (Alves *et al.*, 2010, 678).

Por otro lado la identificación y conteo de esporas de endomicorizas se realizó en 100 g de suelo donde se extrajeron esporas mediante tamizado húmedo y flotación en sacarosa (Trejo-Aguilar *et al.*, 2008, 27). Las esporas obtenidas se colocaron en cajas Petri con agua destilada para observarlas y seleccionar aquellas que no presentaran daño mecánico, posteriormente se clasificaron por tamaño y color, se fijaron de 10 a 15 de cada clase encontrada en portaobjetos con reactivo Mezler y se observaron en el microscopio a un aumento de 40X para realizar mediciones e identificación morfológica con base en las descripciones de la página web del International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mychorrizal Fungi (Wheeler, 2017).

Determinaciones de diversidad

En cada muestra de suelo original de los cafetales se estimó la densidad de esporas, expresada por el número de estas células sexuales encontradas en 100 g de suelo seco. Este resultado se transformó aplicando la fórmula $\log x + 1$ para cumplir con los supuestos de normalidad, según lo recomendado por Menezes *et al.* (2016, 58).

La distribución y diversidad de especies se expresaron por índices de frecuencia de aislamiento (% IF = (No. de muestras en las que se aisló una especie determinada / No. total de muestras) x 100), abundancia relativa (RA = (No. de esporas de la especie i / No. total de esporas) x 100), valor de importancia (IV = IF + RA), índice de diversidad de Shannon-Weiner (H) y el índice de diversidad Simpson (D) estimados con las siguientes fórmulas:

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

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

Donde:

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

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

N : Número total de individuos.

Análisis estadístico

Los datos transformados de densidad de esporas y porcentaje de colonización se procesaron con el software SAS® versión 9.0 (SAS Institute Inc. Campus Drive, Cary, North Caroline, USA)

mediante el procedimiento de Análisis de varianza (ANDEVA) y pruebas de comparación de medias Tukey ($p=0.05$). Los cálculos del índice de diversidad de Shannon-Weiner (H), índice de Simpson (D), frecuencia de aislamiento (IF) y abundancia relativa (RA), se calcularon de acuerdo con lo mencionado por Li *et al.* (2007, 657). El valor de importancia (IV) se empleó para evaluar la dominancia o rareza de las especies endomicorrícicas encontradas, donde valores iguales a 50% indican que la especie es dominante, mientras que valores $10\% < IV < 50\%$ indican especies comunes, e $IV \leq 10\%$ indican especies raras (Dobo *et al.*, 2018, 528).

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

Resultados y discusión

Propiedades fisicoquímicas del suelo

Las características físicas de los suelos muestreados corresponden con las de un suelo cambisol crómico vértico cuya tipología es la siguiente; suelos moderadamente profundos (menos de un metro pero más de 60 cm), color marrón oscuro (5YR 4/4), textura arcillosa-arenosa y densidad aparente (Dap.) de 0.84 g cm^{-3} .

En tanto las características químicas de los suelos se presentan en el Cuadro 2 e indican un pH neutro, sin efectos por salinidad según su conductividad eléctrica (C.E.). También son clasificados como ricos en nitrógeno total (N total), con baja disponibilidad de P y media en Ca^{++} , Mg^{++} y K^+ intercambiables.

Cuadro 2. Características químicas generales de los suelos muestreados

Parcela	pH	C.E. dSm⁻¹	N total (%)	P	*K ----- (ppm)	*Ca	*Mg	*Na	†Ca	†Mg	†K
									---- (meq g⁻¹⁰⁰) ---		
1	6.52	0.69	0.17	1.69	35.45	580	88.7	4.1	5.4	1.0	0.24
2	6.49	0.51	0.18	1.77	38.67	328	134.87	4.3	3.4	1.0	0.18
3	6.49	0.53	0.19	1.73	24.4	326	137.6	4.43	4	1.86	0.25

*Elementos solubles, determinados en pasta de saturación; †Elementos intercambiables

La profundidad y textura arcillosa-arenosa hacen a los suelos cambisoles susceptibles a la erosión, sobre todo si se elimina la cobertura vegetal o se cambia por monocultivos anuales, lo

que implica mayor gasto por fertilización e insumos. No obstante, para el uso actual que tienen, son adecuados para el desarrollo de organismos benéficos, sobre todo micorrizas, que requieren baja disponibilidad de fósforo (P) en el suelo.

La textura, Dap así como la baja disponibilidad de fósforo en suelo son condiciones deseadas para el establecimiento de simbiosis efectiva entre café-micorriza, pues la pobreza en contenido de fósforo provoca que las plantas secreten estrigolactones (hormona vegetal tipo carotenoide), que estimulan la ramificación y atracción de hifas micorrícicas durante el establecimiento de la simbiosis, sin embargo no se tiene evidencia de la afinidad de géneros particulares de micorrizas por algún exudado vegetal (Swamy *et al.*, 2016, 65), por otro lado la Dap, junto con la textura arenosa-arcillosa permiten un buen flujo de oxígeno hacia raíces y microorganismos del suelo (González-Chávez y Maldonado-Mendoza, 2009, 13).

Diversidad, colonización y densidad de endomicorrizas

Las especies micorrícicas encontradas tanto en plantas sanas como enfermas son similares, pero las densidades de cada una son distintas. En el Cuadro 3 se presenta el inventario de los géneros y especies encontrados en cafetos var. Typica, sanos y enfermos.

Cuadro 3. Géneros y especies de micorrizas (MA) aisladas de café (*C. arabica* L.) var. Typica en Ixhuatlán del café, Veracruz

Estatus de la planta donde se aisló	Género de MA aislado	Especies
Cr _S , Cr _E	<i>Acaulospora</i>	<i>Ac. foveata</i> , <i>Ac. scrobiculata</i> , <i>Ac. mellea</i> , <i>Ac. laevis</i> , <i>Ac. delicata</i> , <i>Ac. capsicula</i> , <i>Ac. spinosa</i> , <i>Ac. lacuosa</i> , <i>Ac. remhi</i> , <i>Ac. sp.</i>
Cr _S , Cr _E	<i>Ambispora</i>	<i>Am. leptoticha</i>
Cr _S , Cr _E	<i>Claroideoglomus</i>	<i>Cl. lamellosum</i> , <i>Cl. entunicatum</i> , <i>Cl. luteum</i> , <i>Cl. claroideum</i> , <i>Cl. sp</i>
Cr _E	<i>Dentiscutata</i>	<i>D. biornata</i>
Cr _S , Cr _E	<i>Diversispora</i>	<i>D. tortuosa</i> , sp1., sp2, sp3
Cr _E	<i>Entrophospora</i>	<i>En. infrequens</i>
Cr _E	<i>Funneliformis</i>	<i>Fu. mosseae</i> , <i>Fu. coronatum</i>
Cr _S , Cr _E	<i>Gigaspora</i>	<i>Gi. margarita</i> , <i>Gi. sp2</i>
Cr _S , Cr _E	<i>Glomus</i>	<i>Gl. sp1</i>
Cr _S	<i>Paraglomus</i>	<i>Pa. sp1</i>
Cr _S , Cr _E	<i>Racocetra</i>	<i>Ra. verruculosa</i>
Cr _S , Cr _E	<i>Rhizophagus</i>	<i>Rh. fasciculatus</i> , <i>Rh. manihotis</i> , <i>Rh. irregularis</i> , <i>Rh. intraradices</i> , <i>Rh. clarus</i> , <i>Rh. Sp.</i>
Cr _S , Cr _E	<i>Septoglomus</i>	<i>Se. deserticola</i>
Cr _S , Cr _E	<i>Sclerocystis</i>	<i>Sc. sinuosum</i>

Cr_S: planta sin síntomas, Cr_E: planta con síntomas

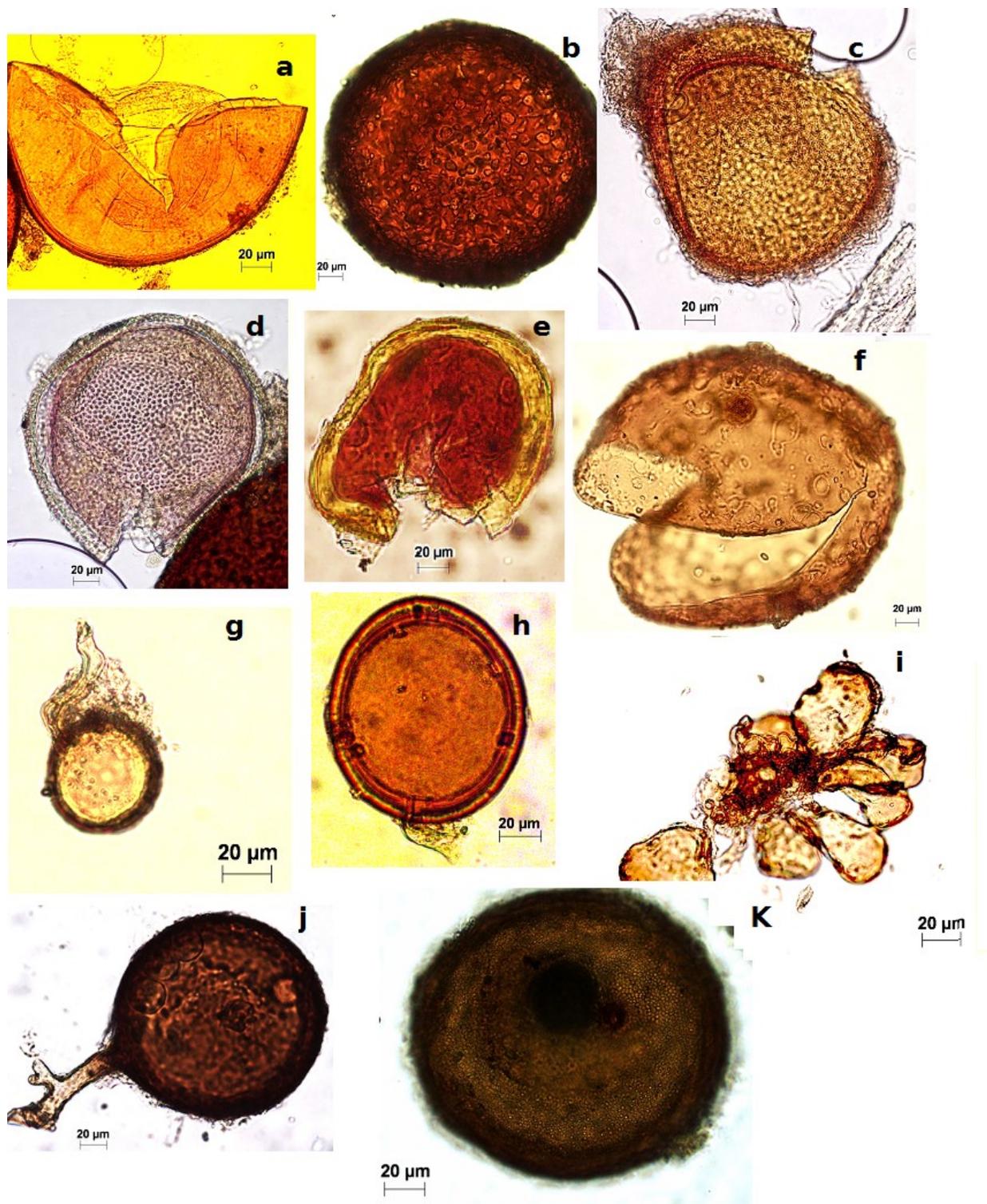


Figura 1. Especies de MA identificadas en cafetos (*C. arabica* L.) var. Typica. **a)** *Acaulospora laevis*; **b)** *Ac. foveata*; **c)** *Diversispora tortuosa*; **d)** *Ac. scrobiculata*; **e)** *Ac. mellea*; **f)** *Acaulospora* sp.; **g)** *Claroideoglomus claroideum*; **h)** *Paraglomus* sp.; **i)** *Sclerocystis sinuosum*; **j)** *Rhizophagus* sp.; **k)** *Entrophospora infrecuens*. Observadas a 40X

Respecto a la diversidad, los cálculos de índices *H* y *D* muestran que las poblaciones de endomicorrizas presentes en plantas de café var. *Typica*, no son diversas, además no existe diferencia significativa ($p= 0.05$) entre plantas con y sin signos de infección. Pese a ello, la densidad de esporas y el porcentaje de colonización de raíz fueron superiores en plantas sin síntomas: 186.26 esporas/100 g superior en plantas sanas y un 1.31 mayor en la colonización (Cuadro 4).

Cuadro 4. Colonización y diversidad de esporas en plantas de café (*C. arabica* L.) var. *Typica*

Tratamiento	No. de especies	Densidad de esporas (Esporas/100 g de suelo)	Densidad de esporas transformado	Colonización (% transformado)	Índice de Shannon-Weiner (<i>H</i>)	Índice de Simpson (<i>D</i>)
Cr _S	21.75 a [†]	661.68	3.83 a	7.70 a	2.29 a	0.117 a
Cr _E	22.75 a	475.42	3.65 b	6.39 b	2.64 a	0.089 a
DMSH	11.04	-	0.14	0.73	1.255	0.060

Cr_S: Planta sin síntomas, **Cr_E**: Planta con síntomas. [†] Grupos con la misma letra dentro de la misma columna no representan diferencia significativa ($p=0.05$) **DMSH**: Diferencia mínima significativa honesta. Test de comparación de medias Tukey

El menor porcentaje de colonización en plantas con síntomas se debe a los cambios bioquímicos que ocurren en plantas infestadas. Pues cuando el proceso de infección inicia, la abundancia de enzimas hidrolasas de azúcares y carbohidratos disminuye, alterando el flujo de nutrimentos hacia la raíz, posterior a la infección se activan proteínas relacionadas con la defensa de la planta impidiendo la entrada de otros hongos fitopatógenos y también la asociación con endomicorrizas (Talhinhas *et al.* 2017, 4).

Los cambios bioquímicos ocurridos en una planta después de la simbiosis tienen como consecuencia una modificación de la estructura del órgano infectado, así como de la planta en general (Camarena-Gutierrez, 2012, 411), en esta investigación se observó un arreglo diferencial entre las raíces de plantas micorrizadas con consorcios provenientes de plantas de café con roya en comparación de las raíces de plantas inoculadas con muestras de suelo de plantas no infectadas (Figura 2).

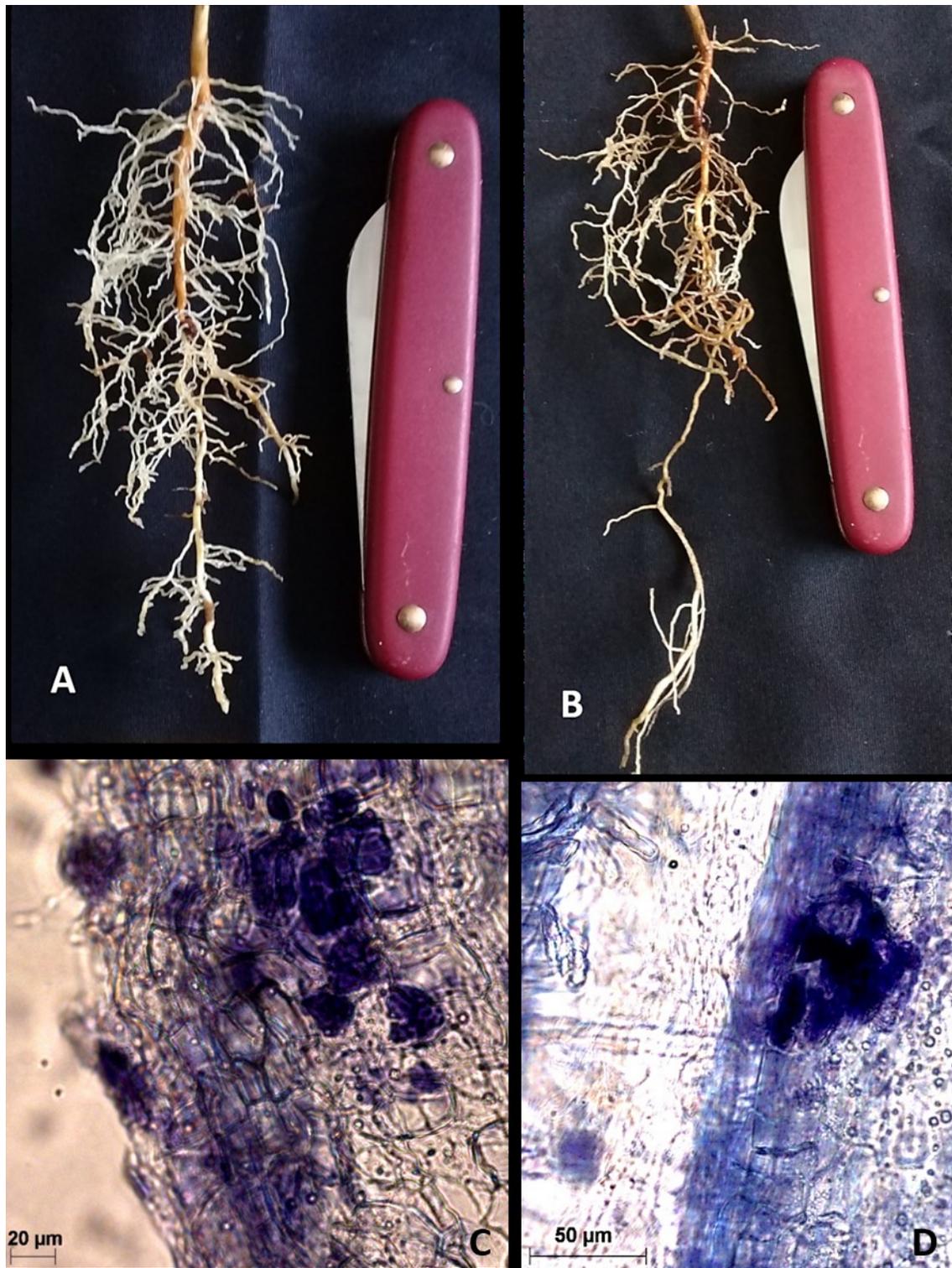


Figura 2. **A)** Estructura de raíz de planta de café (*C. arabica* L.) var. Typica inoculada con consorcios provenientes de plantas sin síntomas de roya (Cr_S) y **B)** Raíz de planta de café inoculada con consorcios provenientes de plantas con síntomas (Cr_E). **C)** y **D)** Vesículas observadas en raíces clareadas y teñidas de plantas inoculadas

La presencia de agentes patógenos genera cambios fisiológicos en la raíz de la planta infectada, que liberará sustancias como el ácido málico, azúcares y aminoácidos involucrados en la atracción y reconocimiento de microorganismos (Somers *et al.* 2004, 210). Éstos compuestos son reconocidos por plantas vecinas quienes activan mecanismos de protección iniciados con la secreción y acumulación de apocarotenoides, flavonoides, fenoles, especies reactivas de oxígeno y fitohormonas de defensa, todos estos activan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés) (Bora y Lokhandwala, 2016, 10) y permiten la asociación con micorrizas u otros microorganismos benéficos, evitando de este modo la infección con patógenos. Lo anterior explica el mayor porcentaje de colonización encontrado en plantas sin síntomas de infección.

Índice de frecuencia (IF), abundancia relativa (RA) y especies comunes de endomicorrizas

Al calcular la abundancia relativa, índice de frecuencia y valor, se puede observar que los géneros *Acaulospora* y *Rhizophagus* son predominantes (Cuadro 5 y Figura 3). Estos resultados concuerdan con lo reportado anteriormente para cafetos en Venezuela, Colombia, Brasil y México (Riess & Sanvito, 1985, 60; Cruz, 1989, 58; Andrade *et al.*, 2009, 106; Arias *et al.*, 2011, 179). En esos países durante el período de la década de los 60 y hasta los 80, la principal especie cultivada de café fue la *arabica*, este factor junto con el auge de la fertilización química a base de nitrógeno y potasio pudo influir en la predominancia de dichos géneros micorrícicos (Andrade *et al.*, 2009, 107).

Cuadro 5. Número absoluto de esporas, índice de frecuencia (%IF), abundancia relativa (% RA) e índice de valor de especies endomicorrícicas presentes en huerta de café (*C. arabica* L.) var. *Typica*

Especie	No. absoluto de esporas	Arquetipo donde se aisló	IF (%)	RA (%)	IV (%)	Estatus dominancia o rareza¹
<i>Acaulospora</i>	651	Cr _S , Cr _E	100	32.78	66.39	DOM
<i>Ambispora</i>	40	Cr _S , Cr _E	40	2.01	21.01	COM
<i>Clareideoglossum</i>	159	Cr _S , Cr _E	80	8.01	44.00	COM
<i>Diversispora</i>	115	Cr _S , Cr _E	70	5.79	37.90	COM
<i>Denticustata</i>	10	Cr _E	10	0.50	5.25	RARA
<i>Entrophospora</i>	11	Cr _E	10	0.55	5.28	RARA
<i>Funneliformis</i>	13	Cr _E	20	0.65	10.33	COM
<i>Gigaspora</i>	20	Cr _S , Cr _E	50	1.01	25.50	COM
<i>Glomus</i>	109	Cr _S , Cr _E	60	5.49	32.74	COM
<i>Paraglomus</i>	28	Cr _S	10	1.41	5.70	RARA
<i>Racocetra</i>	78	Cr _S , Cr _E	80	3.93	41.96	COM
<i>Rhizophagus</i>	620	Cr _S , Cr _E	100	31.22	65.61	DOM
<i>Sclerocystis</i>	19	Cr _S , Cr _E	70	0.96	35.48	COM
<i>Septoglossum</i>	113	Cr _S , Cr _E	60	5.69	32.84	COM

Cr_S: Planta sin síntomas, Cr_E: Planta con síntomas. ¹En base a Dobo *et al.*, 2018; **DOM**: Dominante; **COM**: Común

En México las condiciones ambientales, las variedades, edades de cafetos y algunas prácticas agrícolas realizadas en las huertas (como aplicación de fungicidas, eliminación de especies sombra y laboreo) influyen en la abundancia y composición de consorcios micorrícicos nativos, lo cual también modifica su dinámica y función trófica (Arias *et al.*, 2001, 190). Para el caso de las parcelas muestreadas, son comunes las aplicaciones de fungicidas cuyo ingrediente activo principal es el cobre, este elemento afecta diferencialmente a las especies micorrícicas, siendo benéfico hasta ciertas concentraciones para el establecimiento de los géneros *Rhizophagus* y *Acaulospora* (Aleksandrowicz-Trzcinska *et al.*, 2017, 691; Gildon y Tinker, 1983, 263), esta podría ser otra razón por la que ambos géneros sean más abundantes en las huertas muestreadas.

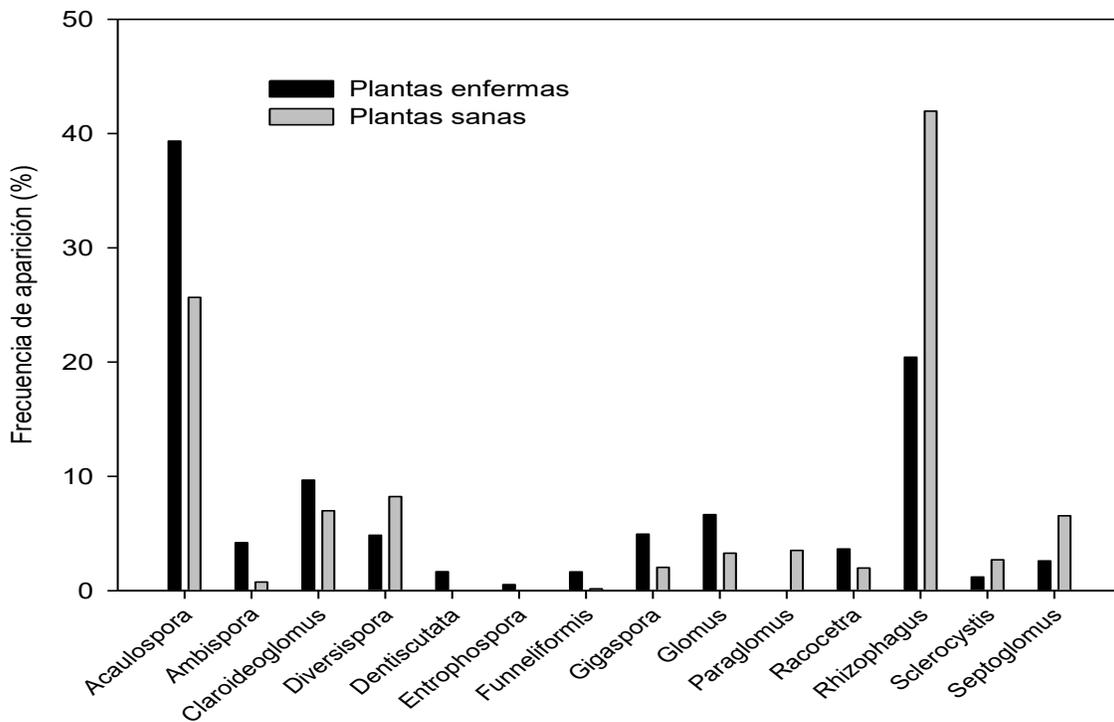


Figura 3. Géneros de endomicorrizas presentes en huerta de café (*C. arabica* L.) var. Typica y su frecuencia de aparición

La dinámica y función de las endomicorrizas depende en gran medida de los elementos químicos disponibles en el suelo, por ejemplo altas concentraciones de fósforo se ha correlacionado con la disminución del establecimiento y efectividad simbiótica (Swamy *et al.*, 2016, 59). A su vez, altas concentraciones de nitrógeno en suelo o cultivos asociados con leguminosas favorecen la presencia de poblaciones de *Acaulosporas* (Muleta *et al.*, 2007, 147), no obstante, este género también se ha relacionado con el incremento en la conductancia estomática y tasa de

transpiración (Augé, 2004, 373) lo que mejora la eficiencia de las plantas para el aprovechamiento de agua en condiciones de sequía, pero también incrementa la posibilidad de infección por patógenos vía estomática.

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

En el gráfico del análisis jerárquico de conglomerados que muestra la relación entre las frecuencias de las endomicorrizas obtenidas, se puede observar que los géneros predominantes se unieron en dos grupos (Figura 4): el grupo *a*, formado por 1 (*Acaulospora* presente en planta con signos de infección con roya) y 14 (*Rhizophagus* asociado con plantas sin signos de infección), este conjunto muestra la mayor frecuencia de aparición del género endomicorrícico correspondiente y grupo *b* formado entre 2 (*Acaulospora* en plantas con signos de infección) y 13 (*Rhizophagus* con plantas sin signos de infección), éste último representa las menores frecuencias de aparición en cada género especificado.

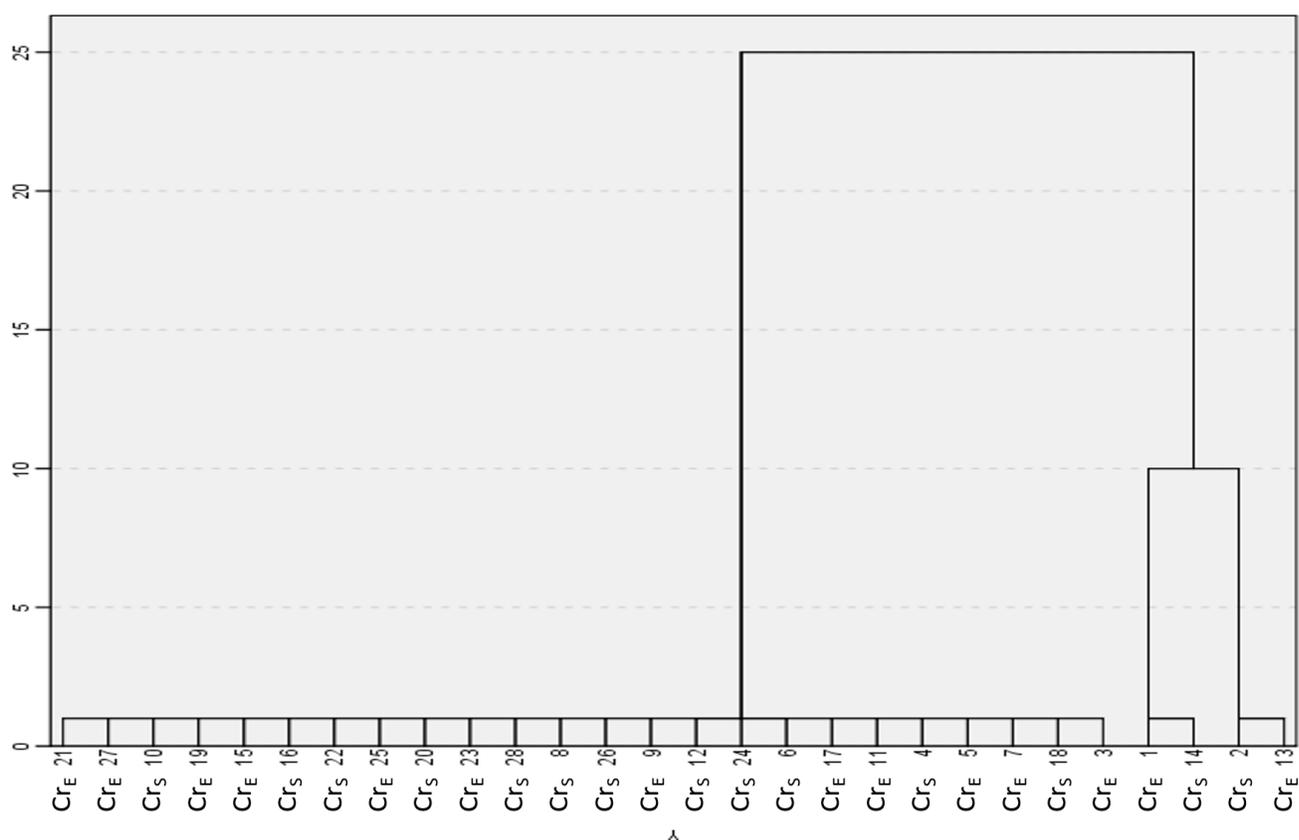


Figura 4. Dendrograma de análisis jerárquico de clústeres basado en la similitud de frecuencias entre los géneros de endomicorrizas identificados en plantas de café var. *Typica* con síntomas de infección por roya (Cr_S) y sin síntomas (Cr_E), donde 1 y 2 son *Acaulospora* con mayor y menor frecuencia respectivamente; 13 y 14 son *Rhizophagus* con menor y mayor frecuencia, respectivamente

Este comportamiento también puede deberse a las diferencias de calidad y cantidad de compuestos que liberan las plantas colonizadas con cierto género de endomicorrizas, los que afectan las poblaciones microbianas del suelo, así como la susceptibilidad del hospedante al ataque de patógenos específicos. Por ejemplo la inoculación con *Rhizophagus* en melón, tomate y banano mostró brindar resistencia a patógenos como *Colletotrichum*, *Alternaria* y *Patrylenchus* (Lee *et al.*, 2005, 237; Elsen *et al.*, 2008, 251), sin embargo, este mismo género micorrícico manifestó tener afinidad por colonizar raíces de durazno infestadas con *Meloidogyne incognita* (del Mar Alguacil *et al.* 2011, 8659).

Conclusiones

En esta investigación se caracterizaron a nivel morfológico las especies endomicorrícicas asociadas con cafetos (*C. arabica* L.) de la variedad Typica que presentaban signos de infección con roya (*H. vastatrix*), así como en las que éstos no eran visibles. Se encontró que los géneros *Rhizophagus* y *Acaulospora* predominan en la composición de los consorcios, siendo éste primero el más frecuente en plantas de café sanas.

Los índices de diversidad determinados (*H* y *D*) indican que las poblaciones endomicorrícicas no son diversas; sin embargo el porcentaje de colonización y densidad de esporas fue mayor en muestras provenientes de plantas sin signos de infección por roya. Estos resultados refuerzan el supuesto de que aquellas plantas que interaccionan en simbiosis con otros organismos son capaces de tolerar mejor el estrés biótico y abiótico. La prevalencia de géneros endomicorrícicos específicos en plantas de café con características fisiológicas particulares da pauta para profundizar, desde los fundamentos bioquímicos y genéticos, en el estudio de la simbiosis diferencial establecida entre plantas y microorganismos.

Referencias

- Aleksandrowicz-Trzcinska M., Szaniawski A., Studnicki M., Bederska-Błaszczuk M., & Urban A. (2017). The effect of silver and copper nanoparticles on the condition of English oak (*Quercus robur* L.) seedlings in a container nursery experiment. *Forests*, 8(9), 310. <https://doi.org/10.3390/f8090310>.
- Alves L., Oliveira V. L., Filho N. S., Federal U., & Catarina D. S. (2010). Utilization of rocks and ectomycorrhizal fungi to promote growth of eucalypt. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil., 1: 676–684.
- Andrade, S. A. L., Mazzafera, P., Schiavinato, M. A., & Silveira, A. P. D. (2009). Arbuscular mycorrhizal association in coffee. *Journal of Agricultural Science*, 147(2), 105–115. <https://doi.org/10.1017/S0021859608008344>
- Camarena-Gutierrez, G. (2012). Interaccion planta-hongos micorrizicos arbusculares. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 18(3), 409–421. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2011.11.093>
- Gildon, A. y Tinker, P. B. (1983). Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infections and heavy metals in plants. *New Phytologist*.

- INEGI. (2009). Prontuario de Información Geográfica Municipal Ihuatlán del Café, Veracruz de Ignacio de la Llave. México: INEGI.
- Talhinhas, P., Batista, D., Diniz, I., Vieira, A., Silva, D. N., Loureiro, A., ... Silva, M. do C. (2017). The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology*, 18(8), 1039–1051. <https://doi.org/10.1111/mpp.12512>
- Arias R., Heredia-Abarca G., Sosa V., Fuentes-Ramírez L. (2011). Diversity and abundance of arbuscular mycorrhizal fungi spores under different coffee production systems and in a tropical montane cloud forest patch in Veracruz, Mexico. *Agroforest System*. 85 (1): 179-193.
- Augé R. M. (2004). Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations. *Canadian Journal of Soil Science*. 84: 373–381.
- Bolaños-B. M., Rivillas-Osorio A., Suárez-Vásquez S. (2000). Identificación de micorrizas arbusculares en suelos de la zona cafetalera colombiana. *Cenicafé*. 51(4): 245-262.
- Bora M. y Lokhandwala A. (2016). Mycorrhizal Association: A safeguard for plant pathogen in Hashem, Abeer *et al.* (2016). “The interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and endophytic bacteria enhances plant growth of acacia gerrardii under salt stress.” *Frontiers in Microbiology* 7: 1–15.
- Camarena-Gutierrez G. (2012). Interacción planta-hongos micorrizicos arbusculares. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 18(3), 409–421. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2011.11.093>
- Cruz S. J. (1989). Estudio de la simbiosis micorrícica vesicular arbuscular en el cultivo de *Coffea arabica* var. Caturra. *Fitopatología Colombiana* 13, 56–64.
- Dobo B., Fassil A., Zebene A. (2018). Effect of tree-tinset-coffee based agro-forestry Practices on arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) species diversity and spore density. *Agroforestry Systems*. 92(2): 525–540.
- Del Mar Alguacil M., Torrecillas E., Lozano Z., Roldán A. (2011). Evidence of differences between the communities of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing galls and roots of *Prunus persica* infected by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(24): 8656–8661.

- Etchevers J. D. (2010). Interpretación de los análisis químicos de suelo. Centro de Edafología, Colegio de Postgraduados. México.
- Elsen A., Gervacio, D., Swennen, R., De Waele, D. (2008). AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa* sp.: a systemic effect. *Mycorrhiza* 18:251–256.
- FAOSTAT. (octubre, 2016). La producción de café en México: periodo 2002-2012. Recuperado de: <http://biblioteca.catie.ac.cr/royadelcafé/descargas/ROYA-MA.pdf>.
- FIRA. (octubre, 2016). Panorama Agroalimentario: Café 2016. Dirección de Investigación y Evaluación Económica Sectorial. Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200636/Panorama_Agroalimentario_Caf_2016.pdf
- Gildon, A. y Tinker, P. B. (1983). Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infections and heavy metals in plants. *New Phytologist*.
- Gonzalez-Chavez M.C. y Maldonado-Mendoza I.E. 2009. Manual básico para el cultivo de las micorrizas arbusculares, obtención de cultivos monospóricos y monoxénicos. *Instituto Politencino Nacional*. México. 43 p.
- Haddad F., Saravia R. M., Mizubuti S. G., Romeiro R. S., Maffia L. A. (2014). Insolation and selection of *Hemileia vastatrix* antagonist. *European Journal Plant Pathol*. 139: 763-772.
- Imagen Agropecuaria. (23, mayo, 2017). Estiman caída real del 40% en precio del café en México para ciclo 2017-18. Recuperado de <http://imagenagropecuaria.com/2017/estiman-caida-real-del-40-en-precio-del-cafe-en-mexico-ciclo-2017-18/>.
- INEGI. (2015). Información geográfica y edafoclimática municipal: Ixhuatlán del Café, Veracruz de Ignacio de la Llave. México: INEGI.
- Jackson D., Skillman J., Vandermeer J. (2012). Indirect biological control of the coffee leaf rust, *Hemelia vastatrix*, by the entomogenous fungus *Lecanillium lecanii* a complex coffee agroecosystem. *Biological Control*. 61: 89-97.
- Klute A. (1986). Methods of soil analysis. Part 1-Physical and mineralogical methods. *American Society of Agronomy -Soil Science Society of America*. Madison, WI.
- Lee C. S, Lee Y. J., Jeun Y. C. (2005). Observations of infection structures on the leaves of cucumber plants pre-treated with arbuscular mycorrhiza *Glomus intraradices* after challenge inoculation with *Colletotrichum orbiculare*. *Plant Pathol* 21:237–243.

- Li Ling-fei, Tao Li, Zhi-wei Zhao. (2007). Differences of arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community between a cultivated land, an old field, and a never-cultivated field in a hot and arid ecosystem of southwest china. *Mycorrhiza*. 17: 655–65.
- Litelier A. E. (1967). Manual de fertilizantes para Chile. Banco del Estado, Santiago, Chile. 200 p.
- Muleta D., Assefa F., Nemomissa S. & Granhall U. (2007). Composition of coffee shade tree species and density of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) spores in Bonga natural coffee forest, southwestern Ethiopia. *Forest Ecology and Management* 241, 145–154.
- Muñoz I. D., Mendoza C. A., López G. F., Soler A. A., Hernández M. M. (2007). Edafología manual de métodos de análisis de suelo. *Universidad Nacional Autónoma de México*. 82 p.
- Menezes M. S., Silva D. K. A., Queiroz M. A. A., Félix W. P., Yano-Melo A. M. (5, febrero, 2016). Agriculture, ecosystems and environment arbuscular mycorrhizal fungal communities in buffelgrass pasture under intercropping and shading systems in brazilian semiarid conditions. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 230, 55–67. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.05.024>.
- Phillips J. M. & Hayman D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment to infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Richars L. A. (1962). Diagnóstico y rehabilitación de suelos sódicos. Traducido al español por N. Sánchez. *Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas*. 20 p.
- Riess S. & Sanvito A. (1985). Investigations on vesicular-arbuscular mycorrhizae in different conditions of coffee cultivations in Mexico. *Micologia Italiana* 14, 57–62.
- Riling, M., Aguilar-Trigueros, Carlos A., Bergmann, J., Verbruggen, E., Veresoglou, S. D., Lehmann, A. (2015). Plant root an mycorrhizal fungal traits for understanding soil aggregation. *New Phytologist*. 205: 1385-1388.
- Ruíz-Espinoza F. (23 mayo 2011). Agrohomeopatía conocimiento científico para la conservación de la vida. Centro regional Universitario del Anáhuac. Recuperado de <http://www.cenacafe.org.mx/assets/drfelipe2.pdf>.

- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, MX). (2, enero, 2013). Impactos Café. Recuperado de: <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Documents/Cultivos%20Agroindustriales/Impactos%20Caf%C3%A9.pdf>.
- Silva H. S., Tozzi J. P., Terrasan C. R., Bettiol W. (2012). Endophytic microorganism from the coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. *Biological Control*. 63: 62-67.
- Somers E., Vanderleyden J., Srinivasan M. (2004). Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit. Microbiol.* 30(4): 205– 240.
- Swamy M.K., Akhtar M.S., Sinniah U.R. (2016). Root Exudates and their molecular interactions with rhizospheric microbes. In: Hakeem K., Akhtar M. (eds) *Plant, Soil and Microbes*. Springer. 438 p.
- Tavera S. G. (1985). Criterios para la interpretación y aprovechamiento de los reportes de laboratorio para las áreas de asistencia técnica. Publicación 3.
- Talbot, M. 2011. The coffee commodity chain in the world-economy: Arrighi's systemic cycles and Braudel's layers of analysis. *Revista American Sociological Association*. 17 (1): 58-88.
- Talhinhas P., Batista D., Diniz I., Vieira A., Silva D. N., Loureiro A., ... Silva M. do C. (2017). The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology*, 18(8), 1039–1051. <https://doi.org/10.1111/mpp.12512>
- Trejo-Aguilar D., Zulueta-Rodríguez R., Lara-Capistrán L. (2008). Manual de prácticas para el estudio de la simbiosis micorrizógena arbuscular. *Textos universitarios, Universidad Veracruzana*. 134 p.
- Trejo-Aguilar D. (2003). Efecto de la endomicorriza arbuscular sobre el desarrollo de nemátodos fitopatógenos en plántulas de café. Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México. 165 p.
- Wheeler B. (23, enero, 2017). International Culture Collection of (vesicular) arbuscular mycorrhizal fungi. Recuperado de <http://fungi.invam.wvu.edu/the-fungi/species-descriptions.html>.