



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**LA NATURALEZA DE LAS INTERACCIONES ENTRE LA  
ROYA DEL CAFETO Y  
SUS HONGOS HIPERPARÁSITOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)**

**P R E S E N T A :**

**GLORIA LUZ LAURA CARRIÓN VILLARNOVO**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. VICTOR RICO-GRAY**

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Para mis compañeros en el viaje de la vida**

**Alberto, David y Samuel**

**A mis padres (Gloria y Sergio)**

**A mis hermanas (Cecilia, Teresa y Rosa)**

*Cada día cual gotas de agua volvemos a fundirnos en el océano de la energía universal...  
Cada día muchas gotas salen del océano para experimentar la individualidad*

## AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a todas las instituciones y personas que me han brindado su ayuda en el desarrollo y conclusión de este trabajo de tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

A los doctores Victor Rico-Gray, Rodolfo Dirzo Minjarrez, Miguel Ulloa Sosa, Zenón Cano Santana, Victor ParraTabla y Victor Bandala Muñoz y a la Dra. Margarita Villegas Ríos que fungieron como tutores y jurado evaluador, por el apoyo, las sugerencias y observaciones al trabajo de tesis para el enriquecimiento del mismo.

A los directivos del Instituto de Ecología por las facilidades que brindaron en la realización del presente trabajo, en especial al Dr. Sergio Guevara y al Dr. Miguel Equihua. Al Dr. Victor Bandala, Jefe del Departamento de Biodiversidad y Sistemática, por su constante estímulo en la terminación de este trabajo.

Al CONACYT por el apoyo financiero del proyecto 4334, ya que los resultados del presente trabajo de tesis son parte de los obtenidos en el desarrollo de dicho proyecto de investigación.

A Zelene Durán Barradas por el apoyo en el aislamiento de las cepas de los micoparásitos aquí trabajados. Al Ing. Agr. Ángel Romero Rodríguez por su ayuda en algunos de los monitoreos. A Tiburcio Láez por las fotografías al microscopio electrónico de barrido.

A mis amigos y colegas por su apoyo moral en todas las etapas de trabajo: Santiago Chacón, Sergio Avendaño, Cristina Barcenas, Mónica Palacios, Gonzalo Castillo, Gabriela Heredia, Leticia Montoya, Irma López, María Luisa Castillo, Arturo Bonet y Felisa Herrador.

A mis alumnos y ahora amigos Ángel Núñez Sánchez, María del Carmen Núñez Camargo, Damaris del Carmen Desgarenes Valido por el constante entusiasmo que transmiten.

A mis amigas Rossana Bigurra, Norma Bozada, Martha Galván, Gloria Luz Pomares, Trinidad Sanchís y Rosa Borrás por todo su apoyo, constante estímulo e invaluable amistad.

## CONTENIDO

<b>Introducción general</b> .....	<b>1</b>
El café en México	
La roya del café	
Organismos biocontroladores y sus interacciones	
<b>Objetivos</b> .....	<b>5</b>
<b>Capítulo 1. Micoparásitos de la roya del café</b> (publicado).....	<b>10</b>
Resumen, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión	
<b>Capítulo 2. Fenología del café e incidencia y daño de la roya</b> .....	<b>21</b>
Fenología de los cafetos	
Área foliar	
Incidencia de la roya del café	
Intensidad de daño	
Número de pústulas	
Proporción de edades de las pústulas	
<b>Capítulo 3. Incidencia e intensidad de daño de los micoparásitos sobre la roya del café</b> .....	<b>47</b>
Incidencia de los micoparásitos	
Intensidad del daño de los micoparásitos	
Correlación roya y micoparásitos con factores ambientales	
<b>Capítulo 4. La comunidad de micoparásitos</b> .....	<b>73</b>
Riqueza de especies de micoparásitos	
<b>Capítulo 5. Caracterización de cepas de micoparásitos de la roya del café y su interacción <i>in vitro</i></b> .....	<b>81</b>
Velocidad de crecimiento de las especies micoparásitas en diferentes medios de cultivo	
Interacción de las especies micoparásitas <i>in vitro</i>	
<b>Capítulo 6. Endófitos del café</b> .....	<b>105</b>
<b>Discusión general</b> .....	<b>111</b>

## Resumen

**Carrión, G. 2006. La naturaleza de las interacciones entre la roya del café y sus hongos hiperparásitos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. UNAM. 119 pp.**

En el presente trabajo se estudió en condiciones naturales cómo influyen los micoparásitos sobre la dinámica poblacional de la roya del café. Debido a la falta de información sobre las especies de hongos micoparásitos involucrados y la fenología de la roya del café en presencia de uno o más hongos micoparásitos, se proyectaron como objetivos particulares: 1) conocer las especies de micoparásitos que crecen sobre la roya del café, 2) evaluar la frecuencia con que se presentan los micoparásitos sobre la roya del café, y 3) entender cómo afectan los factores ambientales (temperatura, precipitación y evapotranspiración) en la relación café-roya-micoparásitos.

Como resultado de las exploraciones en plantaciones de café de la parte central del estado de Veracruz, México, se registró la presencia, en condiciones naturales, de seis micoparásitos de la roya del café (*Hemileia vastatrix*): *Acremonium byssoides*, *Calcarisporium arbuscula*, *C. ovalisporum*, *Fusarium pallidoroseum*, *Sporothrix guttuliformis* y *Lecanicidium lecanii* (= *Verticillium lecanii*).

En los cafetales seleccionados para el estudio (Xico y Tizal, de la región de Xalapa, Veracruz) ubicados en zonas diferentes de la región cafetalera del estado de Veracruz, con diferentes condiciones ambientales, se evaluó durante 31 meses (de febrero de 1997 a agosto de 1999) la incidencia e intensidad de la roya y los micoparásitos sobre la roya del café, correlacionadas con la precipitación, la temperatura y la evapotranspiración. En ambas localidades la esporulación de la roya se presentó de octubre a marzo y el porcentaje de área foliar dañada fue bajo. El micoparasitismo de la roya del café alcanzó su mayor porcentaje después de la máxima esporulación de la roya (abril y mayo). El mayor porcentaje de micoparasitismo coincide con el período de menor precipitación y evapotranspiración y el aumento de la temperatura está correlacionado con la disminución de la roya y el aumento del micoparasitismo. En las pústulas jóvenes no se encontraron indicios de algún micoparásito. Las pústulas maduras y viejas fueron las que se encontraron con micoparásitos. La incidencia de micoparásitos sobre las pústulas viejas es mayor que sobre las maduras. Las pústulas de roya se encontraron micoparasitadas por una o dos

especies de hongos. La presencia y abundancia de las especies de micoparásitos es variable durante la esporulación de la roya del café como consecuencia no sólo de la presencia o ausencia de la roya, sino debido a las condiciones climáticas. La mayor riqueza de las especies de micoparásitos se encontró en la época de menor precipitación y evapotranspiración (marzo) sobre las pústulas viejas (seis hongos).

La velocidad de crecimiento micelial de cepas de cada una de las especies de micoparásitos evaluadas fue diferente; la mayor velocidad de crecimiento y abundante micelio la presentaron *F. pallidoroseum* y *A. byssoides* en comparación con *S. guttuliformis*, *L. lecanii* y *C. ovalisporum*. Las interacciones entre los cinco micoparásitos encontrados con mayor frecuencia en los cafetales evaluados, estudiadas en el laboratorio indicaron que la comunidad de micoparásitos no sólo compite por el recurso (esporas de roya), sino que hubo un proceso de sucesión micoparasítica entre ellos. Con base en los resultados de laboratorio, los hongos micoparásitos que se pueden utilizar como agentes de control biológico de enfermedades causadas por royas son *Sporothrix guttuliformis*, *Lecanicidium lecanii* y *Calcarisporium ovalisporum*, no sólo por sus cualidades de micoparásitos, sino por el mejor manejo a nivel de laboratorio. Por otro lado, se aislaron micelios de hongos endófitos que se agruparon en once especies: *Coniosporium* sp. (2), *Colletotrichum gloeosporioides*, *Hymenopsis* sp., *Phyllosticta bokensis*, *Xylaria* spp. (3), *Penicillium* sp. y dos micelios estériles. Ninguno de los hongos aislados como micoparásitos se obtuvo de los fragmentos de hojas de café al aislar los diferentes endófitos.

En un agroecosistema con tan alta diversidad como son los cafetales, el conocimiento de la relación hospedero-parásito-micoparásito nos ayuda a entender cómo la población de un parásito introducido, como la roya del café, es regulada por una comunidad de hongos nativos. El efecto que los micoparásitos ejercen de manera natural sobre la dinámica poblacional de la roya puede servir de base para el control de otras enfermedades causadas por hongos que actualmente son de importancia económica. Asimismo, se abre un panorama amplio de investigación sobre las interacciones entre los micoparásitos de otros hongos fitopatógenos, debido a la red trófica existente entre ellos.

## Abstract

**Carrión, G. 2006. The nature of interactions between coffee rust and mycoparasites. Doctoral thesis. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. UNAM. 119 pp.**

The present research addresses how mycoparasites affect the population dynamics of coffee rust in natural conditions. As the type of mycoparasitic fungi involved is little known, as is coffee rust phenology in the presence of one or more mycoparasitic fungi, the following specific objectives were laid out: 1) to identify mycoparasite species growing on coffee rust, 2) to evaluate the frequency of mycoparasite on coffee rust, and 3) to understand the role played by environmental factors (temperature, rainfall, and evapotranspiration) in the coffee rust-mycoparasite relationship.

As a result of research done on coffee plantations in central Veracruz, Mexico, six coffee rust (*Hemileia vastatrix*) mycoparasites were identified in natural conditions: *Acremonium byssoides*, *Calcarisporium arbuscula*, *C. ovalisporum*, *Fusarium pallidoroseum*, *Sporothrix guttuliformis*, and *Lecanicidium lecanii* (= *Verticillium lecanii*).

On coffee plantations near Xalapa, Veracruz, one in Xico and another in Tizal, we conducted a 31-month analysis (February 1997 to August 1999) of the incidence and intensity of mycoparasites on coffee rust in relation to rainfall, temperature, and evapotranspiration. The highest incidence of rust occurred from October to March at both locations and was higher at the Tizal plantation. In terms of rust intensity, a very low percentage of damaged leaf area was observed on plants from both plantations. Mycoparasitism on coffee rust reached its highest percentage between April and May on both plantations, following maximum rust sporulation. Peaks in mycoparasitism coincided with the period of the least rainfall and evapotranspiration. Young pustules showed no signs of any parasites or mycoparasites, which were, however, found on mature and old pustules. The incidence of mycoparasites on old specimens was higher than on mature ones. One or two species of fungal mycoparasite were found on rust pustules at both sites. The presence and abundance of mycoparasite species varied during coffee rust sporulation due not only to the presence or absence of rust but to climatic conditions. The greatest mycoparasite species richness was found in spring (six fungi) on old pustules.



The mycelial growth rate of strains from each of the mycoparasite species evaluated differed. The highest growth rate was measured for *F. pallidoroseum* and *A. byssoides*, as compared to *S. guttuliformis*, *L. lecanii*, and *C. ovalisporum*. In laboratory, we studied the interactions between the five mycoparasites found most frequently on these coffee plantations. Results indicate that the mycoparasite community not only competes for resources (rust spores) but that a succession process occurs among them. Laboratory results indicate that the mycoparasitic fungi that can be used as biological agents to control diseases caused by rust are *Sporothrix guttuliformis*, *Lecanicidium lecanii*, and *Calcarisporium ovalisporum*, not only due to their mycoparasitic characteristics but to how they can be handled in laboratory. With regard to endophytic fungi, mycelia were isolated and grouped into eleven species: *Coniosporium* sp. 1 and 2, *Colletotrichum gloesporoides*, *Hymenopsis* sp., *Phyllosticta bokensis*, *Xylaria* spp. (3), *Penicillium* sp., and two undetermined mycelia. When the various endophytes were identified, none of the fungi isolated as mycoparasites were found to come from coffee leaf fragments.

In as diverse an agroecosystem as coffee plantation, knowledge of the host-parasite-mycoparasite relationship helps us understand how the population of an introduced parasite such as coffee rust can be regulated by a native fungi community. The effect that mycoparasites exert naturally on rust population dynamics may serve as a basis to control other fungi-produced diseases, which can be economically significant. Furthermore, this study opens up a wide panorama of research on the interactions between the mycoparasites of other phytopathogenic fungi, as they form part of a trophic network.

## **Introducción General**

### **El café en México**

El café, *Coffea arabica* L. (Rubiaceae), es originario de Etiopía ha sido cultivado en América en más de 15 países desde los años 1700 (Wellman, 1972; Velasco, 1979). En México, quinto productor de café a nivel mundial, ha sido importante desde los puntos de vista económico, social y ecológico. Actualmente el café es cultivado por orden de extensión en los estados de Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Puebla, Guerrero, Hidalgo, San Luis Potosí, Nayarit, Jalisco, Tabasco, Colima y Querétaro. Aunque en los últimos 15 años este cultivo ha pasado por etapas económicas críticas, el área cultivada es de 750,000 ha y la producción nacional anual es de 4-5 millones de sacos (CMC, 2006). La mayoría de los cafetales pertenece a pequeños productores que en promedio tienen 2 ha, obteniendo bajos rendimientos en la producción (460 Kg/ha). La baja producción por hectárea se debe a varios factores que van desde el socioeconómico y político hasta el fitosanitario (CMC, 2006).

Debido a lo diverso del país, tanto en vegetación como culturalmente, en el sistema de producción de café en México se pueden distinguir cinco tipos de cafetal (Moguel y Toledo, 1999): rústico, tradicional con policultivo, comercial con policultivo, monocultivo con sombra y monocultivo sin sombra. De éstos predominan los dos primeros, en donde ha sido utilizada la vegetación original de la región (selva alta perennifolia, selva baja caducifolia, bosque mesófilo de montaña y bosque de encinos), con lo cual se ha conservado una alta diversidad (Moguel y Toledo, 1999; Tanglely, 1996; Nestel, 1993), lo que propicia el desarrollo de organismos y redundante en beneficio del agrosistema cafetalero.

## **La roya del cafeto**

La roya del cafeto causada por el hongo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. (Basidiomycota: Uredinales), es un parásito obligado cuyo ciclo de vida consta de dos estados (hemicíclico) uredinios y telios (Cummins y Hiratsuka, 1983), el primero es el causante de esta enfermedad. Su presencia en Sri Lanka en la década de 1869 tuvo un efecto devastador (Wellman, 1957; Velasco, 1979). El Continente Americano se mantuvo libre de la roya del cafeto durante 275 años (Wellman, 1972). Llegó a éste en 1971 a través de Brasil, procedente de África, dispersándose a partir de entonces por las distintas regiones cafetaleras de Latinoamérica (Schieber y Zentmyer, 1984; Kushalapa y Eskes, 1989). En México, para detener su introducción y dispersión, se llevaron a cabo estrictas campañas de sanidad vegetal organizadas por el gobierno a través de Instituto Mexicano del Café (INMECAFE, 1988) y la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). En dichas campañas se incluyó la aspersion de oxiclورو de cobre y, en menor cantidad, el triadimefón. Paralelamente se implementó la introducción de variedades resistentes a la roya, como la Catimor, Colombia y Sarchimor (Burton y Show, 1983; Kushalapa, 1990; Rivera Fernández, 1990). A pesar de todos esos esfuerzos, la roya fue detectada en Chiapas en 1981 y, posteriormente, se dispersó en los cafetales del país incluyendo los del estado de Veracruz (INMECAFE, 1988). Pasados varios años, el gobierno abandonó la campaña de la roya del cafeto y los cafecultores no pudieron mantener económicamente el ritmo de las aplicaciones de fungicidas. A diferencia de lo sucedido en otros países, en México la roya no tuvo un efecto devastador (Becker, 1979; 1984). ¿Por qué? ¿Qué estaba pasando en los cafetales? La roya se encontraba en todos los cafetales del país de manera moderada. En diversos cafetales de México, incluyendo los del estado de Veracruz se detectó

*Lecanicidium lecanii* (Zimmerman) Zare & Gams (= *Verticillium lecanii*) como micoparásito de las urediniosporas y se sugirió como un buen controlador de la roya en México (Carrión, 1988; Carrión y Ruiz-Belin, 1988; Alarcón y Carrión, 1994). Sin embargo, era necesario tener evidencias de cómo de manera natural las interacciones del tercer nivel trófico, estaban afectando la dinámica poblacional de la roya del café.

### **Organismos biocontroladores y sus interacciones**

Una de las alternativas al uso de fungicidas puede ser el control biológico por medio de organismos que funcionan como competidores naturales por nutrientes y espacio, como antagonistas por la producción de antibióticos, o como micoparásitos. El micoparasitismo es el parasitismo de un hongo hacia otro (Hawksworth *et al.*, 1995). También ha sido llamado hiperparasitismo (Boosalis, 1964), lo cual es correcto para referirse a un parásito que parasita a otro parásito. Una asociación micoparasítica se refiere a una asociación micotrófica, donde se enfatiza el aspecto nutricional de la relación (Jeffries y Young, 1994).

Los géneros de hongos hiperparásitos registrados sobre diferentes especies de Uredinales (royas) son *Tuberculina*, *Scytalidium*, *Eudarluka*, *Cladosporium*, *Scopinella*, *Ramularia*, *Verticillium*, *Hainesia*, *Micropodia*, *Ramichloridium*, *Trichothecium*, *Acremonium*, *Aphanocladium* y *Penicillium* (Jeffries y Young, 1994).

Hasta antes de realizar el presente trabajo, en México sólo se conocía *Lecanicidium lecanii* (= *Verticillium lecanii*) sobre la roya del café, aunque en otros países se habían registrado además *Aphanocladium melirolae* (Hansf.) Gams y *Cladosporium hemileia* Steyaert en Ghana y el Congo Belga, respectivamente, y *Verticillium psalliotae* Treschow en Malasia (Tabla 1). Aunque se han registrado muchos hongos como micoparásitos de

parásitos de plantas (Hoog, 1974, 1978; Hoch y Abawi, 1979; Gray y Morgan-Jones, 1980; Hijwegen, 1988, Carrión y Romero, 1999; Romero y Carrión. 1995, 2000), éstos generalmente se estudian de manera aislada (Tabla 1) y pocos abordan el conjunto de los hongos hiperparásitos de un parásito (Hijwegen, 1988; Hijwegen y Dirven, 1993).

Tabla 1. Micoparásitos de patógenos de plantas.

<b>Micoparásito</b>	<b>Hospedero</b>	<b>Referencia</b>
<i>Cladosporium hemileia</i>	<i>Hemileia vastatrix</i>	Steyaert (1930)
<i>Verticillium psalliotae</i>	<i>Hemileia vastatrix</i>	Lim y Nik (1983)
<i>Aphanocladium meliولae</i>	<i>Hemileia vastatrix</i>	Gams (1971)
<i>Lecanicidium lecanii</i> (= <i>Verticillium lecanii</i> )	<i>Hemileia vastatrix</i>	
<i>L. lecanii</i>	<i>Puccinia graminis</i>	
"	<i>Puccinia allii</i>	
"	<i>Puccinia recondita</i>	
"	<i>Uromyces appendiculatus</i>	
"	<i>Uromyces dianthi</i>	
"	<i>Erysiphe graminis</i>	
"	<i>Sphaerotheca fuliginea</i>	
<i>Verticillium biguttatum</i>	Hijwegen (1988)	
<i>Acremonium alternatum</i>		
<i>A. strictum</i>		
<i>Ampelomyces quisqualis</i>		
<i>Aphanocladium album</i>		
<i>Calcarisporium arbuscula</i>		<i>Rhizoctonia solani</i>
<i>Cladobotryum varium</i>		<i>Sphaerotheca fuliginea</i>
<i>Penicillium chrysogenum</i>		
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>		
<i>Sepedonium</i>		
<i>chrysospermum</i>		
<i>Sesquicillium candelabrum</i>		
<i>Sporothrix cf. flocculosa</i>		
<i>Tilletiopsis albescens</i>		
<i>Tilletiopsis minor</i>		
<i>Trichoderma viride</i>		
<i>Verticillium fungicola</i>		
<i>Paecilomyces</i> <i>fumosoroseus</i>	<i>Sphaerotheca fuliginea</i>	Kavková y Čurn (2005)
<i>Gliocladium roseum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Li <i>et al.</i> (2002)
<i>Sphaerellopsis filum</i>	<i>Melampsora larici-epitea</i>	Pei <i>et al.</i> (2003)

Una manera de estudiar una comunidad biótica es a través del estudio de las interacciones entre las especies que la constituyen y cómo están estructuradas (Thompson, 1982, 1994). Básicamente, podemos referirnos a dos tipos de interacciones interespecíficas: antagonismo y mutualismo. De manera muy reduccionista, las interacciones antagónicas se presentan debido a que los organismos son paquetes concentrados de energía y nutrientes (interacciones tróficas) y los recursos son limitados (competencia) (Thompson, 1982). Independientemente del tipo de interacciones, todas las comunidades están constituidas al menos por tres niveles tróficos. De éstos, el llamado tercer nivel trófico (e.g., depredadores, parasitoides y parásitos) es considerado en muchos casos como parte de las baterías de defensa de las plantas contra los herbívoros (Price *et al.*, 1980).

Desde el punto de vista ecológico, las esporas de la roya se convierten en una fuente de recursos para varios organismos, entre ellos otros hongos. Así, los uredinios además de ser la estructura formadora de las nuevas unidades de dispersión de la roya (urediniosporas), para la producción de nuevos individuos sobre su hospedero, también son una parte más en la red trófica del agroecosistema cafetalero.

Debido a que en los cafetales existe una alta diversidad, una pregunta que surgió al examinar las pústulas en campo fue si además de *L. lecanii* ¿existen otras especies de hongos como micoparásitos de la roya del café? Si son varias especies ¿Qué especies constituyen la comunidad de micoparásitos? Por otro lado, la fenología de la roya del café ha sido ampliamente estudiada, se conocen los períodos de mayor esporulación de la roya en respuesta a las condiciones ambientales, pero estos parámetros no han sido evaluados considerando la presencia de micoparásitos, por lo que no se conoce como afectan estos microorganismos en la densidad de población de la roya. Además, si las condiciones

ambientales influyen sobre la población de la roya del café, ¿Cómo influyen sobre la comunidad de micoparásitos?

### **Objetivos**

El presente trabajo planteó como objetivo general conocer en condiciones naturales cómo influyen los micoparásitos sobre la dinámica poblacional de la roya del café. Debido a la falta de información sobre las especies de hongos micoparásitos involucrados y la fenología de la roya del café en presencia de uno o más hongos micoparásitos, se proyectaron los siguientes objetivos particulares:

- 1) conocer las especies de micoparásitos que crecen sobre la roya del café.
- 2) evaluar la frecuencia con que se presentan los micoparásitos sobre la roya del café.
- 3) entender cómo afectan los factores ambientales (temperatura, precipitación y evapotranspiración) en la relación cafetos-roya-micoparásitos.

El presente trabajo está constituido por seis capítulos. En el capítulo 1 se abordó el primer objetivo; se describen los hongos micoparásitos encontrados sobre la roya del café, que nos sirven de base en el conocimiento de la comunidad de micoparásitos. Los ejemplares fueron colectados principalmente en la zona centro del estado de Veracruz. En el capítulo 2 se presenta la evaluación de la incidencia, intensidad y la distribución de edades de la población de la roya sobre su hospedero (hojas del café), parámetros con los cuales se corroboró que la roya del café no afecta económicamente a este cultivo. En el capítulo 3 se cubrieron el segundo y tercer objetivo del trabajo, evaluando la incidencia e intensidad de los micoparásitos sobre la roya del café y correlacionándolos con la precipitación, la temperatura y la evapotranspiración en el tiempo de estudio. En el capítulo

4 se muestran los resultados de la evaluación de la comunidad de los micoparásitos a nivel microscópico, debido a la dificultad de identificarlos a nivel de campo, obteniendo datos sobre la riqueza de especies y abundancia proporcional. El capítulo 5 trata sobre la caracterización de algunas cepas en distintos medios de cultivo para conocer su velocidad de crecimiento, y como resultado de la interacción *in vitro* de los micoparásitos se obtuvo la posible red trófica entre ellos. Finalmente, en el capítulo 6 se registran los hongos endófitos de las hojas del cafeto, corroborando que ninguno de los hongos micoparásitos es parte de ellos.



**CAPÍTULO 1**

**MYCOPARASITES ON THE COFFEE RUST IN MEXICO**

**CARRION, G. AND V. RICO-GRAY (2002)**

**FUNGAL DIVERSITY 11: 49-60**

---

## Mycoparasites on the coffee rust in Mexico

---

Gloria Carrión<sup>1\*</sup> and Victor Rico-Gray<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento Hongos, <sup>2</sup>Departamento de Ecología Vegetal, Instituto de Ecología, A.C., Apdo. 63, Xalapa, Veracruz 91070, México

Carrión, G. and Rico-Gray, V. (2002). Mycoparasites on the coffee rust in Mexico. *Fungal Diversity* 11: 49-60.

We surveyed coffee plantations for mycoparasites of the coffee rust (*Hemileia vastatrix*) in central Veracruz, México. We report the presence in natural conditions of six mycoparasites. Five are reported for the first time (*Acremonium byssoides*, *Calcarisporium arbuscula*, *C. ovalisporum*, *Sporothrix guttuliformis*, *Fusarium pallidoroserum*) as mycoparasites of *H. vastatrix*, the other species, *Verticillium lecanii*, had been previously reported.

**Key words:** coffee rust, *Hemileia vastatrix*, Hyphomycetous anamorphs, mycoparasites.

### Introduction

A variety of fungicolous fungi (i.e. fungi associated to other fungi) have been found in nature, either as parasites, commensals or saprobes (Hawksworth *et al.*, 1995). The term hyperparasite is considered obsolete by some authors, however, it has served to describe the parasitic interaction between fungi (usually a primary parasite) (Issac, 1992). Mycoparasitism, which is quite common in nature, has received special attention due to the search for biological control alternatives for diseases such as powdery and downy mildews (Hijwegen, 1988, 1992; Hijwegen and Dirven, 1993).

The coffee rust *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. has been the most devastating disease of coffee cultivars (*Coffea arabica*). It was first detected in the American Continent (Brazil) in 1971, reaching the México-Guatemala border ten years later (Schieber and Zentmyer, 1984), and, despite all the efforts to control its dispersal, it is now present throughout Mexico's coffee regions. The mycoparasitic fungi reported as parasites on the coffee rust are *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas (Madagascar, Brazil), *V. psalliotae* Treschow (Congo, Malaysia), *Aphanocladium meliolae* (Hansf.) W. Gams (Ghana), and *Cladosporium hemileia* Steyaert (Congo) (Steyaert, 1930; Gams, 1971; Lim and Nik, 1983). The first report for Mexico of the coffee rust-*Verticillium lecanii* association was made in 1985, and it is mainly present

---

\* Corresponding author: Gloria Carrión; e-mail: gloriac@ecologia.edu.mx

during the Autumn and Winter months (Carrión, 1988). The efficiency of *V. lecanii* as a parasite of the coffee rust has been experimentally tested both in the laboratory and in the field (Carrión and Ruiz-Belin, 1988; Alarcón and Carrión, 1994; Romero and Carrión, 1995; Carrión *et al.*, 1999).

Here we present a description of the mycoparasites of *H. vastatrix* (Figs. 1, 2) found between the altitudes of 150 m and 1700 m in coffee plantations in central Veracruz, México. These mycoparasites are all Hyphomycetous anamorphs (*Acremonium*, *Calcarisporium*, *Fusarium*, *Sporothrix* and *Verticillium*). We evaluated the growth during 10 days of all species (5 repetitions) in PDA (agar, dextrose and potato), under room temperature ( $21 \pm 3^\circ\text{C}$ ). Samples of all fungi studied are deposited in the Herbarium XAL of Instituto de Ecología, A.C., and the strains obtained are deposited in the collection of the Departamento Hongos of Instituto de Ecología, A.C., which is registered in World Data Centre for Microorganism 782 (IE).

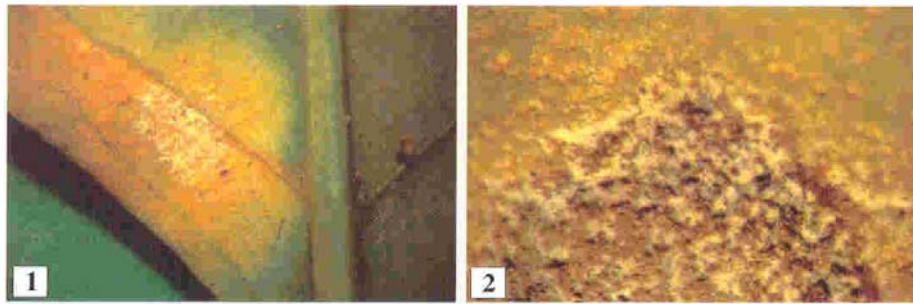
### Taxonomy

*Acremonium byssoides* W. Gams & Lim, Transactions of the British Mycological Society 64: 389-404 (1975). (Figs. 3, 4)

*Mycelium* on groups of rust sori abundant, floccose, cottony-white when young and creamy when older, slightly raised at the centre, consistency slightly gelatinous to cartilaginous, deforming the PDA, growth rate 25-50 mm after 10 days. Vegetative hyphae thin-walled, fasciculate, chondroid 1.2  $\mu\text{m}$  wide. Sporulation nematogenous to plectonematogenous. *Conidiogenous cells* simple or branched, septated, 16-31  $\mu\text{m}$  long, at the base 1-1.6  $\mu\text{m}$  and 0.4  $\mu\text{m}$  at the tip, smooth wall. *Conidia* in slimy heads, hyaline greenish, ellipsoidal, apiculate base, apex slightly rounded-truncate, irregularly guttulated  $2-3.2 \times 1-1.6 \mu\text{m}$ .

*Material examined*: MEXICO, Veracruz, Mpio. Coatepec, south of Coatepec, 26 Mar. 1987, Carrión 914b; Mpio. Emiliano Zapata, road Chavarrillo-Monte Oscuro, El Tizal, 25 Mar. 1998, Carrión 1997, strain IE-300; 23 Feb. 1999, Carrión 2082; Mar. 1999, Carrión 2095; Mpio. Xico, road to Cascada Texolo, 25 Mar. 1998, Carrión strain IE-301; Mpio. Catemaco, road Catemaco-Sontecomapam, 24 Nov. 1999, Carrión IE-377; around Laguna Escondida, 24 Nov. 1999, Carrión strain IE-378.

*Acremonium byssoides* is probably a ground dweller from where it then infects the uredinia of *H. vastatrix*. An *Acremonium* sp. has been isolated from coffee plantation soil in Nyasaland (Siddiqi, 1964); however, it was not found on roots, branches, leaves or fruits, and not reported as pathogenic on coffee. *Acremonium zonatum* has been reported as a parasite of coffee leaves, however, this species is clearly defined by its distinctive zonal leaf spot, which is not present on rust sori infected by *A. byssoides* (Hawksworth, 1976). Our



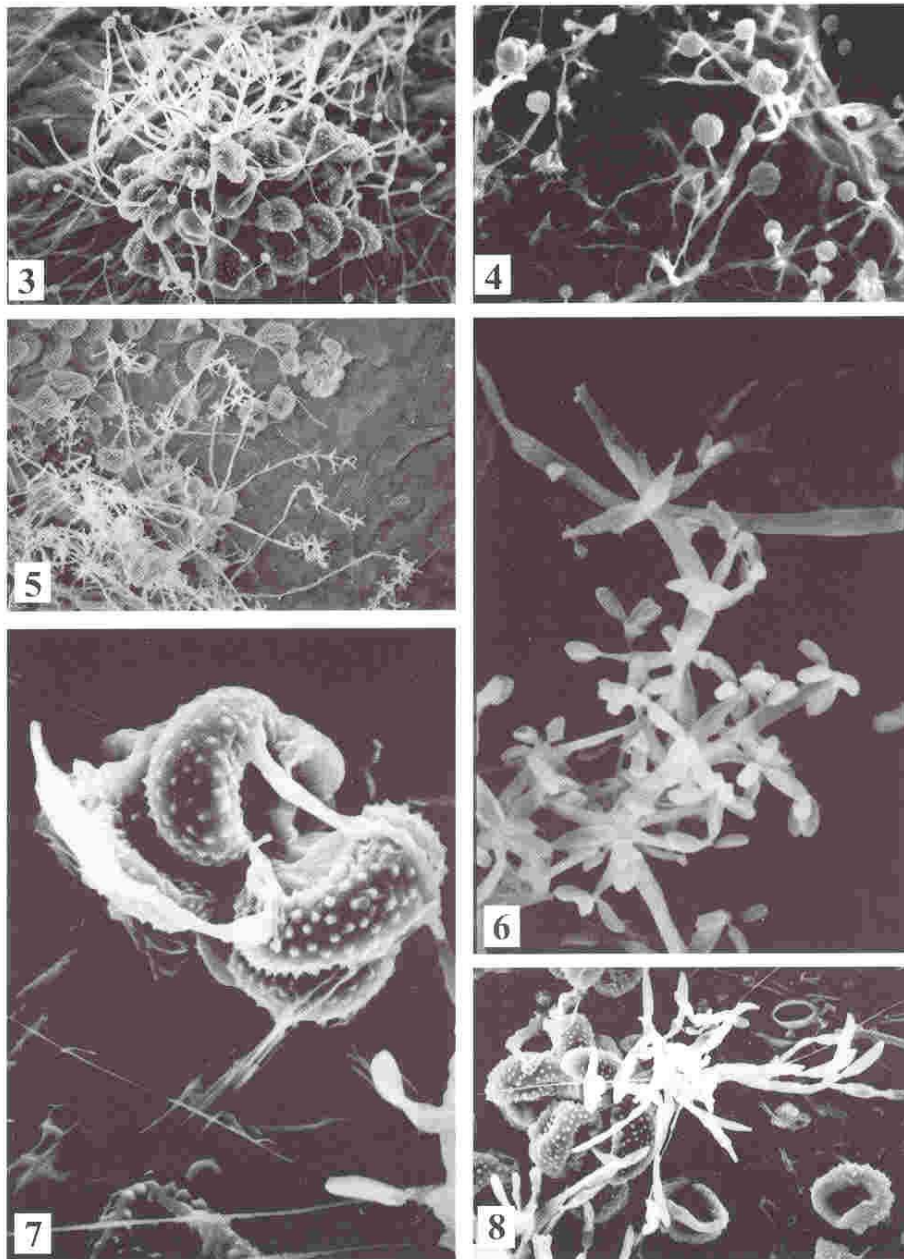
Figs. 1, 2. *Hemileia vastatrix*. 1, 2. Sori with mycoparasites.

material is similar to that registered on *Oidium heveae*, a parasite of *Hevea brasiliensis* Muell.-Arg. in Malaysia (Gams, 1975). Other *Acremonium* species have also been reported on fungi, e.g., *A. acutatum* on *Cercospora atromarginali*, a parasite of *Solanum nigrum*, and *Acremonium ansfordii* on *Periconia cookei*, which lives on dead bamboo shoots in India. Several *Acremonium* species have been registered on Uredinales (Gams, 1971). *Acremonium terricola* on *Puccinia graminis* in Italy, *A. hyalinulum* on *P. heterospora* in the Philippines, and *A. sclerptogenum* on *P. rubigo-vera* in Braunschweig. Gams (1971) also reported 12 *Acremonium* species as mycoparasites of *Colletotrichum*, *Tubercularia* (Deuteromycetes), *Appendiculella* (= *Irenina*, Meliolales), *Ceratocystis*, *Corynespora*, *Daldinia*, *Diatrype*, *Hypoxylon*, *Nectria* and *Parodiella* (Ascomycetes), and *Armillariella*, *Fomes*, *Gymnopilus*, *Heterobasidion*, *Inonotus*, *Polyporus* and *Trametes* (Basidiomycetes). Finally, two *Acremonium* species, *A. alternatum* and *A. strictum*, have been reported on the powdery mildew *Sphaerotheca fuliginea* (Hijwegen, 1992).

*Calcarisporium arbuscula* Preuss, Linnæa 24: 124. 1851.

*Mycelium* white when young and greyish-pink when mature with a woolly-felty texture, growth rate 25-29 mm after 10 days. Vegetative hyphae hyaline 1.6-2.4  $\mu\text{m}$  wide, thin-walled. Conidiophores erect, hyaline, 290-300  $\times$  1-2  $\mu\text{m}$ , verticillate with 3-9 verticil groups, distance between verticils variable, 10-20  $\mu\text{m}$ , each verticil with (2-)4(-7) conidiogenous cells. *Conidiogenous cells* exhibiting progressive plagiotropic growth, wide at the base (10-)14-17  $\times$  2  $\mu\text{m}$ , with a variable number of denticles 4-8(-12), sympodial growth, denticles 2-3  $\mu\text{m}$  long, when young and 6-13  $\mu\text{m}$  long when mature. *Conidia* hyaline obovoidal to fusiform, thin-walled, smooth (3-)5(-7)  $\times$  2-3  $\mu\text{m}$ .

*Material examined*: MEXICO, Veracruz, Mpio. Zongolica, road Zongolica-Nepopoalco, 23 Nov. 1999, Carrión strain IE-379.



**Figs. 3-8.** *Acremonium byssoides*. **3.** Coffee rust sorus covered by hyphae and conidiophores, 500×. **4.** Conidiophores, 1500×. *Calcarisporium ovalisporum*. **5.** Conidiophores emerging from sorus 1000×. **6.** Conidiogenous cell showing traces of where spores are produced, 2000×. *Fusarium pallidroseum*. **7.** Mycelium and the formation of a secondary conidium, 1500×. **8.** Rust sorus covered by the mycoparasite, 500×.

Two species are known for this genus, *Calcarisporium arbuscula* and *C. ovalisporum*, and both have been reported as parasites of higher Basidiomycetes and Ascomycetes. *Calcarisporium arbuscula* is the type species of the genus (de Hoog, 1974, 1978). Differences between both *Calcarisporium* species are based on the larger size of all structures in *C. arbuscula*. This fungus has been reported on *Sphaerotheca fuliginea* (cucumber powdery mildew), and its glycolytic activity has been studied in detail as it greatly affects the health of the conidiophores of *S. fuliginea* (Hijwegen, 1992; Hijwegen and Verhaar, 1993).

*Calcarisporium ovalisporum* (Petch) de Hoog, Persoonia 10: 76-77 (1978).

(Figs. 5, 6)

≡ *Cladobotryum ovalisporum* Petch, in Transactions British Micological Society 16: 23 (1932).

*Mycelium* yellowish-white cottony, growth rate 33-49 mm after 10 days. It forms a cottony layer on the sori, which appear farinose at sporulation. Vegetative hyphae 2-3 µm wide. *Conidiophores* erect, hyaline 40-170 × 1-3 µm, verticillate with 2-4 verticil groups, distance between verticils variable 16-33 µm, each verticil with 1-4 conidiogenous cells. *Conidiogenous cells* (1-5), 6-12 × 1-1.5 µm, conidiogenous scars 2-2.5 µm. *Conidia* hyaline, unicellular, smooth, thin-walled, ovoid, navicular or fusiform, base acuminate, apex rounded (2-)3(-4) × (1-)2(-3) µm.

*Material examined*: MEXICO, Veracruz Mpio. Coatepec, coffee plantation at the south of Coatepec, 26 Mar. 1987, Carrión 914e; road Coatepec-Mahuixtlán, 3 Oct. 1995, Carrión strain IE-320; Mpio. Emiliano Zapata, road Chavarrillo-Monte Oscuro, El Tizal, 26 Feb. 1998, Carrión 1972; 25 Mar. 1999, Carrión strain IE-322; Mpio. Xico, road Cascada Texolo, 30 Oct. 1995, Carrión strain IE-321; 26 Jan. 1999, Carrión strain IE-326.

Even though both *Calcarisporium* species were found associated with the coffee rust, *C. ovalisporum* was more common. This species had not been reported previously as a mycoparasite of Uredinales, although it had been reported growing on *Hirsutella citrifomis*, an entomopathogenic fungus growing on the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) brown (Rombach and Roberts, 1987).

*Fusarium pallidoroseum* (Cooke) Sacc.

(Figs. 7, 8)

= *Fusarium semitectum* Berk. & Rav. in Berkeley, Grevillea 3: 98, 1875.

*Mycelium* growth rate 50 mm after 8 days, pinkish white under cultivation, sometimes reddish-white, changing from yellowish, peach, avellaneous to buff brown. Granulous texture on the sori, sometimes slightly pink. *Conidiomata* are sporodochia and are grouped in older cultures. *Conidiogenous cells* polyblastic, sympodial, 8-18 × 2.4-3.2 µm. *Conidia*

primary and secondary, curved, cuneiform, basal cell lacking pedicel, 3-7 septa, those with 3-5 septa  $21-31 \times 3-4 \mu\text{m}$ , those with 5-7 septa  $36-48 \times 3-4 \mu\text{m}$ . *Chlamydospores* intercalary, smooth or roughened, abundant, forming chains.

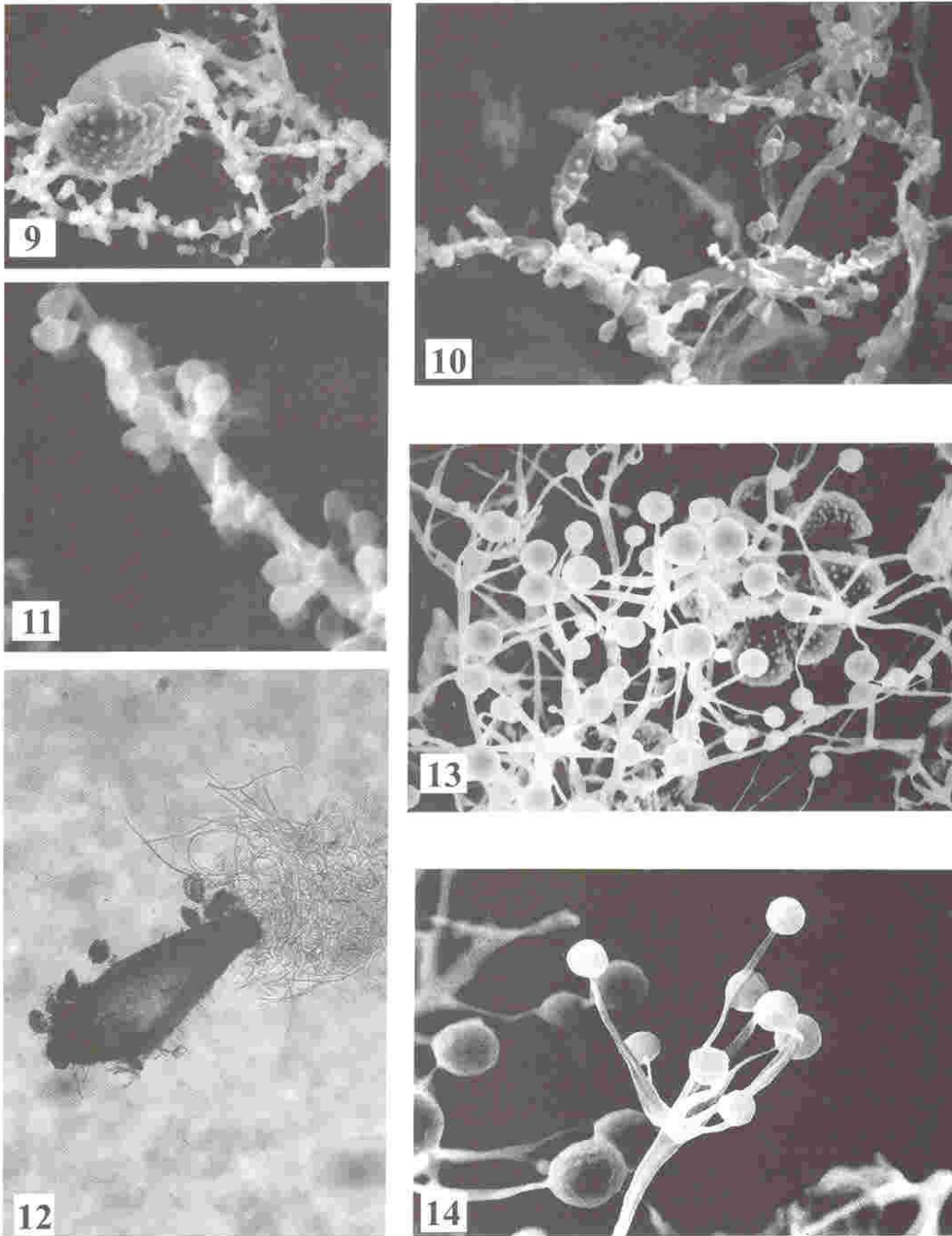
*Material examined:* MEXICO, Veracruz, Mpio. Coatepec, south of Coatepec, 26 Mar. 1987, Carrión 914c; Mahuixtlán, 30 Oct. 1995, Carrión strain IE-346; Mpio. Emiliano Zapata, road Chavarrillo-Monte Oscuro, El Tizal, 15 Mar. 1998, Carrión 1996; 23 Feb. 1999, Carrión strain IE-340, 25 Mar. 1999, Carrión 2092; Mpio. Xico, road Cascada Texolo, 26 Feb. 1998, Carrión 1973; 25 Mar. 1998, Carrión 1989b; 12 Nov. 1998, Carrión 2071.

This fungus has been recorded on leaves of *Chenopodium*, *Phytolacca* and the petioles of *Musa* (Booth and Sutton, 1984), on living leaves of *Brassica oleracea* var. *capitata* and *Mangifera indica*, on fallen leaves of *Pseudolmedia spuria*, on fruits of *Lycopersicon esculentus*, on basidiomata of *Pleurotus* sp., and as a parasite of *Phytium ultimum* (Castañeda Ruiz and Rodríguez de la Rosa, 1988; Hoch and Abawi, 1979). *Fusarium pallidroseum* has recently been proposed as a biological control agent of *Mimosa invisa*, a weed of rice fields in the Philippines (Mabbayad and Watson, 2000). It had not been reported previously as a mycoparasite of Uredinales. The pink coloration is not evident on the sori when leaf necrosis begins. Species of *Fusarium* (Section Episphaeria, teleomorphs *Nectria*) had been found before associated with fungi (Booth, 1971) but not with rusts. The number of septa of *F. epistromum* (1-3) does not coincide with the description of this fungus and the spores differ in size ( $16-27 \times 2.4-4 \mu\text{m}$ ). The conidiophores of *F. merismoides* can be lateral phialides and polyphialides and spores of that species are very large  $(30-45) \times (3.5-5)$  and  $40-54 \times 4-5 \mu\text{m}$ , with 3-4 septa.

*Sporothrix guttuliformis* de Hoog, Persoonia 10: 62-63 (1978). (Figs. 9-11)

*Mycelium* white, cottony-floccose, growth rate 30-40 mm after 10 days. Viewed from the bottom of the Petri dish, it is yellowish at the center. Exudate and odour absent. The mycelium is clearly defined as cottony-white marks on the sori of the coffee rust, making a striking contrast against the yellow of the uredinia. Vegetative hyphae hyaline. *Conidiophores* semi-macronematose, filiform,  $36-124 \times 1.5-2 \mu\text{m}$ . *Conidiogenous cells* integrated, polyblastic, intercalary or terminal,  $2.5-5 \times 1.5-2.5 \mu\text{m}$ , denticulate, scars 1-9 per cell, branching orthotropic, most frequently 3 scars, light when young, prominent when mature, less than  $0.5-2 \mu\text{m}$ . *Conidia* guttuliform, smooth, thin-walled, hyaline, hilum inconspicuous,  $1.5-2.5 \times 1-2 \mu\text{m}$ , single, in short chains or ramo-conidia.

*Material examined:* MEXICO, Puebla, Mpio. Tlapacoya, Ahuacatláya, 14 Mar. 2000, Carrión 2165, strain IE-394; Mpio. Tlacuilotepec, San Pedro Petlacotla, road Huauchinango-Poza Rica, 15 Mar. 2000, Carrión 2176. Veracruz, Mpio. Coatepec, road Coatepec-Mahuixtlán, 7 Aug. 1995, Carrión strain IE-358, road Coatepec-San Marcos, 3 Oct. 1995, Carrión strain



Figs. 9-14. *Sporothrix guttuliformis*. 9. Conidiogenous cells emerging of coffee rust spore, 1000 $\times$ . 10. Conidiogenous cells and conidia, 2000 $\times$ . 11. Conidiogenous cells with scars, 7500 $\times$ . 12. Perithecium of *Torrubiella* produced by the mycelium of *S. guttuliformis*, 400 $\times$ . *Verticillium lecanii*. 13. Sorus covered by mycelium and conidiophores, 500 $\times$ . 14. Verticillate conidiogenous cells, 1500 $\times$ .



IE-361, Mahuixtlán; Mpio. Emiliano Zapata, road Chavarrillo-Monte Oscuro, 24 Mar. 1987, Carrión 913d; El Tizal, 25 Mar. 1998, Carrión 1998; 23 Feb. 1999, Carrión 2084 (presence of *Torrubiella*), strain IE-360; Mpio. Xico, road Cascada Texolo, 26 Feb. 1998, Carrión 1978; 25 Mar. 1998, Carrión 1989c; 12 Nov. 1998, Carrión strain IE-359; Mpio. Zongolica, road Zongolica-Xonamanca, 23 Nov. 1999, Carrión strain IE-380; Mpio. Catemaco, around Laguna Escondida, 24 Nov. 1999, Carrión 2159, strain IE-381.

The genus *Sporothrix* comprises more than 10 species, most associated with fungi such as *Cordyceps* and other entomopathogen species (de Hoog, 1974). *Sporothrix globuligera* was isolated from soil in Japan (Matsushima, 1995). *Aphanocladium meliolae*, a mycoparasite of the coffee rust in Ghana (Gams, 1971), can be mistaken for *Sporothrix guttuliformis*, however, the former differs because it lacks ramoconidia and the characteristic sympodial growth of the rachis of the genus *Sporothrix* (Gams, 1971; de Hoog, 1974, 1978). In *S. guttuliformis* the conidiogenous cells present only one scar when the mycelium is young, however, the number of scars increases during ageing. *Sporothrix guttuliformis* is similar to *S. curviconia* which differ however in that it has curved spores and very long conidiogenous cells, (6-)20-35(-60) × 1.2-2 µm (de Hoog, 1974, 1978). The development of some perithecia of *Torrubiella* was found in advanced parasitism states of *S. guttuliformis* on the rust (Fig. 12). Even though we observed the perithecia of *Torrubiella*, there are no report of a teleomorph for *Sporothrix*, however, de Hoog (1974) has reported that *Torrubiella* is a fungus associated with species of *Sporothrix*. Moreover, both fungi have not been linked as anamorph-teleomorph. This suggested association need to be tested in future research.

*Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas in Rev. Inst. Café São Paulo 14: 754, 1939. (Figs. 13, 14)

*Mycelium* mass over the sori, with mycelium threads between sori, white, cottony. Growth rate 29-33 mm after 10 days, both aerial and immersed growth, and thus deforming the PDA. *Conidiophores* crystalline under the stereoscopic microscope, 4-10 groups of phialides in verticils, distance between verticils 24-40 µm. *Phialides* 4-8, arranged in whorls, slightly wide at the base and thinner at the apex, 9-40 × 0.8-2.4 µm. *Conidia* ellipsoidal to cylindrical arranged in heads, hyaline, 4-5.6 × 1.6-2.4 µm.

*Material examined*: MEXICO, Puebla, Mpio. Tlapacoya, Ahuacatlaya, 14 Mar. 2000, Carrión strain IE-393; coffee plantations Café Oro Verde, 14 Mar. 2000, Carrión 2173; Mpio. Tlacuilopec, San Pedro Petlacotla, road Huauchinango-Poza Rica, 15 Mar. 2000, Carrión 2177 (teleomorph *Torrubiella*). VERACRUZ, Mpio. Coatepec, Mahuixtlán, 3 Oct. 1995, Carrión strain IE-362; Mpio. Emiliano Zapata, Chavarrillo, 15 Nov. 1995, Carrión strain IE-366; Monte Oscuro, 6 December 1995, Carrión strain IE-364, 24 Mar. 1987, Carrión 913a; El Tizal, road Chavarrillo-Monte Oscuro, Veracruz, 25 Mar. 1998, Carrión 1995; 23 Feb. 1999, Carrión 2080 (teleomorph *Torrubiella*); Mpio. Xico, road Xico-Texolo, 30 Oct. 1995, Carrión strain IE-363; 17 Jan. 1996, Carrión strain IE-365; 25 Mar. 1998, Carrión 1995; 5 Nov. 1998,

Carrión strain IE-367; Mpio. Zongolica, road Zongolica-Nepopoalco, 23 Nov. 1999, Carrión strain IE-388.

On quite old rust injuries, we found the development of a perithecia of *Torrubiella*, known teleomorph of *V. lecanii*, the latter has also been reported as a parasite of aphids, whiteflies, mealybugs and scales, and on several rust species (*Puccinia graminis tritici*, *P. coronata*, *Hemileia scholtzii* and *Uromyces laevigatus*) (Gams, 1971). Besides *V. lecanii*, *V. psalliotae* was recorded in Malaysia associated to the coffee rust (Lim and Nik, 1983). Over the past 10 years, *V. lecanii* has been used in greenhouses in Europe to control the white fly, and, recently, this species has been used to control such diseases as the cucumber powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea* (Samson *et al.*, 1988; Verhaar *et al.*, 1998). However, its use in the field is strongly limited by low relative humidity.

### Discussion

The fungi described above, are reported for the first time as mycoparasites of the coffee rust, however, they had previously been reported as mycoparasites of other fungi in other regions of the world. *Sporothrix* spp. and *Calcarisporium ovalisporum* apparently prefer entomopathogenic fungi, like *Cordyceps* spp. or *Hirsutella* spp., as a substrate. *Acremonium* spp. are usually associated with a variety of fungus groups. *Sporothrix* spp. and *V. lecanii* prefer insects or fungi as hosts, and supposedly both coincide in the *Torrubiella* teleomorph. They probably originate in the soil and return to it after the fungal resource (coffee rust spores) is no longer available.

These species use their mycelia to form groups of rust spores and, at times, more than one species parasitises the rust's sori. Interestingly, these mycoparasitic fungi only develop on the spores of the coffee rust, but never on its mycelium, which is hidden within the plant. The coffee plantations visited exhibited the same species of fungi, suggesting that the mycobiota associated with coffee rust sori is similar throughout the coffee regions of México. The best collections were done between October and March, which is when the coffee rust and its parasites are abundant.

The coffee plant, an African species, was introduced in México in the nineteenth century, during more than one hundred years the plant was free of coffee rust. When the rust arrived in Mexico (1981) it occupied its niche as an obligate parasite of the coffee plant. This event generated a wealth of interactions with insect larvae and mycoparasites, which use rust spores as a substrate in the highly species-rich Mexican coffee plantations. In nature, interspecific interactions change both in space and time (Thompson, 1994), suggesting a highly variable environment that allows for new interactions among recently associated species. Parasitism is considered a pure form of

antagonistic interaction (Thompson, 1982), where the fitness of the parasite increases while the host's fitness decreases. The coffee rust can be considered as the second trophic level, while the five mycoparasites are the third trophic level, and, argueably, control the coffee rust population. These mycoparasites can colonize rust spores when they are being formed in the sori throughout their development, and up until they are ready for dispersion. Mycoparasites are considered necrotrophic when they kill the host's cells and use the liberated nutrients as substrate during the infection (Heath, 1987). They are considered biotrophic, rather than necrotrophic due to the absence of signs of damage, such as the breakage of uredospores at the onset of the infection. Examples of biotrophic micoparasites are *V. psalliotae* on the urediniospores of *H. vastatrix*, and *V. lecanii* on *U. dianthi* and *Puccinia recondita* (Spencer, 1980; Spencer and Atkey, 1981; Lim and Nik, 1983). The penetration of a fungal host by a biotrophic micoparasite is due both to mechanical and enzymatic mechanisms, the latter under strict control of lytic enzymes (Manocha and Balasubramanian, 1994).

The six mycoparasites reported here should be considered as good biological control agents, because they completely destroy the reproductive structures of the rust, decreasing the number of rust spores that can potentially infect new coffee plants. Fungicides are no longer used in the study region because this disease is of lesser importance, probably due to the activity of these mycoparasites. Detailed studies of these fungi and their interactions will be published elsewhere, as part of a large project on the ecology of mycoparasites and their potential as biological control agents of the coffee rust.

### Acknowledgements

We thank Zelene Durán Barradas for isolating and preserving strains, and Tiburcio Láziz for scanning electron microscope micrographs. Research was supported by CONACYT (4334 to GC), and Instituto de Ecología, A.C. (902-04 to GC, and 902-16 to VRG).

### References

- Alarcón, R. and Carrión, G. (1994). Uso de *Verticillium lecanii* como control biológico de la roya del café. *Fitopatología* 29: 82-85.
- Booth, C. (1971). *The genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, UK.
- Booth, C. and Sutton, B.C. (1984). *Fusarium pallidoroseum* the correct name for *F. semitectum* Auct. *Transactions of the British Mycological Society* 83: 702-704.
- Carrión, G. (1988). Estudio sobre el control biológico de la roya del café mediante *Verticillium lecanii*. *Micología Neotropical Aplicada* 1: 79-86.
- Carrión, G. and Ruiz-Belin, F. (1988). Inoculación en el laboratorio de *Verticillium lecanii* sobre la roya del café (*Hemileia vastatrix*). *Revista Mexicana de Micología* 4: 317-321.

- Carrión, G., Romero, A. and Rico-Gray, V. (1999). Use of *Verticillium lecanii* as biocontrol agent against bean rust (*Uromyces appendiculatus*). *Fitopatología* 34: 214-219.
- Castañeda Ruíz, R.F. and Rodríguez de la Rosa, N. (1988). Notas acerca del género *Fusarium* en Cuba. I. *Revista del Jardín Botánico Nacional de Cuba* 9: 89-96.
- Gams, W. (1971). *Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes)*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Gams, W. (1975). *Cephalosporium*-like hyphomycetes: some tropical species. *Transactions of the British Mycological Society* 64: 389-404.
- Hawksworth, D.L. (1976). *Acremonium zonatum*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria 502.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C. and Pegler, D.N. (1995). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 8th edn. CAB International, Wallingford, UK.
- Heath, M.C. (1987). Evolution of parasitism in the fungi. In: *Evolutionary Biology of the Fungi* (eds. A.D.H. Rayner, C.M. Grasie and D. Moon). Symposium of the British Mycological Society, Cambridge University Press, New York: 149-160.
- Hijwegen, T. (1988). Effect of seventeen fungicidous fungi on sporulation of cucumber powdery mildew. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 94: 185-190.
- Hijwegen, T. (1992). Glycolytic activities in some fungicidous fungi. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 98: 77-80.
- Hijwegen, T. and Dirven, J.A.A.M. (1993). Mycoparasitism of Powdery and Mildews. In: *Biological Control of Foliar and Post-Harvest Diseases* (eds. N.J. Folhema, Y. Kohl and Y. Elad). 10BC WPRS Bulletin 16: 76-81.
- Hijwegen, T. and Verhaar, M.A. (1993). Induced resistance to *Peronospora parasitica* in red cabbage. *Netherlands Journal Plant Pathology* 99: 103-107.
- Hoch, H.C. and Abawi, G.S. (1979). Mycoparasitism of oospores of *Phythium ultimum* by *Fusarium merismoides*. *Mycologia* 71: 621-625.
- Hoog, G.S. de (1974). The genera *Blastobotrys*, *Sporothrix*, *Calcarisporium* and *Calcarisporiella* gen. nov. *Studies in Mycology* 7: 1-84.
- Hoog, G.S. de (1978). Notes on some fungicidous Hyphomycetes and their relatives. *Persoonia* 10: 33-81.
- Isaac, S. (1992). *Fungal-Plant Interaction*. Chapman and Hall, London.
- Lim, T.K. and Nik, W.Z. (1983). Mycoparasitism of the coffee rust pathogen, *Hemileia vastatrix*, by *Verticillium psalliotae* in Malaysia. *Pertanika* 6: 23-25.
- Mabbayad, M.O. and Watson, A.K. (2000). Rejection of *Fusarium pallidroseum* as a biological control agent of *Mimosa invisa* in upland rice. *Biocontrol Science and Technology* 10: 255-265.
- Manocha, M.S. and Balasubramanian, R. (1994). Fungal chitinases: their properties and roles in morphogenesis, mycoparasitism and control of pathogenic fungi. In: *Host Wall Alterations by Parasitic Fungi* (eds. O. Petrini and G.B. Ouellette). APS Press, Saint Paul, Minnesota: 81-90.
- Matsushima, T. (1995). *Matsushima Mycological Memoirs No. 8*. Published by the author, Kobe.
- Rombach, M.C. and Roberts, D.W. (1987). *Calcarisporium ovalisporum*, symbiotic with the insect pathogen *Hirsutella citriformis*. *Mycologia* 79: 153-155.
- Romero, A. and Carrión, G. (1995). Patogenicidad de *Verticillium lecanii* sobre la roya del frijol en condiciones de invernadero. *Fitopatología* 30: 34-37.
- Samson, R.A., Evans, H.C. and Latgé, J-P. (1988). *Atlas of Entomopathogenic Fungi*. Springer-Verlag, Berlin.

- Schieber, E. and Zentmyer, G.A. (1984). Distribution and spread of coffee rust in Latin America. In: *Coffee Rust in the Americas* (ed. R.H. Fulton). American Phytopathological Society, Saint Paul, Minnesota: 1-14.
- Siddiqi, M.A. (1964). Fungus flora of *Coffea arabica* in Nyasaland. *Transactions of the British Mycological Society* 47: 281-284.
- Spencer, D.M. (1980). Parasitism of carnation rust (*Uromyces dianthi*) by *Verticillium lecanii*. *Transactions of the British Mycological Society* 74: 191-194.
- Spencer, D.M. and Atkey, P.T. (1981). Parasitic effects of *Verticillium lecanii* on two rust fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 77: 535-542.
- Steyaert, R.L. (1930). *Cladosporium hemileiae* n. spec. un parasite de l'*Hemileia vastatrix* Berk. et Br. *Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique* 63: 46-49.
- Thompson, J.N. (1982). *Interaction and Coevolution*. John Wiley and Sons, New York.
- Thompson, J.N. (1994). *The Coevolutionary Process*. University of Chicago Press, Chicago.
- Verhaar, M.A. Hijwegen, T. and Zadocks, J.C. (1998). Selection of *Verticillium lecanii* isolates with high potential for biocontrol of cucumber powdery mildew by means of components analysis at different humidity regimes. *Biocontrol Science and Technology* 8: 465-477.

(Received 21 April 2002; accepted 3 May 2002)

## CAPÍTULO 2

### FENOLOGÍA DEL CAFETO E INCIDENCIA Y DAÑO DE LA ROYA

#### INTRODUCCIÓN

La fenología de la roya ha sido bien estudiada por los principales países productores de café, la mayor esporulación se presenta en los meses de menor precipitación, ya que la humedad relativa baja es necesaria para la esporulación y dispersión de las esporas (Becker, 1979; Velasco, 1979; Muthappa, 1980; Pedro Jr., 1983). La roya del café, en todos los países donde ha sido evaluada, se ha caracterizado por ser una epidemia (Wellman, 1972; Becker, 1984; Schieber y Zentmyer, 1984). El ciclo de infección de un parásito como *Hemileia vastatrix* tiene las siguientes tres fases (y subfases) resumidas por Hirst y Schein (1965): esporulación (producción de esporóforos, esporas y su maduración), diseminación (liberación de esporas, dispersión, llegada a nuevo hospedero) e infección (germinación, penetración y colonización). En las royas, así como en muchos otros parásitos, sus ciclos están caracterizados por ser recurrentes, de manera que las nuevas unidades de infección (esporas) tienen la capacidad de repetir este ciclo (cadena de infección), produciendo nuevas generaciones que a su vez producirán otras, así una epidemia es un proceso policíclico (Zadock y Schein, 1979).

Uno de los síntomas característicos de la roya es provocar una fuerte defoliación en su hospedero, ya que su micelio obstruye directamente el floema y acelera la abscisión de las hojas (Gopalkrishnan, 1951). En India, la roya provocó el 67% de la defoliación en la década de 1960, en Brasil se registró el 71% de defoliación en la década de 1970 (Chinnappa y Sreenivasan, 1969; Cadena-Gómez y Buriticá-Céspedes, 1980). Esto significa que la planta no tiene la energía necesaria para producir posteriormente los frutos suficientes, afectando la producción de café. En México, en los cafetales de la región de

Coatepec, se realizaron aspersiones experimentales de *L. lecanii* aislado del mismo lugar y se registró una incidencia de de roya de 9% en los seis meses de mayor esporulación (noviembre a abril) y una defoliación de 30% (Carrión, 1988).

Seis especies de hongos pueden encontrarse parasitando la roya del café (Cap. 1). El conocimiento de la presencia de más de una especie de micoparásito sobre la roya del café en condiciones naturales, nos hace plantearnos las siguientes preguntas: ¿cómo varía la infección de la roya en el tiempo?, ¿cuál es el daño real provocado por la roya? Si consideramos las pústulas en diferentes edades ¿se puede detectar alguna interrupción en el ciclo de re-infecciones? El objetivo de esta parte del trabajo fue el registro detallado de las fluctuaciones de la población de la roya en dos cafetales ubicados en diferentes zonas de la región cafetalera más productiva del estado de Veracruz. Todos los datos obtenidos sobre la roya del café en este capítulo sirven de base para el manejo de los porcentajes de los parámetros evaluados con los micoparásitos en el capítulo 3 (porcentaje de pústulas con micoparásitos, porcentaje de micoparasitismo en tres categorías de edad de las pústulas e intensidad del micoparasitismo). La razón de evaluar estos cafetales con diferentes condiciones ambientales fue encontrar un patrón de comportamiento en la interacción café-roya-micoparásitos. Para contestar la preguntas planteadas, los parámetros evaluados fueron el número de hojas sanas (fenología del café) y enfermas en ramas de cafetos seleccionados al azar para obtener los porcentajes de la incidencia de la roya, el número de pústulas de roya/hoja enferma, la intensidad del daño sobre las hojas de café (puede haber daño en muchas hojas pero con baja intensidad, o lo puede haber en pocas hojas pero con alta intensidad) y la frecuencia de las pústulas en tres diferentes categorías de edad (jóvenes, maduras y viejas).

## SELECCIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

Se seleccionaron dos áreas de estudio en la porción central del estado de Veracruz: Xico y Tizal, cada una de dos hectáreas. El clima de las dos localidades es diferente aunque ambas están consideradas en general como semicálido húmedo (García, 1981). El cafetal de Xico está a 1300 m.s.n.m., la vegetación original era bosque mesófilo de montaña y el clima es (A)C(m)w"a (i')g (Gómez, 1991). La precipitación anual en 1997 fue de 2142 mm, y 2225 mm en 1998, y 698 mm de enero-agosto de 1999 (Fig. 1). El cafetal del Tizal se localiza a 700 m.s.n.m., la vegetación original era un ecotono de selva baja caducifolia y encinar, y el clima de la localidad es (A)C(m)a(i')g. La precipitación anual en 1997 fue de 748 mm, y 1148 mm en 1998, y 735 mm de enero-agosto en 1999 (Fig. 2). La diferencia en altitud y temperatura promedio entre las dos localidades es de 600 m y 4° C, ya que en la zona de Xico la temperatura es más baja que en el cafetal del Tizal durante el invierno. El periodo de alta evapotranspiración es de marzo-mayo y es mayor en la localidad de Tizal que en Xico (Figs. 3 a 5).

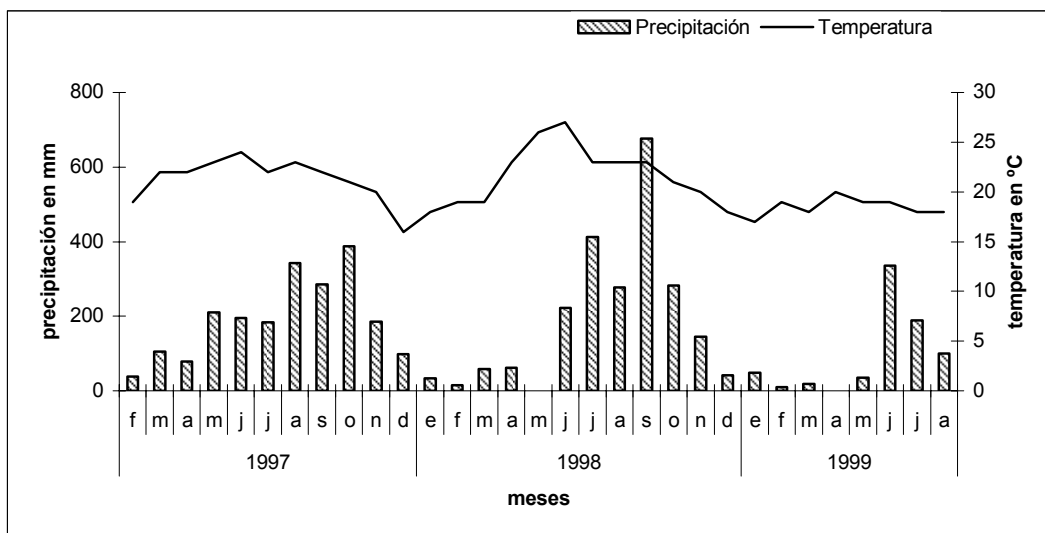


Fig. 1. Precipitación y temperatura de la estación meteorológica de Teocelo.



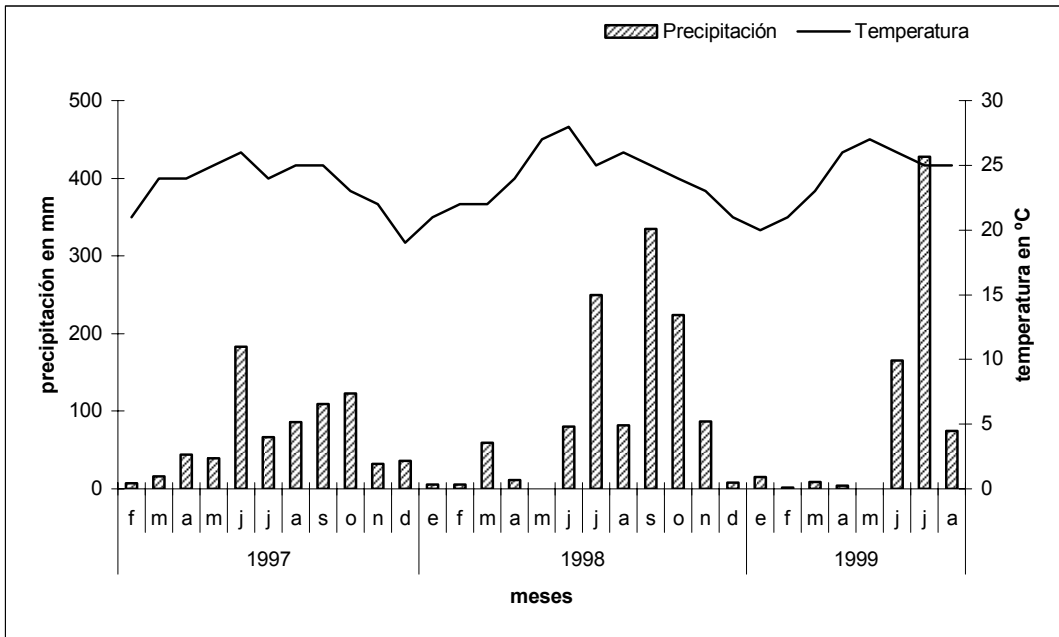


Fig. 2. Precipitación y temperatura de la estación meteorológica de Cerro Gordo.

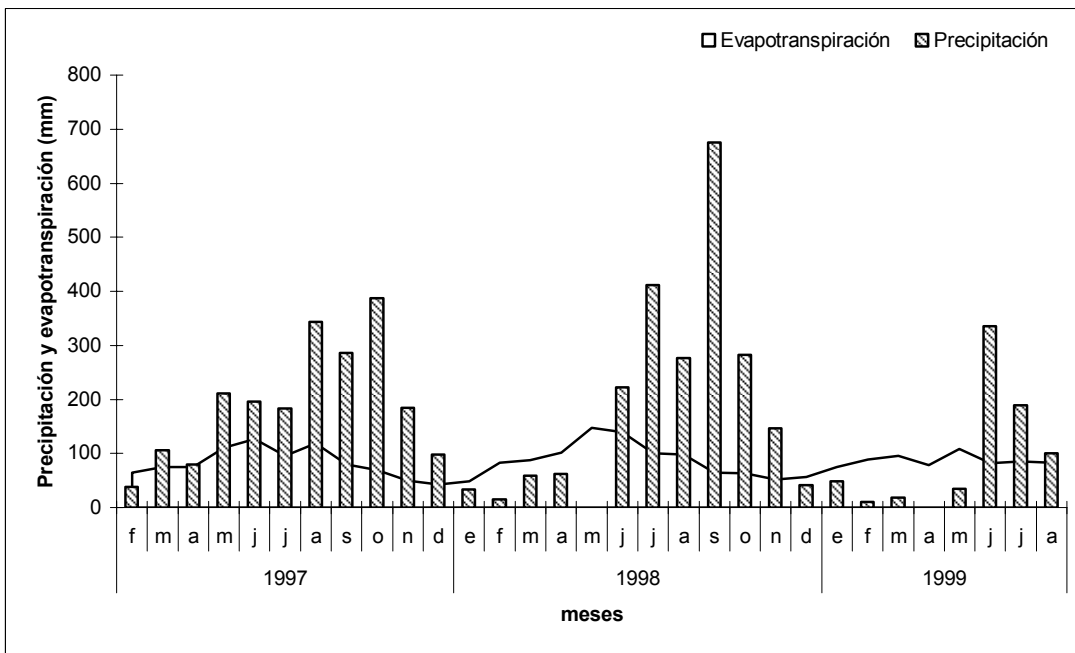


Fig. 3. Evapotranspiración y precipitación de la estación meteorológica de Teocelo.

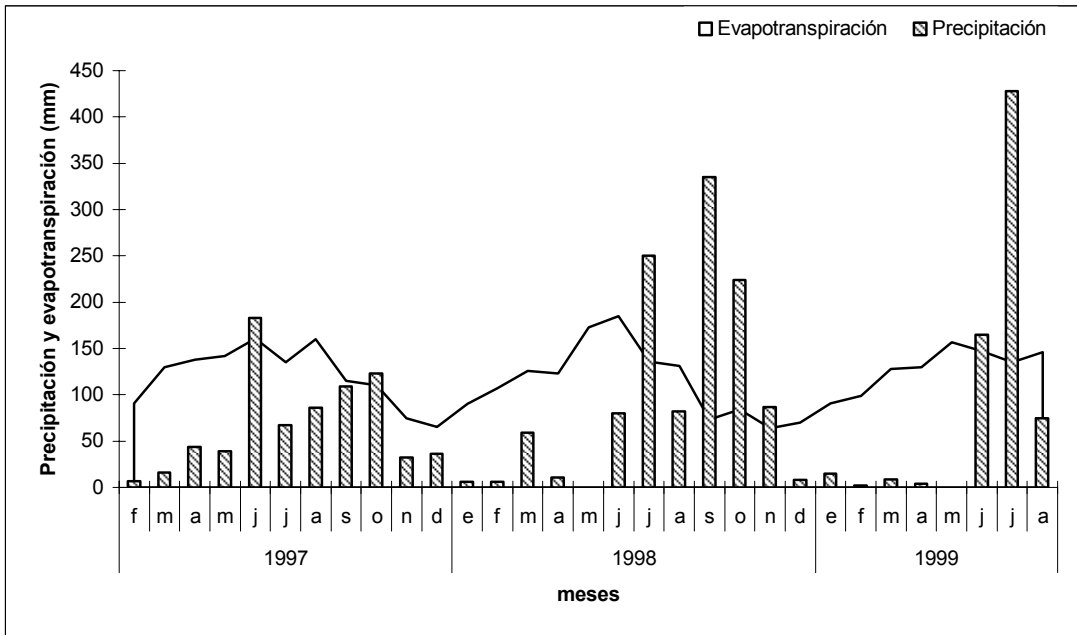


Fig. 4. Evapotranspiración y precipitación de la estación meteorológica de Cerro Gordo.

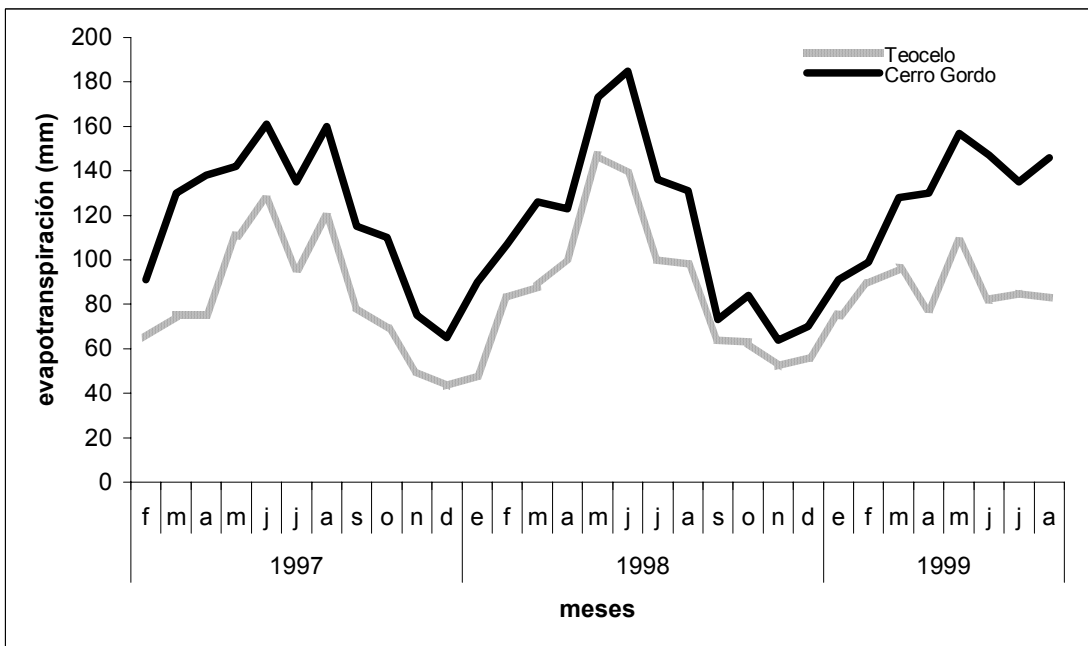


Fig. 5. Comparación de la evapotranspiración de las estaciones meteorológicas de Teocelo y Cerro Gordo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Selección y marcaje de cafetos.** Las evaluaciones se realizaron mensualmente desde febrero de 1997 hasta agosto de 1999. En cada cafetal fueron seleccionados al azar cafetos de la variedad Bourbon (N = 10) y en cada cafeto se marcaron con etiquetas de plástico cinco ramas de la parte media del arbusto (N = 50), debido a que en esta parte es donde se encuentra la mayor cantidad de roya (Becker, 1979).

**Toma de datos de la roya del cafeto.** Para cada rama seleccionada, se tomaron mensualmente los siguientes datos: número de hojas y su condición: sana (S) o enferma (E), y con estos datos se obtuvo la fenología del cafeto y la incidencia de la roya:

$$\% \text{ incidencia de la roya} = \text{hojas enfermas} / \text{total de hojas} \cdot 100.$$

La intensidad de la roya sobre las hojas fue evaluada usando una escala de daño basada en la fracción de la hoja ocupada por las pústulas (James, 1983). 0: toda la hoja sana, 1= 0.1 hoja enferma, 2= 0.25, 3= 0.50, 4= 0.75, 5=1. El área foliar enferma (AFE) con roya del cafeto se obtuvo de la suma de los productos del número de hojas en los cinco niveles de la escala de daño por la fracción del área dañada.

$$\% \text{ AFE} = N_1 \cdot 0.1 + N_2 \cdot 0.25 + N_3 \cdot 0.50 + N_4 \cdot 0.75 + N_5 \cdot 1 / \text{AFT} \cdot 100$$

donde  $N_{1-5}$  = no. de hojas enfermas en diferente escala de daño.

Para obtener la fracción de área dañada y el área foliar total, se obtuvo el área foliar promedio (AFP) de las hojas de cada cafetal, el cual se estimó midiendo el área de 100 hojas sanas usando un medidor de áreas Li-Cor modelo 3100. Se utilizaron hojas colectadas en la época de mayor crecimiento (julio), debido a que aunque se forman hojas en primavera, éstas tienen su mayor tamaño hasta la época de lluvias (verano).

$$\text{AFT} = \text{No. total de hojas evaluadas} \times \text{AFP}$$

Para cada hoja enferma se anotó el número y la edad de las pústulas. Las pústulas jóvenes se distinguieron por su coloración amarillo claro, cuando los soros empiezan a formarse y, por lo tanto, no hay exceso de esporas en la pústula. Las pústulas maduras se caracterizan por tener los soros amarillos pulverulentos por la gran cantidad de esporas, en tanto que en las viejas se notan cuando parte o todo el tejido que abarca la pústula se encuentra necrosado. Con los datos obtenidos, se obtuvo la tabla de edades de las pústulas de la roya (joven, madura, vieja).

**Análisis de datos.** Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico Statistica (StatSoft, Inc. 2000). Debido a la ausencia de la roya en el cafetal de Tizal de junio de 1998 a febrero de 1999, se compararon los datos de los diferentes parámetros obtenidos en los dos cafetales en el período febrero 1997-mayo de 1998. En el cafetal de Xico se registró la roya del café en todo el período de estudio (febrero 1997-agosto 1999) por lo que fue factible comparar un período infectivo de la roya contra otro (agosto-julio 1997-1998 y 1998-1999). Se aplicó una ANOVA para verificar el efecto de la diferencia en clima sobre la fenología del café en los cafetales estudiados y sobre la presencia de la roya en los cafetales durante los meses de estudio sobre (a) número total de hojas rama<sup>-1</sup> café<sup>-1</sup> mes<sup>-1</sup>, (b) área foliar total, (c) número de hojas enfermas rama<sup>-1</sup> café<sup>-1</sup> mes<sup>-1</sup>, (d) número total de pústulas, (e) no. de pústulas por categoría de edad (Tabla 1 del apéndice). Con la prueba de diferencia de medias de Tukey se analizó (a) número total de hojas rama<sup>-1</sup> café<sup>-1</sup> mes<sup>-1</sup>, (b) número de hojas enfermas rama<sup>-1</sup> café<sup>-1</sup> mes<sup>-1</sup>, (c) el área foliar total (Tablas 2 y 3 del apéndice) y (d) el número de pústulas por categoría de edad. Con la prueba de *t* se analizaron (a) para cada localidad el número de hojas por mes en dos períodos de crecimiento (agosto-julio de 1997-1998 y 1998-1999), (b) el número de hojas entre los dos cafetales estudiados en el período febrero 1997-mayo 1998, (c) sólo para la localidad de

Xico el total de hojas enfermas en dos períodos de esporulación (agosto-julio, 1997-1998 y 1998-1999), (d) el número de hojas enfermas de los cafetos evaluados entre las dos localidades, (e) el tamaño de las hojas entre las localidades, (f) el número de hojas en diferente grado de daño entre localidades, (g) para la localidad de Xico se comparó el número de hojas en diferente grado de daño entre los períodos (agosto-julio de 1997-1998 y 1998-1999), (h) el área foliar dañada por la roya entre las localidades en el período febrero 1997-mayo 1998, (i) el área foliar dañada en la localidad de Xico entre los períodos agosto-julio de 1997-1998 y 1998-1999, (j) el número de pústulas entre los cafetales de las dos localidades en el período febrero 1997-mayo 1998, (k) para Xico los períodos agosto-julio de 1997-1998 y 1998-1999, (l) el número de pústulas por categoría en el período febrero 1997-mayo 1998 entre las localidades. Todos los análisis fueron realizados a una probabilidad  $P = 0.05$  de confianza.

## RESULTADOS

**Fenología de los cafetos.** La fenología de los cafetos está afectada por las estaciones del año y las diferencias entre localidades en altitud y clima. Se encontraron diferencias significativas entre los cafetales en el número de hojas por rama en los meses de evaluación (ANOVA Wilks lambda = 0.212,  $F_{31, 68} = 8.121$ ,  $P = 0.000$ ). El mayor número de hojas por rama se presentó para Xico en los meses de julio de 1998 y 1999 ( $37 \pm 4$ ) y para Tizal en junio y julio de 1999 ( $24 \pm 3$ ) (Figs. 6 y 7). La prueba de Tukey indicó diferencias significativas entre el número de hojas entre los cafetales desde el mes de junio de 1997 hasta de 1999. En ambos cafetales el menor número de hojas se registró en 1998, para Xico en marzo ( $19 \pm 2$ ) y para Tizal en marzo y abril ( $7 \pm 1$ ).

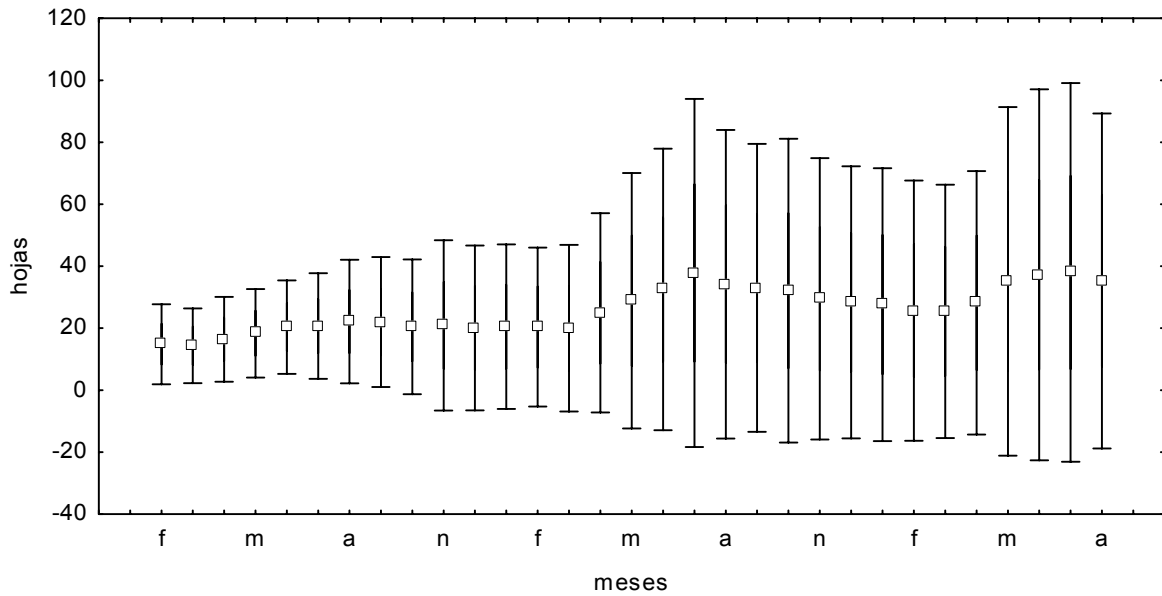


Fig. 6. Número promedio de hojas por rama ( $O \pm D.E.$ ) en el cafetal de Xico ( $N = 50$  ramas).

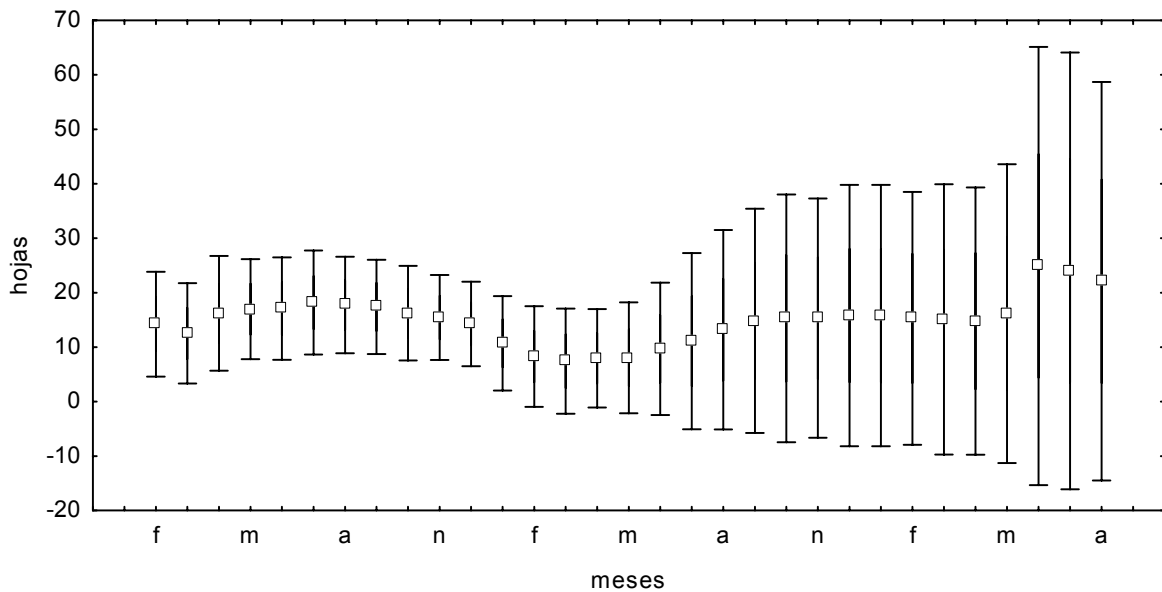


Fig. 7. Número promedio de hojas por rama ( $O \pm D.E.$ ) en el cafetal de Tizal ( $N = 50$  ramas).

En Xico se registró significativamente más hojas por cafetos en el período 2 (agosto-julio de 1998-1999) que en el 1 (período 1:  $1209 \pm 291$  hojas/10 cafetos, período 2:  $1559 \pm 217$  hojas/10 cafetos;  $t = 3.32$ ,  $g.l = 22$ ,  $P = 0.003$ ). Para Tizal también se registró

mayor número de hojas en el período 2 que en 1 (período 1:  $601 \pm 197$  hojas, período 2:  $835 \pm 184$  hojas;  $t = 2.98$ , g.l. = 22,  $P = 0.006$ ). En el cafetal de Tizal fue notorio que los cafetos sufrieron la carencia de agua en abril y mayo de 1998. Las hojas formadas en febrero y marzo alcanzaron menor tamaño que las que se formaron con las lluvias de abril y mayo del mismo año.

El análisis del número de hojas entre los dos cafetales en el período febrero 1997- mayo 1998, en el cual, como veremos más adelante se registró roya del cafeto, se encontró diferencia significativa por el mayor número de hojas en Xico ( $1015 \pm 176$ ) que en Tizal ( $683 \pm 196$ ;  $t = 5.02$ , g.l. = 30,  $P = 0.0000$ ).

**Área foliar.** Desde el principio de las evaluaciones entre los cafetales estudiados hubo diferencias significativas en el área foliar por rama (ANOVA Wilks lambda = 0.197  $F_{31,68} = 8.919$ ,  $P = 0.000$ ; Xico:  $1111 \pm 768$  cm<sup>2</sup>, Tizal:  $554 \pm 319$  cm<sup>2</sup>,  $N = 50$ ), con excepción del mes de abril de 1997 ( $t = -1.91$ , g.l. = 98,  $P = 0.05$ ; Xico:  $701 \pm 298$  cm<sup>2</sup>, Tizal:  $604 \pm 200$  cm<sup>2</sup>). Ambos cafetales tuvieron una consecutiva reducción del área foliar que inició en agosto, se incrementó entre octubre y noviembre y terminó en marzo (Figs. 8 y 9).

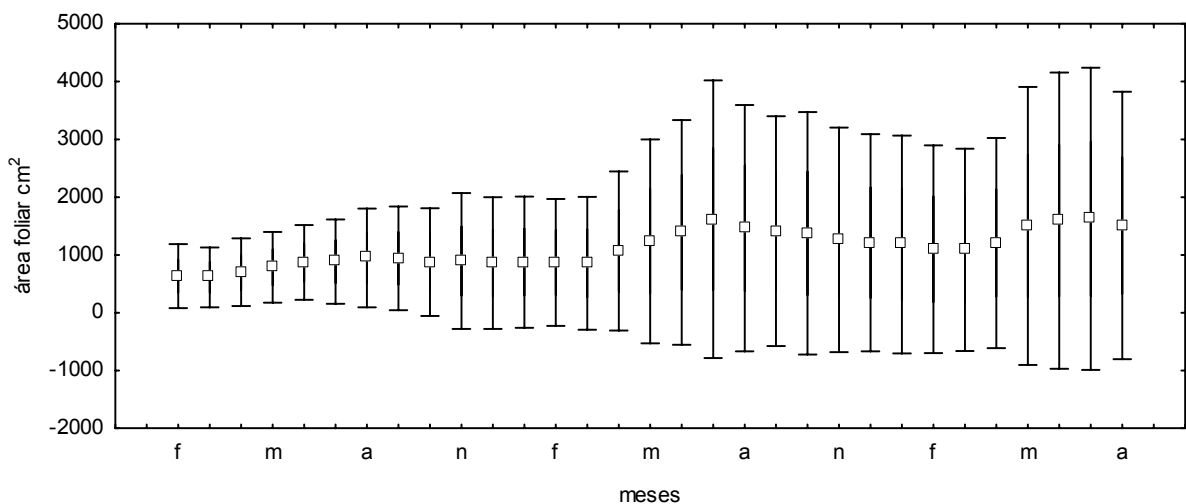


Fig. 8. Área foliar promedio por rama ( $O \pm D.E.$ ) en el cafetal de Xico ( $N = 50$  ramas).

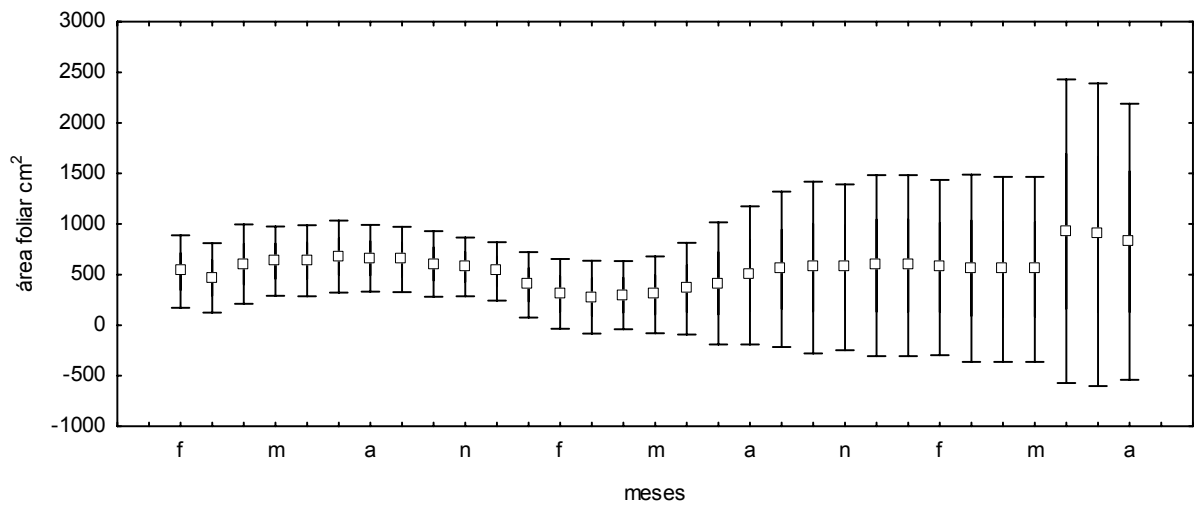


Fig. 9. Área foliar promedio por rama (O ± D.E.) en el cafetal de Tizal (N = 50 ramas).

El tamaño promedio de las hojas del cafetal de Xico fue significativamente mayor al de las hojas del Tizal (Xico:  $42.8 \pm 13.3 \text{ cm}^2$ , Tizal:  $37.3 \pm 13.5 \text{ cm}^2$ , N = 100;  $t = 2.8731$ , g.l. = 99, P = 0.004). El mayor tamaño de las hojas de Xico, aunado a la mayor cantidad de hojas hace un área foliar muy grande con respecto a la del cafetal de Tizal.

**Incidencia de la roya del cafeto.** La roya se encontró en los dos cafetales al principio de la evaluación; en el cafetal de Xico la presencia de la roya se registró durante los 31 monitoreos (febrero de 1997-agosto de 1999), pero en el cafetal de Tizal no se presentó en 13 de los 31 monitoreos.

Se encontró diferencias significativas en el número de hojas enfermas/rama a lo largo del tiempo de evaluación ( $F_{1, 11} = 35.49$ , P = 0.0005), ya que la roya tiene un período de mayor esporulación entre octubre y marzo en la época de menor precipitación del año (Figs.1 a 5). El análisis de comparaciones múltiples nos indicó que enero presentó mayor número de hojas enfermas/rama ( $2.9 \pm 3$ ).



En Xico no se encontraron diferencias significativas en el número de hojas enfermas por rama ( $F_{1, 11} = 0.00$ ,  $P = 1.000$ ;  $1.5 \pm 2$ ,  $N = 50$ ) entre los períodos (1: agosto-julio, 1997-1998; 2: 1998-1999). Si tomamos en cuenta el total de hojas enfermas por mes en estos mismos períodos, no hubo diferencias marginalmente significativas entre ellos ( $t = 2.0730$ ,  $g.l.= 22$ ,  $P = 0.05$ ; período 1:  $85 \pm 34$ , período 2:  $137 \pm 79$ ). Tampoco se encontró diferencias significativas entre los cafetales considerando el número de hojas enfermas por mes en el período febrero 1997-mayo 1998 ( $t = 1.58$ ,  $g.l.=30$ ,  $P = 0.123$ ; Xico:  $73 \pm 38$ , Tizal:  $109 \pm 81$ ).

El porcentaje de hojas con roya en el período de mayor esporulación en las localidades estudiadas fue diferente, siendo mayor el porcentaje de incidencia de la roya en el cafetal de Tizal. Si sólo se toman los datos de febrero 1997-mayo 1998, período en que hubo roya en ambos cafetales, entonces Xico presentó 7% y el Tizal 16% (Fig. 10).

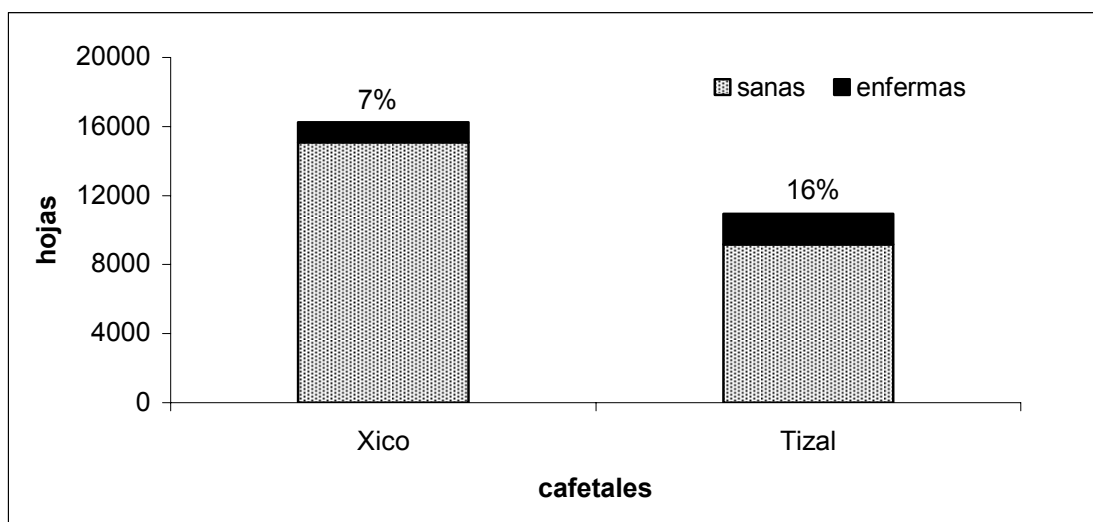


Fig. 10. Porcentaje total de hojas con roya en el período febrero/1998-mayo/1999 en los cafetales de Xico y el Tizal.

En el cafetal de Xico el mayor porcentaje de roya (ligeramente arriba del 10%) se encontró en los períodos octubre-marzo de 1997-1998 y 1998-1999, y en febrero 1999

alcanzó 20% de incidencia (Fig.11). De abril a septiembre de ambos periodos (1997 y 1998) la incidencia de la roya bajó y se presentó en valores menores al 10%.

En el cafetal de Tizal en febrero/1997 se registró 23% de incidencia de roya y disminuyó en abril a 12%; de mayo-septiembre la incidencia fue baja (3-6%). Desde octubre hasta marzo el porcentaje de la incidencia de la roya se incrementó nuevamente (19-34%), presentando los valores más altos en enero-febrero (50-47% respectivamente). En abril/1998 se registró 13% y en mayo el 3% (Fig. 11). Posteriormente, la roya no se encontró en los cafetos marcados de junio-febrero/1998-1999, y en marzo-abril/1999 se encontró en muy bajos porcentajes (0.3-0.1%, respectivamente).

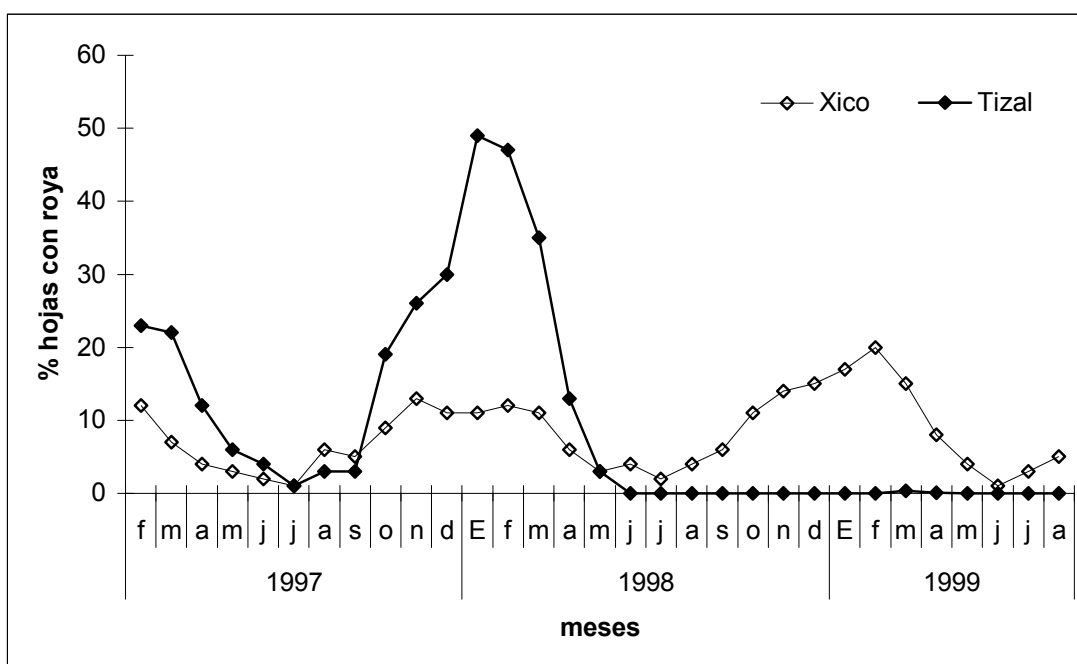


Fig. 11. Porcentaje de hojas con roya en los cafetales de Xico y el Tizal.

**Intensidad de la roya del cafeto.** La mayor parte de las hojas con roya se encontraron en el grado de daño 1 y 2 en ambas localidades (Fig. 12). En el cafetal el Tizal la intensidad de la roya fue mayor que en Xico. Al comparar el número de hojas con el mismo grado de

daño entre las localidades se encontraron diferencias significativas (1:  $t= 0.326$ , g.l.= 22,  $P = 0.747$ ; 2:  $t= - 0.807$ , g.l.= 22,  $P = 0.428$ ; 3:  $t= 1. 151$ , g.l.= 22,  $P = 0.262$ ; 4:  $t= 1.689$ , g.l.= 22,  $P = 0.105$ ).

Si comparamos el porcentaje de hojas en la escala de daño del período de esporulación de la roya febrero 1997-mayo 1998 de los dos cafetales hubo mayor porcentaje de hojas con daño 2-5 en el Tizal y en Xico sólo hojas con daño de 1-3 (Fig. 13).

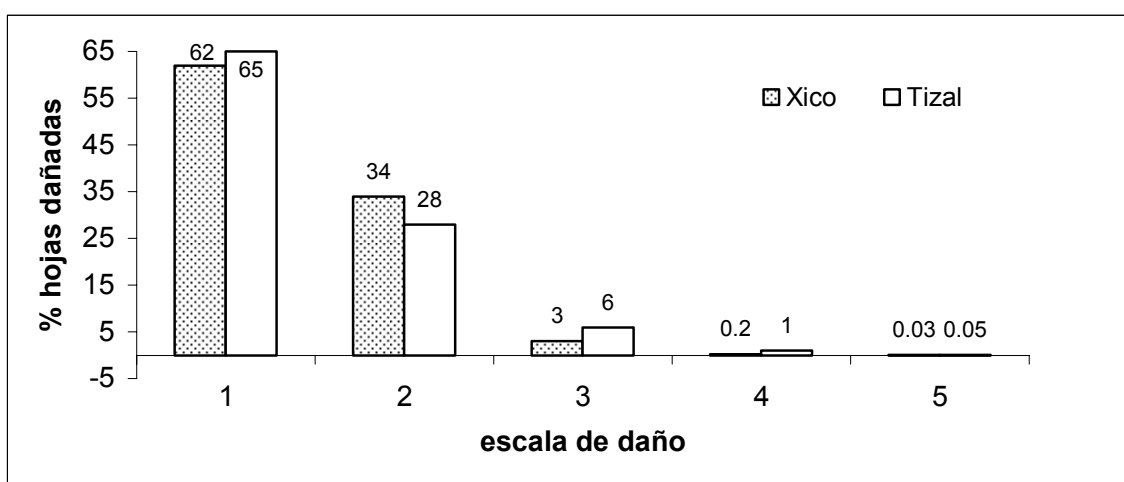


Fig. 12. Porcentaje de hojas con roya de los cafetales de Xico y Tizal en la escala de daño.

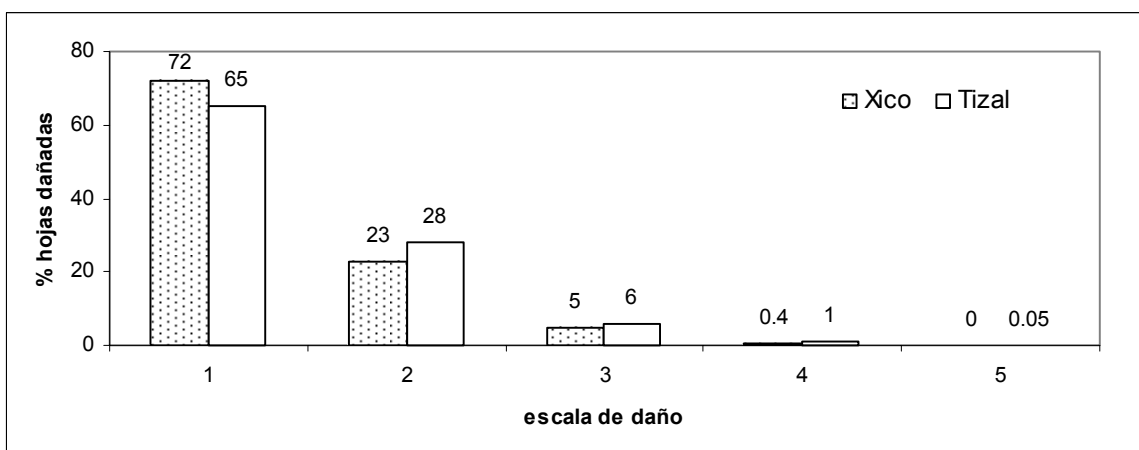


Fig. 13. Comparación del porcentaje de hojas en diferente grado de daño del período febrero/1997-mayo/1998 en los cafetales de Xico y el Tizal.

En el cafetal de Xico se pudieron comparar dos períodos de daño de roya; 1: agosto 1997-julio1998; 2: agosto1998-julio1999. En el segundo año hubo más hojas con mayor daño (Fig. 14). Sólo se encontró diferencia significativa en el número de hojas en grado de daño 2 entre los períodos de esta localidad (1:  $t = 1.511$ , g.l.= 22,  $P = 0.144$ ; 2:  $t = 2.868$ , g.l.= 22,  $P = 0.008$ ; 3:  $t = 0.535$ , g.l.= 22,  $P = 0.597$ ; 4:  $t = 1.914$ , g.l.= 22,  $P = 0.686$ ; 5:  $t = 1.00$ , g.l.= 22,  $P = 0.328$ ).

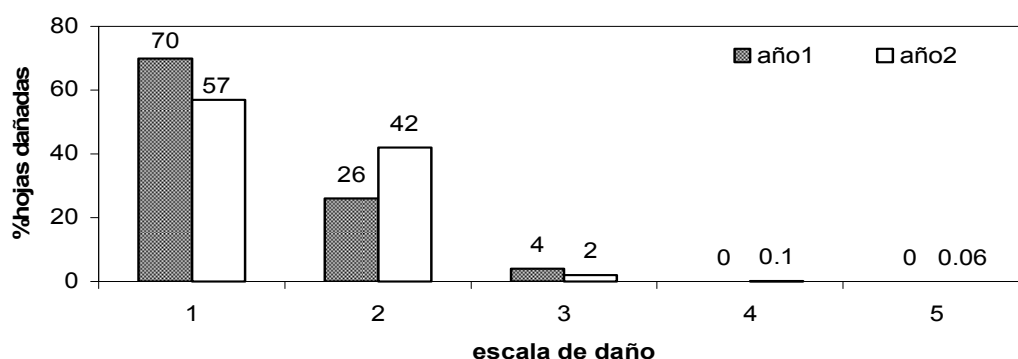


Fig.14. Comparación del porcentaje de hojas en diferente grado de daño en el cafetal de Xico, separados por años de observación. año1: agosto 1997-julio 1998; año2: agosto 1998-julio 1999.

Al convertir el daño de las hojas a área foliar dañada, el daño es muy pequeño (Fig. 15-16). No se encontró diferencia significativa entre el área foliar dañada por la roya entre las localidades en el período febrero-mayo ( $t = 1.209$ , g.l. = 30,  $P = 0.235$ ; Tizal:  $692 \pm 626$ , Xico:  $484 \pm 278$ ). En Xico sí se encontró diferencia significativa entre los períodos ( $t = -2.337$ , g.l. = 22,  $P = 0.028$ ; período 1:  $561 \pm 247 \text{ cm}^2$ ; período 2:  $1033 \pm 654 \text{ cm}^2$ ). En Tizal el porcentaje de área foliar dañada es menor al 10% en la mayor parte de la evaluación, sólo en enero y febrero/1998 alcanzó 22 y 16 % respectivamente. En Xico en el período de mayor esporulación (octubre-marzo/1997-1998) la roya se mantuvo entre 1-2 %, en el

siguiente período (1998-1999) la roya alcanzó 4 y 5 % en enero y febrero, respectivamente (Fig.17).

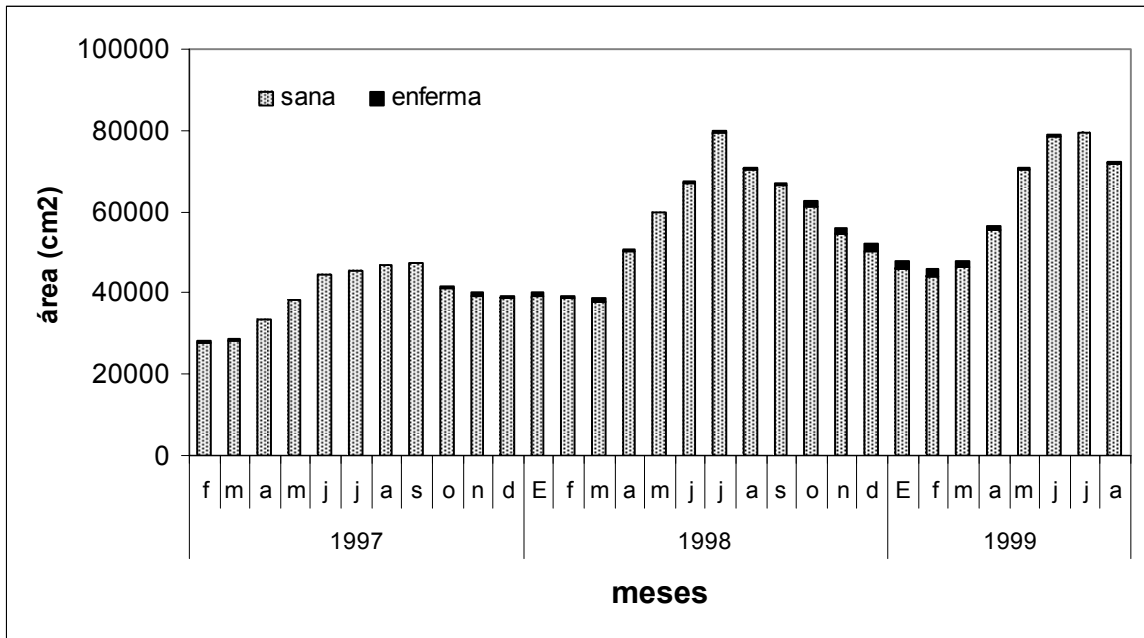


Fig. 15. Área foliar sana y enferma con roya en el cafetal de Xico.

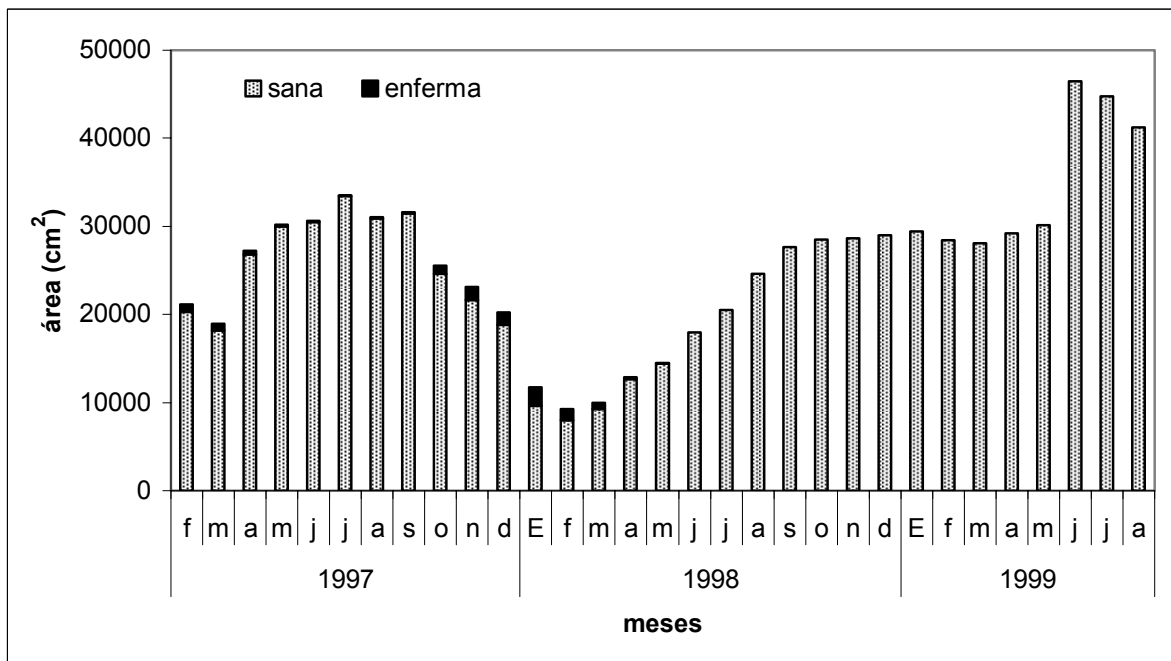


Fig. 16. Área foliar sana y enferma con roya en el cafetal del Tizal.

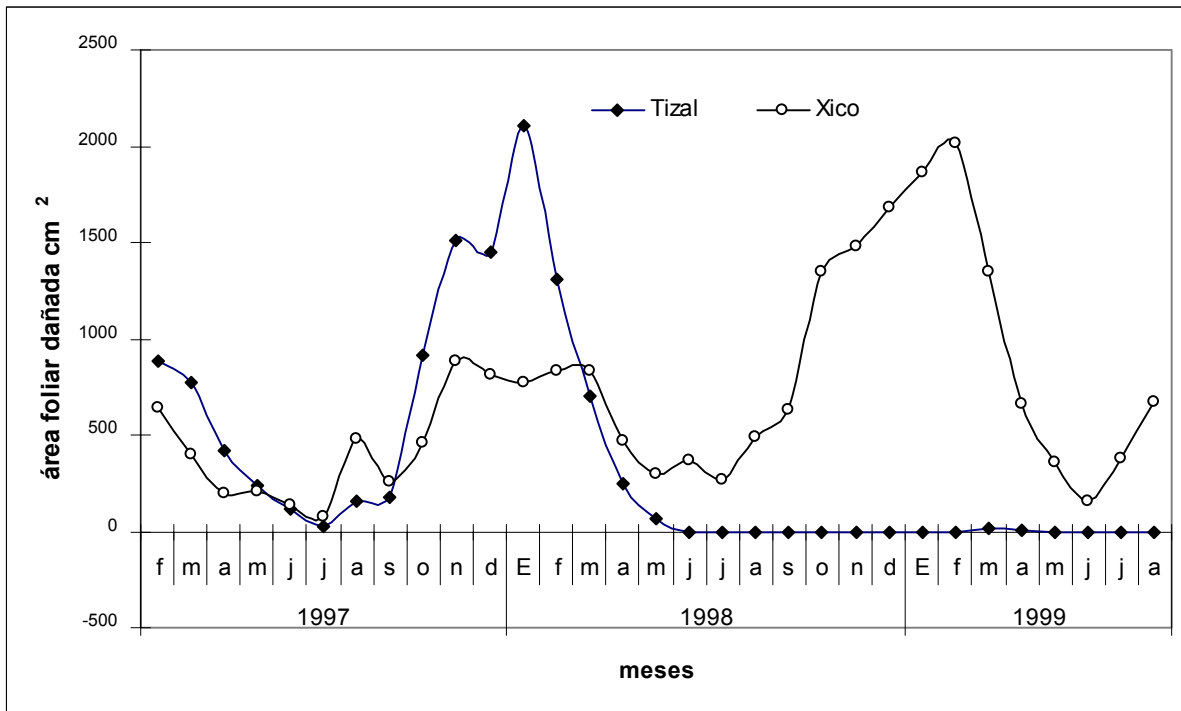


Fig. 17. Comparación del área foliar enferma con roya en los cafetales Xico y Tizal.

**Número de pústulas de la roya del cafeto.** Se encontró diferencia significativa en el número de pústulas durante los meses de evaluación ( $F = 4.07$ , g.l. = 11,  $P = 0.0002$ ). La prueba de Tukey indicó que en enero y febrero se registró el mayor número de pústulas. En el período febrero-mayo, en el cual se encontró roya en los dos cafetales, se comparó el número de pústulas entre Xico y Tizal; aunque el mayor número de pústulas se registró en el Tizal, no se encontró diferencia significativa ( $t = 1.659$ , g.l. = 30,  $P = 0.107$ ; Xico:  $183 \pm 122$ , Tizal:  $339 \pm 355$ ). En el cafetal de Xico al comparar el número de pústulas entre los períodos agosto-julio /1997-1998 y 1998-1999 no hubo diferencia significativa ( $t = 1.685$ , g.l. = 22,  $P = 0.105$ ; período 1:  $218 \pm 108$ , período 2:  $337 \pm 219$ ) (Fig. 18). La roya presentó la menor esporulación en abril-junio para Xico y mayo-julio para el Tizal.

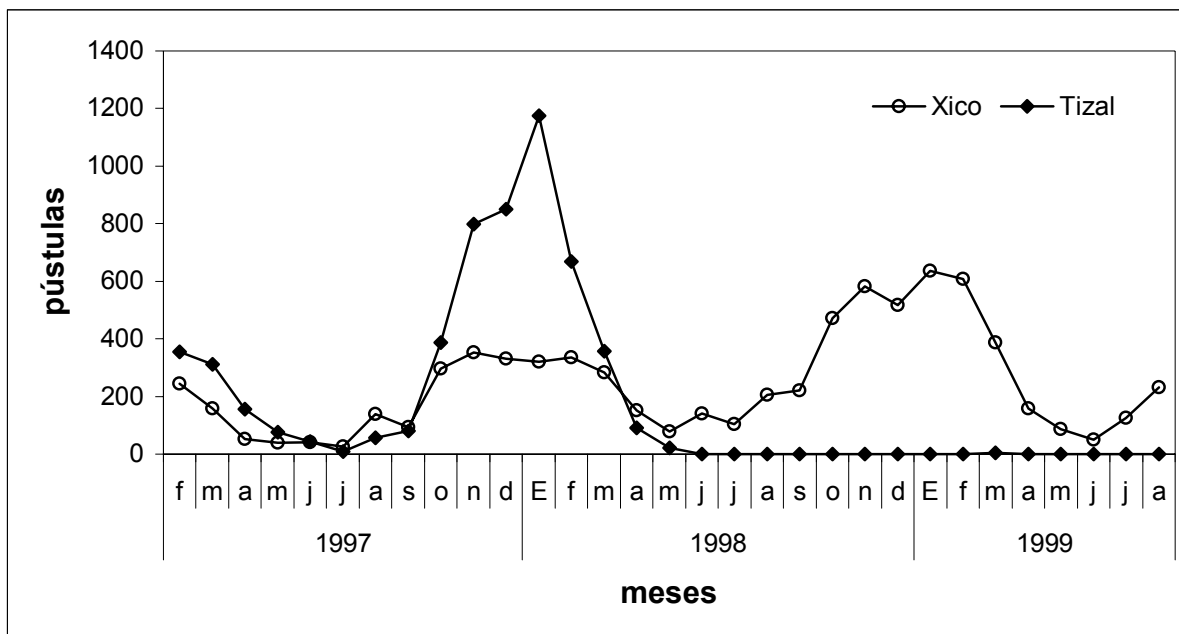


Fig. 18. Comparación del número de pústulas en los cafetales Xico y Tizal.

**Proporción de edad de las pústulas de la roya del café.** Al separar las pústulas por categorías de edades (jóvenes, maduras, viejas), se observó el inicio de la esporulación cuando predominaron las pústulas jóvenes, para Xico en agosto–noviembre en el primer período y octubre-diciembre en el segundo período; y el final de la esporulación cuando predominaron las pústulas viejas, enero-mayo para ambos períodos (Fig. 19 y 20).

En el cafetal de Xico se pudo observar el paso gradual de las pústulas de una categoría a otra (Fig. 19). La epidemia como tal inició en agosto, registrándose la mayor esporulación en octubre. En el cafetal del Tizal, sólo en noviembre se observó mayor número de pústulas jóvenes (Fig. 20).

Se encontraron diferencias significativas en el número de pústulas por categoría de edad ( $F = 4.26$ , g.l. = 2,  $P = 0.018$ ) entre los cafetales en el período febrero-mayo/1997-1998. Las diferencias significativas no se encontraron entre las pústulas jóvenes ( $t = 1.180$ , g.l. = 22,  $P = 0.250$ ; Xico:  $69 \pm 53$ , Tizal:  $121 \pm 145$ ) y viejas ( $t = 0.282$ , g.l. = 22,  $P =$

0.780; Xico:  $89 \pm 54$ , Tizal:  $81 \pm 76$ ), sino en el número de pústulas maduras ( $t = 1.827$ ,  $P = 0.081$ ; Xico:  $60 \pm 34$ , Tizal:  $170 \pm 205$ ).

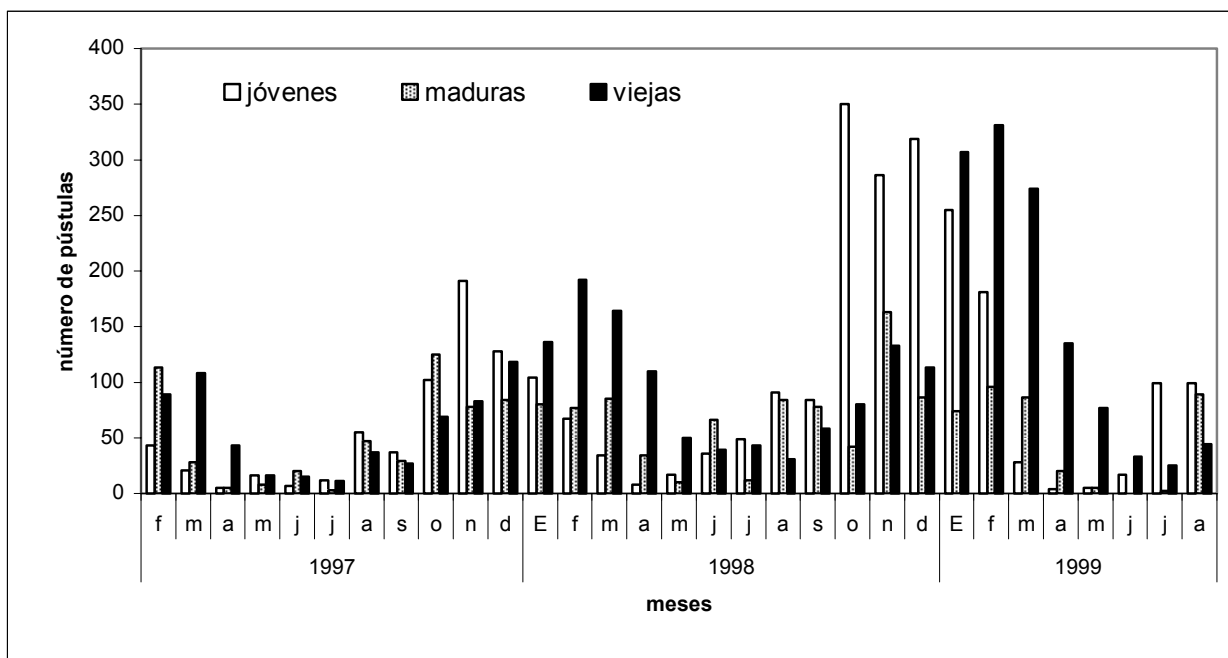


Fig. 19. Distribución de frecuencia de distinta edad de las pústulas de la roya del cafeto en el cafetal de Xico de febrero/1997-agosto/1999, N = 50 ramas.

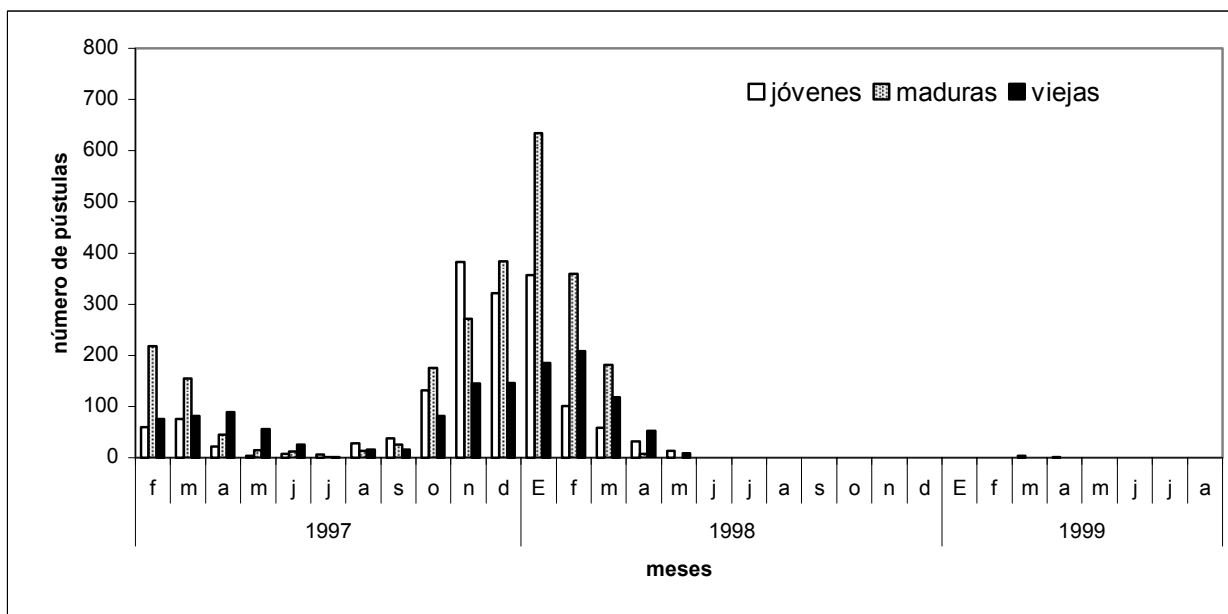


Fig. 20. Edad de las pústulas de la roya del cafeto en el cafetal del Tizal de febrero/1997-agosto/1999, N = 50 ramas.



## DISCUSIÓN

El número de hojas en los cafetos evaluados disminuyó en febrero y marzo debido a la caída natural de las hojas, lo que además coincide con el final de la cosecha y con la mayor esporulación de la roya. Probablemente la roya no se encontró en el cafetal del Tizal de junio-febrero de 1998-1999 debido a la influencia de la alta temperatura y baja precipitación de ese año, además de incendios forestales en la región, lo cual aumentó más la temperatura. Está demostrado que los hongos parásitos tienen respuestas características a las condiciones climáticas a las que están sometidos (Pettit y Parry, 1996; Lonsdale y Gibbs, 1996; Carrión *et al.*, 1995).

La mayor esporulación de la roya se encontró, como se esperaba, en la época de menor precipitación (Becker, 1979, 1984; Velasco, 1979; Muthappa, 1980; Pedro Jr., 1983). Este período de máxima esporulación coincide con el período de menor evapotranspiración del año (40-80 mm para Xico y 60-110 mm para el Tizal), ya que la roya necesita bajo porcentaje de humedad relativa para su esporulación. Los porcentajes de incidencia de la roya de la localidad de Xico coinciden con los datos registrados por Carrión (1988) para los cafetales de Mahuixtlán (pertenecientes a la misma región cafetalera). En respuesta a nuestra pregunta sobre la variación de la infección de la roya en el tiempo, los datos indican que la roya sigue el mismo patrón fenológico registrado (Velasco, 1979; Muthappa, 1980; Becker, 1984). Con respecto al daño real provocado por el patógeno, los datos obtenidos tanto de los porcentajes de infección como la intensidad del daño foliar son bajos, por lo que se puede considerar que no hubo un daño severo.

La separación de las pústulas en categorías de edad, fue claramente observada en campo, reveló de manera confiable el inicio (mayor cantidad de pústulas jóvenes) y final

(mayor cantidad de pústulas viejas) del ciclo de mayor esporulación de la roya. La presencia de mayor número de pústulas jóvenes puede considerarse como resultado de exitosos ciclos de re-infección de la roya, por lo tanto, la disminución del número de pústulas jóvenes está indicando una interrupción en el ciclo de éstas re-infecciones. Aunque las evaluaciones se realizaron el mismo día en ambas localidades, la roya y sus micoparásitos se encontraban en diferentes momentos de esporulación, lo cual está relacionado directamente con la temperatura, precipitación y evapotranspiración.

### **Literatura citada**

- Becker, S., 1979. **Estudio sobre la propagación de las urediniosporas de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., agente causal de la roya, en Kenia.** Soc. Alem. Coop. Tec. (GTZ), Eschborn. 70 pp.
- Becker, S., 1984. Epidemiology and spread of *Hemileia vastatrix*. In: Fulton R.H. (ed. Comp.). **Coffee Rust in the Americas.** American Phytopathological Society. San Pablo. Minn. E.U. A. 120 pp.
- Cadena-Gómez, G. y P. Buriticá-Céspedes, 1980. Expresión de resistencia horizontal a la roya (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) en *Coffea canephora* variedad *conilon*. CENICAFE 32:15-34.
- Carrión, G., 1988. Estudios sobre el control biológico de la roya del cafeto mediante *Verticillium lecanii* en México. Mic. Neotrop. Aplic. 1: 79-86
- Carrión, G., F. Ruiz-Belin y H.C. Evans, 1995. Fenología y Epidemiología de *Mycosphaerella mimosicola* parásito de la planta sensitiva *Mimosa asperata*, en México. Rev. Mex. Mic. 11: 169-174.
- Chinnappa, C.C. y M.S. Sreenivasan, 1969. Some observations on leaf rust and leaf fall in arabica coffee. Indian Coffee 33: 374-379.
- García, E., 1981. **Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (Para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana).** E. García, México, D. F. 252 pp.

- Gómez, M., 1991. Atlas climático del Municipio de Xico (Estado de Veracruz). Serie de Estudios climáticos 7. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Veracruz. 47 pp..
- Gopalkrishnan, K. S., 1951. Notes on the morphology of the genus *Hemileia*. Mycologia 43: 271-283.
- Hirst, J. y R.D. Schein, 1965. Terminology of infection processes. Phytopathology 55: 11-57.
- James, W.C., 1983. Crop loss assessment. pp. 130-143. *In*: A. Johnston y C. Booth. **Plant Pathologist's Pocketbook**. CAB Commonwealth Mycological Institute.
- Lonsdale, D. y J. N. Gibbs, 1996. Effects of climate change on fungal diseases of trees. *In*: Frankland, J.C., N. Magan and F. M. Gadd (eds.). **Fungi and environmental change**. Symposium of the British Mycological Society held at Cranfield University. Cambridge University Press. pp1-19.
- Muthappa, B.N., 1980. Behaviour of *Hemileia vastatrix* during unfavourable weather. Jour. Coffee Res. 10: 31-35.
- Pedro Jr., M.J., 1983. Effects of meteorological factors on the development of coffee leaf rust. EPPO. Bull. 153-155.
- Pettitt, T.R. y D.W. Parry, 1996. Effects of climate change on *Fusarium* foot rot of winter wheat in the United Kingdom. *In*: Frankland, J.C., N. Magan and F. M. Gadd (eds.). **Fungi and environmental change**. Symposium of the British Mycological Society held at Cranfield University. Cambridge University Press. pp. 20-31.
- Schieber, E. y G. A. Zentmyer, 1984. Distribution and spread of coffee rust in Latin America. *In*: Fulton R.H. (ed. Comp.). **Coffee Rust in the Americas**. American Phytopathological Society. San Pablo. Minn. E.U. A., 120 pp.
- StatSoft, Inc. 2000. Statistica for Windows, computer program manual. Tulsa, OK.
- Velasco, J. D., 1979. Anotaciones sobre la biología de los diferentes tipos de roya. La roya del cafeto. Ed. Universitaria. Universidad de El Salvador. San Salvador.
- Wellman, F.L., 1972. **Tropical American Plant Disease** (Neotropical Phytopathology Problems). The Scarcrows Press. Inc. Metuchen, N.J. 989 pp.
- Zadock, J.C. y R.D. Schein, 1979. **Epidemiology and Plant Disease Management**. Oxford University Press. Nueva Cork, 427 pp.

## Apéndice

**Tabla 1.** Porcentaje de incidencia de la roya del café en las localidades de Xico y El Tizal.

mes/localidad	Xico			Tizal		
	hojas total	hojas enfermas	incidencia %	hojas total	hojas enfermas	incidencia %
feb 1997	741	92	12	711	166	23
mar	715	51	7	627	139	22
abr	820	34	4	810	100	12
may	918	27	3	849	49	6
jun	1017	25	2	853	33	4
jul	1033	15	1	909	8	1
ago	1107	71	6	887	23	3
sep	1099	52	5	870	26	3
oct	1022	93	9	812	158	19
nov	1045	133	13	772	200	26
dic	1003	111	11	713	212	30
ene 1998	1023	109	11	535	261	49
feb	1017	118	12	414	196	47
mar	999	112	11	371	129	35
abr	1248	73	6	398	51	13
may	1442	49	3	402	12	3
jun	1624	60	4	484	0	0
jul	1890	31	2	555	0	0
ago	1709	68	4	660	0	0
sep	1650	94	6	741	0	0
oct	1605	174	11	764	0	0
nov	1473	202	14	766	0	0
dic	1415	218	15	790	0	0
ene 1999	1380	233	17	790	0	0
feb	1283	254	20	764	0	0
mar	1271	191	15	755	2	0.3
abr	1409	110	8	739	1	0.1
may	1755	63	4	808	0	0
jun	1861	25	1	1245	0	0
jul	1899	48	3	1200	0	0
ago	1763	87	5	1105	0	0

**Tabla 2.** Número de hojas con roya en la escala de daños en el cafetal de Xico.

<b>mes/escala daño</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
feb 1997	650	69	16	5	2	0
mar	663	37	7	5	2	0
abr	783	29	4	0	1	0
may	892	19	4	4	0	0
jun	1042	21	4	0	0	0
jul	1065	14	1	0	0	0
ago	1090	54	11	6	0	0
sep	1104	48	3	1	0	0
oct	963	84	9	0	0	0
nov	915	97	28	8	0	0
dic	903	73	29	9	0	0
ene 1998	919	69	35	5	0	0
feb	902	74	40	4	0	0
mar	888	65	42	5	0	0
abr	1178	52	19	2	0	0
may	1392	35	14	0	0	0
jun	1563	46	15	2	0	0
jul	1859	14	15	2	0	0
ago	1641	46	18	3	1	0
sep	1553	60	35	0	0	0
oct	1435	99	73	7	1	0
nov	1277	116	80	6	0	0
dic	1175	114	98	7	0	0
ene 1999	1075	112	113	8	0	0
feb	1029	120	128	2	1	1
mar	1085	107	83	0	0	0
abr	1301	82	29	0	0	0
may	1644	50	12	1	0	0
jun	1836	17	8	0	0	0
jul	1851	24	22	2	0	0
ago	1676	42	44	1	0	0

**Tabla 3.** Número de hojas con roya en la escala de daños en el cafetal El Tizal.

<b>mes/ escala daño</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
feb 1997	544	127	37	5	0	0
mar	488	106	28	3	2	0
abr	718	82	16	2	0	0
may	803	40	9	0	0	0
jun	818	32	1	0	0	0
jul	897	8	0	0	0	0
ago	829	13	8	2	0	0
sep	843	19	4	2	1	0
oct	660	118	30	9	1	0
nov	580	112	62	20	5	1
dic	504	121	75	16	0	0
ene 1998	258	131	95	27	8	0
feb	214	106	82	8	0	0
mar	249	90	35	4	0	0
abr	339	42	8	1	0	0
may	387	8	4	0	0	0
jun	481	0	0	0	0	0
jul	555	0	0	0	0	0
ago	659	0	0	0	0	0
sep	741	0	0	0	0	0
oct	764	0	0	0	0	0
nov	767	0	0	0	0	0
dic	778	0	0	0	0	0
ene 1999	789	0	0	0	0	0
feb	763	0	0	0	0	0
mar	753	0	2	0	0	0
abr	783	1	0	0	0	0
may	808	0	0	0	0	0
jun	1245	0	0	0	0	0
jul	1200	0	0	0	0	0
ago	1105	0	0	0	0	0

### CAPÍTULO 3

#### INCIDENCIA E INTENSIDAD DE DAÑO DE LOS MICOPARÁSITOS SOBRE LA ROYA DEL CAFETO

Como vimos en el capítulo 1, varias especies de micoparásitos fueron encontrados sobre la roya. Desde el punto de vista de una red trófica, el café (*Coffea arabica*) constituye el primer nivel trófico, la roya (*Hemileia vastatrix*) el segundo y los micoparásitos (*Acremonium byssoides*, *Calcarisporium ovalisporum*, *Lecanicidium lecanii*, *Sporothrix guttuliformis* y *Fusarium pallidoroseum*) el tercer nivel trófico. El micelio de estos hongos al crecer sobre los soros compacta el grupo de esporas de la roya e impide su liberación normal. En campo, los primeros cuatro hongos pueden ser detectados por su micelio blanco sobre los soros de la roya del café y, el último, por su micelio con tonos rosados. En el capítulo 2 se obtuvieron los datos relativos a la dinámica poblacional de la roya sobre su hospedero y se corroboró que la roya sigue un patrón fenológico (la mayor esporulación se presenta entre octubre y marzo), determinado por factores climáticos (época de menor precipitación y evapotranspiración en el año, así como temperaturas de  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ ), y con la evaluación de la roya se comprobó que al menos en los cafetales estudiados los niveles de infección no son importantes para afectar económicamente al cultivo.

Considerando que las urediniosporas de roya son las unidades de infección para realizar un nuevo ciclo, cada pústula está constituida por un gran número de soros que esporulan a través de los estomas. Dichos soros pueden producir esporas de 4 a 6 veces durante 4-5 meses; así cada lesión puede generar aproximadamente entre 300,000 y 2,000,000 de esporas (McCain y Hennen, 1984). Por lo tanto, es de suponerse que la presencia de los micoparásitos resulta exitosa en el control natural de la población de la roya del café, ya que parte de estas esporas son eliminadas por los micoparásitos. Entonces las preguntas que

surgen son ¿cómo varía la comunidad de micoparásitos de la roya en el tiempo? ¿en qué etapa de la esporulación de la roya se presenta la mayor cantidad de micoparásitos? y ¿la edad de las pústulas influye sobre las preferencias de los micoparásitos?

A nivel de laboratorio e invernadero se ha probado que la baja humedad relativa es uno de los factores ambientales importantes que evitan el desarrollo de micoparásitos (Jarvis *et al.*, 1989; Verhaar *et al.*, 1998). En condiciones de laboratorio e invernadero se ha estudiado el micoparasitismo sobre el mildiú polvoso del pepino y de la rosa (*Sphaerotheca fuliginea* y *S. pannosa*) con aspersiones conidiales de por ejemplo, *Lecanicidium lecanii* y *Sporothrix rugulosa*, obteniendo con humedades relativas del 100%, al menos el 90% del área con el mildiú micoparasitada con dichos hongos. Sin embargo, con humedades relativas del 70%, el micoparasitismo nunca fue mayor al 35% (Verhaar y Hijwegen, 1993; Verhaar *et al.* 1998). Entonces en condiciones de campo ¿cómo influyen en la comunidad de micoparásitos los factores ambientales (precipitación, temperatura y evapotranspiración)? El objetivo del presente capítulo fue conocer en condiciones naturales las fluctuaciones de la presencia de los micoparásitos sobre la roya del cafeto en el tiempo. Aunque los micoparásitos pueden estar en el suelo de los cafetales o sobre otras especies de parásitos, para los fines de nuestro trabajo sólo fueron evaluados sobre la roya del cafeto. De esta manera los micoparásitos están supeditados a la presencia o ausencia de la roya. Para contestar las preguntas planteadas se registró durante 31 meses la presencia de micoparásitos sobre el total de pústulas de roya (incidencia) y la frecuencia de pústulas parasitadas separadas por categorías de edad de las pústulas. La intensidad del micoparasitismo se evaluó con base en la densidad del micelio de los micoparásitos observada a simple vista. Los datos del número de pústulas de roya y pústulas micoparasitadas fueron correlacionadas con la temperatura, precipitación y evapotranspiración.



## MATERIALES Y MÉTODOS

**Toma de datos de los micoparásitos de la roya del cafeto.** Paralelamente a la toma de datos de la roya del cafeto (Cap. 2) se obtuvo la de los micoparásitos en los mismos 10 cafetos seleccionados al azar (N = 50 ramas). Para obtener la incidencia de los micoparásitos se anotó el número de pústulas micoparasitadas de cada hoja con roya.

$$\text{Incidencia de micoparásitos} = \text{No. pústulas enfermas} / \text{No. total de pústulas}$$

Para cada pústula micoparasitada se estimaron la edad (jóvenes, maduras y viejas) y la intensidad del ataque de los micoparásitos sobre la roya; escaso (a): cuando a simple vista se observa una ligera mancha blanca sobre 30% de la pústula entre, 1-2 mm de diámetro, regular (b): la mancha blanca cubre 50% de la pústula, abundante (c): el desarrollo del micelio del micoparásito cubre 100% de la pústula.

Debido a la dificultad de reconocer la identidad de los hongos micoparásitos a nivel de campo, los datos se tomaron en relación al color de los micoparásitos, los blancos que corresponden a varias especies (V), el hongo con tonalidades rosadas (F) (*F. pallidoroseum*) y en el caso de presentarse ambos (VF).

**Análisis de datos.** Se aplicó una ANOVA con el programa estadístico Statistica (StatSoft, Inc. 2000) para buscar diferencias significativas entre los cafetales estudiados (período febrero 1997-mayo 1998) y para Xico entre los períodos (agosto-julio 1997-1998 y 1998-1999) sobre (a) número total de pústulas micoparasitadas, (b) las micoparasitadas separadas por categorías de edad, (c) las pústulas registradas por tipo de hongo registrados (V, F y VF) y, (d) la intensidad del ataque de los micoparásitos sobre las pústulas de roya en diferente categoría de edad (Tablas 1 a 7 del apéndice). Con la prueba de Tukey se encontró el grupo de pústulas que marcaba la diferencia entre el número de pústulas micoparasitadas por los diferentes tipos de hongos. La prueba-*t*, se aplicó para comparar el número de pústulas separadas por categoría de

edad entre períodos en el cafetal de Xico. Finalmente, el número de pústulas de roya y las micoparasitadas durante el tiempo de evaluación se asociaron con la temperatura, precipitación y evapotranspiración con una correlación canónica.

## RESULTADOS

**Incidencia de los micoparásitos.** Los micoparásitos se encontraron sobre la roya, aunque en pocas pústulas, desde el inicio de la esporulación. Las pústulas de la roya del cafeto micoparasitadas alcanzaron su mayor número entre abril y mayo para ambos cafetales, después de la máxima esporulación de la roya (Fig. 1). En el cafetal de Xico se pueden apreciar tres períodos de micoparasitismo, y dos en el cafetal del Tizal. Aunque en Xico el número de pústulas micoparasitadas fue menor que en Tizal no se encontró diferencias significativas (febrero 1997-mayo 1998) entre los dos cafetales ( $F_{1, 30} = 2.259$ ,  $P = 0.143$ ; Xico:  $41 \pm 14$ , Tizal  $71 \pm 14$ ). Para la localidad de Xico no se encontró diferencias significativas entre el número de pústulas micoparasitadas de los períodos agosto-julio 1997-1998 y 1998-1999 ( $F_{1, 22} = 2.482$ ,  $P = 0.129$ ; período 1:  $43 \pm 8$ , período 2:  $26 \pm 8$ ).

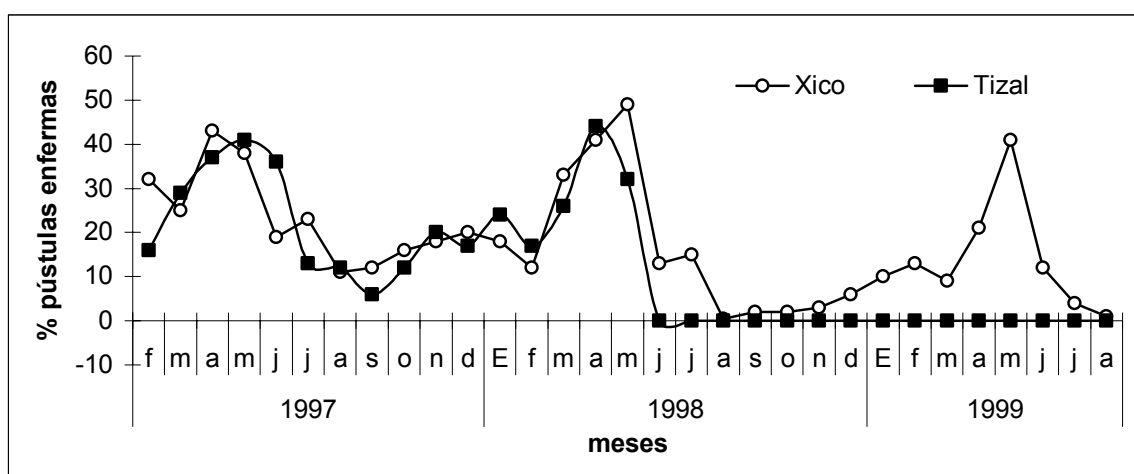


Fig. 1. Comparación del porcentaje de micoparasitismo de las pústulas de la roya del cafeto en las localidades de Xico y el Tizal.

Las pústulas micoparasitadas y que consideramos enfermas se restringen a las pústulas maduras y viejas (Figs. 2 y 3). Las pústulas jóvenes no se encontraron parasitadas por ningún micoparásito. El porcentaje de micoparásitos sobre las pústulas viejas es mayor que sobre las maduras (Figs. 4 y 5). No se encontró diferencias significativas en cuanto al número de pústulas maduras micoparasitadas entre los cafetales ( $F_{2, 29} = 1.526$ ,  $P = 0.234$ ; Xico:  $8 \pm 8$ , Tizal:  $29 \pm 9$ ), ni en cuanto a las pústulas viejas (Xico:  $33 \pm 7$ , Tizal:  $39 \pm 7$ ). En Xico, entre un período y otro (agosto-julio 1997-1998 y 1998-1999) se encontró diferencias significativas en el número de pústulas separadas por categorías ( $F_{2, 21} = 4.374$ ,  $P = 0.025$ ), esta diferencia esta dada por el micoparasitismo sobre las pústulas maduras ( $t = 2.991$ , g.l. = 22,  $P = 0.006$ ; período 1:  $8 \pm 8$ , período 2:  $0.4 \pm 0.5$ ), pero no entre el número de micoparásitos sobre pústulas viejas ( $t = 0.962$ , g.l. = 22,  $P = 0.346$ ; período 1:  $35 \pm 22$ , período 2:  $26 \pm 28$ ).

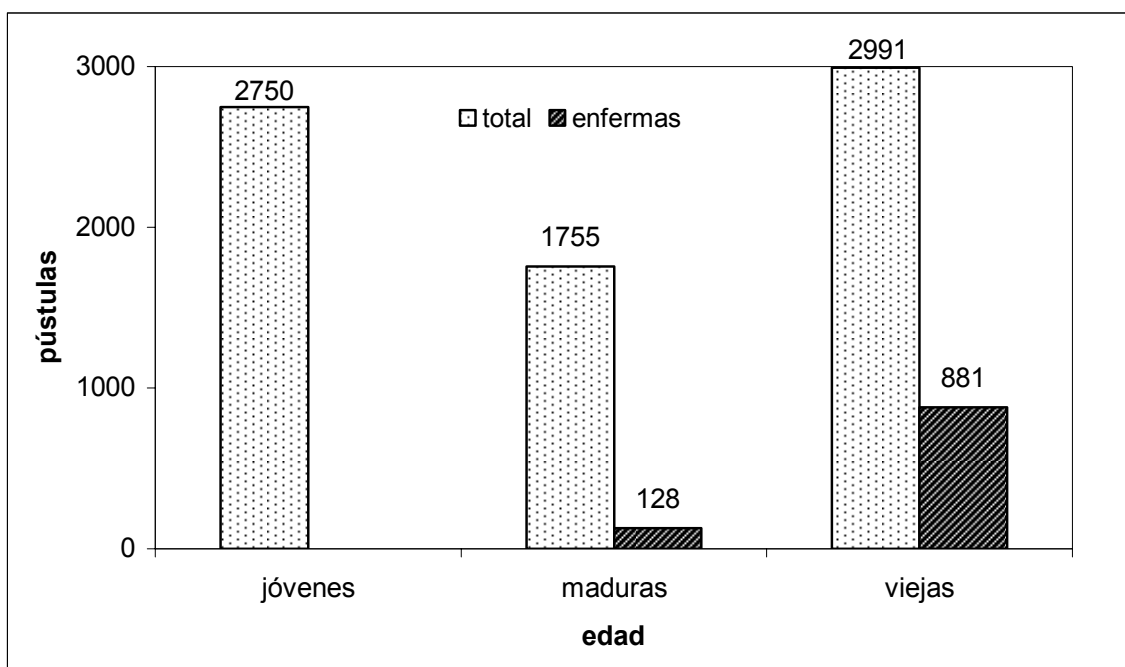


Fig. 2 Número de pústulas enfermas con micoparásitos, separadas por categoría de edad en el cafetal de Xico.

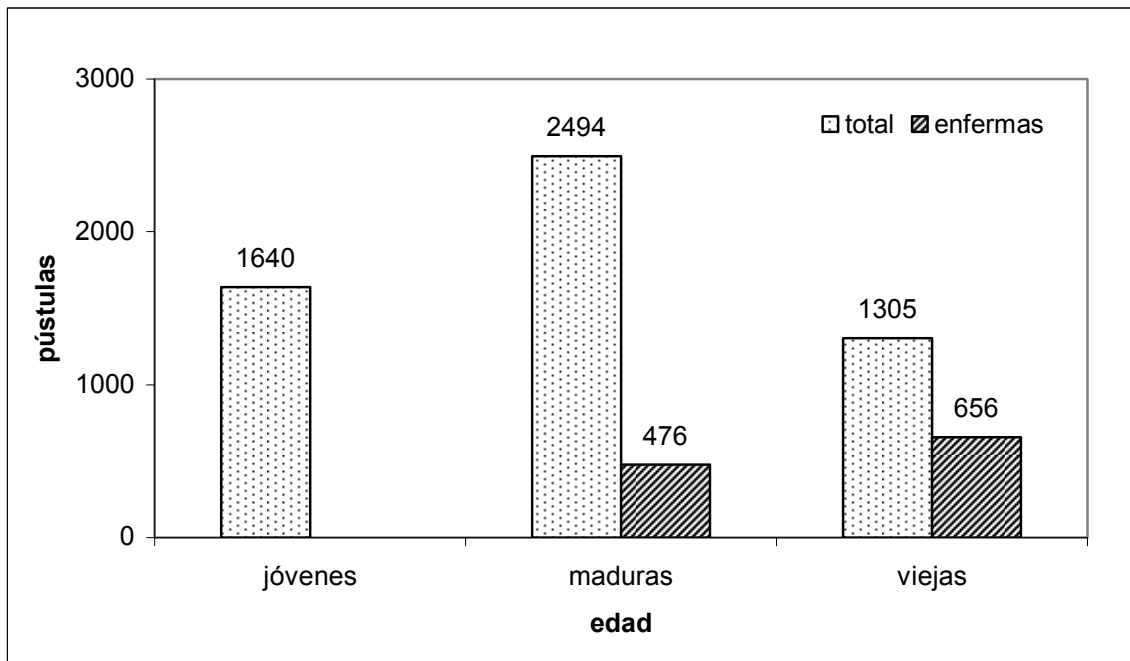


Fig. 3. Número de pústulas enfermas con micoparásitos, separadas por categoría de edad en el cafetal de Tizal.

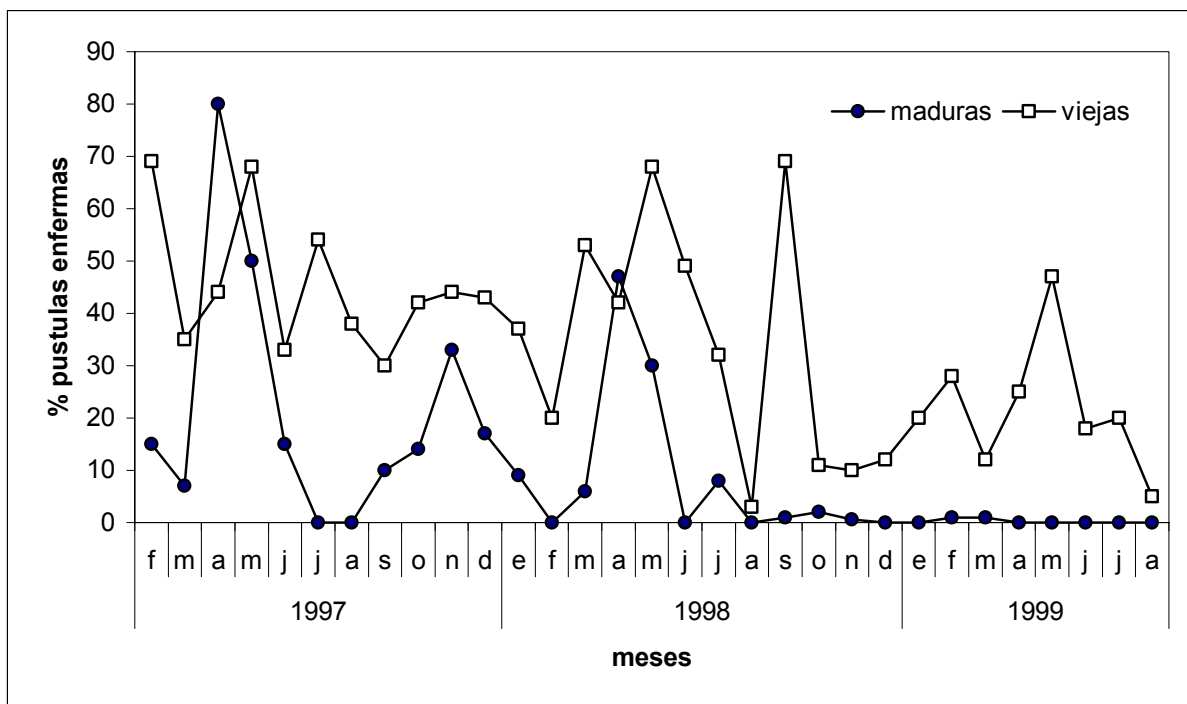


Fig. 4. Porcentaje de pústulas maduras y viejas micoparasitadas en el cafetal de Xico.

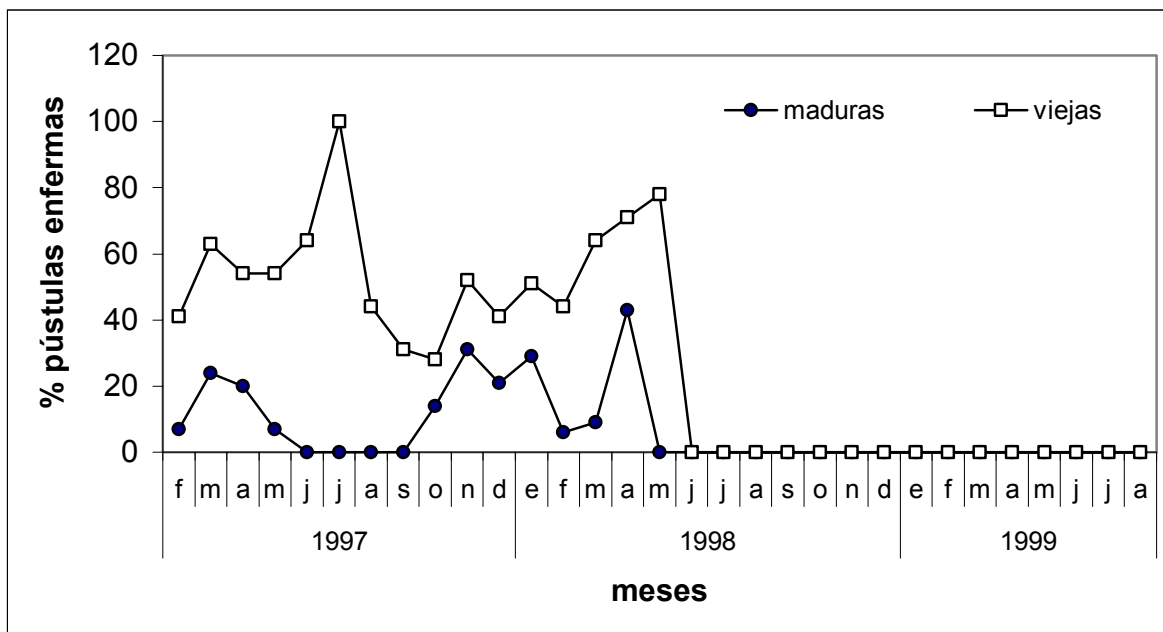


Fig. 5. Porcentaje de pústulas maduras y viejas micoparasitadas en el cafetal de Tizal.

En las pústulas maduras micoparasitadas siempre se registraron los micelios blancos, y en las pústulas viejas se encontraron en ambos cafetales pústulas parasitadas con ambos tipos de micelios (VF) (Figs. 6 y 7). Aunque el número de pústulas parasitadas con los diferentes micelios blancos (V) fue mayor en el cafetal del Tizal, no se encontraron diferencias significativas entre los cafetales ( $F_{3, 28} = 0.962$ ,  $P = 0.424$ ) en el número de pústulas micoparasitadas en ninguno de los tipos de hongos (Xico, V:  $25 \pm 2$ , F:  $13 \pm 3$ , VF:  $3 \pm 1$ ; Tizal, V:  $54 \pm 12$ , F:  $15 \pm 3$ , VF:  $5 \pm 1$ ). En Xico se encontró diferencias significativas entre los períodos con los diferentes tipos de hongos ( $F_{3, 20} = 5.925$ ,  $P = 0.004$ ). La prueba de Tukey indicó que la diferencia se encontró entre el número de pústulas micoparasitadas por los diferentes hongos blancos y las pústulas con ambos tipos de hongos (período 1, V:  $26 \pm 4$ , F:  $13 \pm 5$ , VF:  $4 \pm 1$ ; período 2, V:  $6 \pm 4$ , F:  $22 \pm 5$ , VF:  $0.3 \pm 1$ ), pero no se encontró diferencia entre las pústulas parasitadas sólo con *Fusarium pallidoroseum*. Este último, fue el que persistió en todo el tiempo de evaluación.

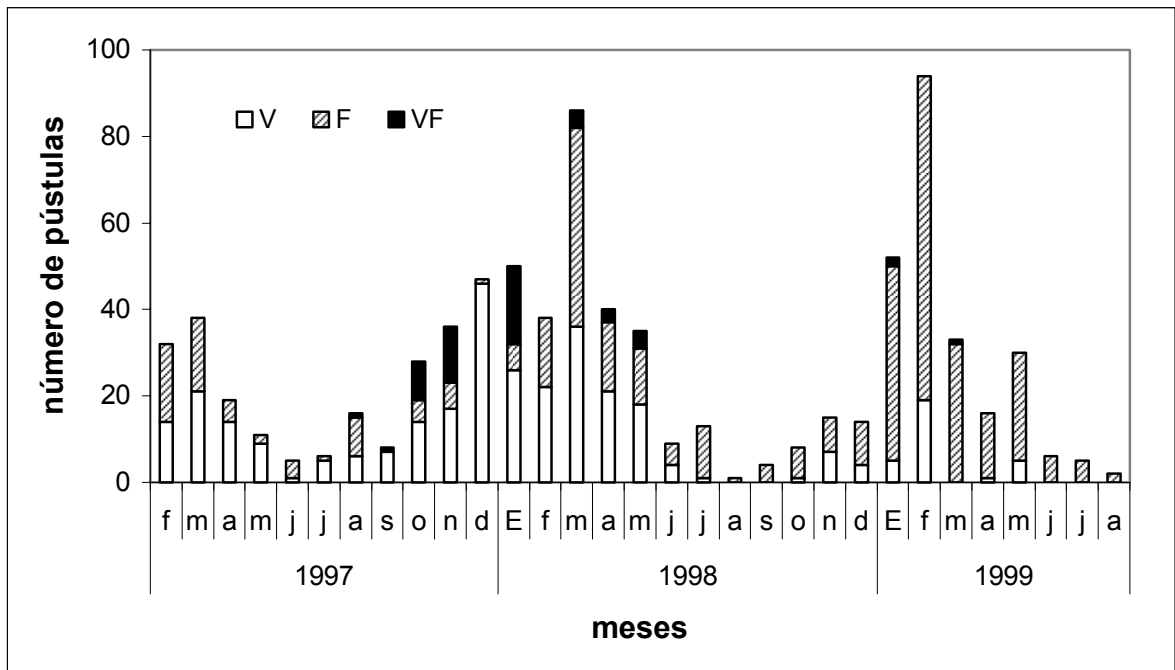


Fig.6. Número de pústulas viejas separadas por tipo de micoparásito en el cafetal de Xico. V: micelios blancos; F: *Fusarium pallidoroseum*; VF: ambos.

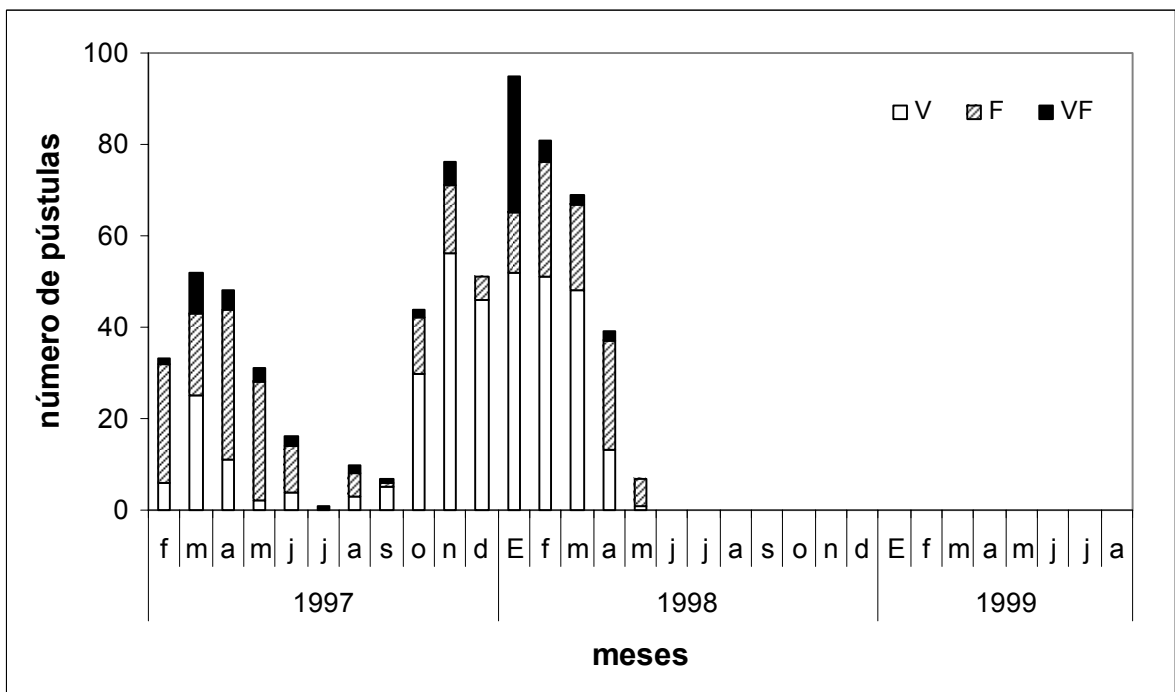


Fig. 7. Número de pústulas viejas separadas por el tipo de micoparásito en cafetal de Tizal. V: micelios blancos; F: *Fusarium pallidoroseum*; VF: ambos.

**Intensidad del daño de los micoparásitos.** El mayor número de pústulas parasitadas se encontró en la categoría de escaso (a), el siguiente es el de regular (b), y muy pocas caen dentro de la categoría de abundante (c) (Figs 8 y 9). No se encontró diferencia significativa entre los cafetales (febrero 1997-mayo 1998) en la intensidad de daño de los micoparásitos sobre las pústulas maduras ( $F_{3, 30} = 1.111$ ,  $P = 0.359$ ; Xico, a:  $6 \pm 8$ , b:  $1 \pm 1$ , c:  $0.17 \pm 0.19$ ; Tizal, a:  $25 \pm 8$ , b:  $2 \pm 1$ , c:  $0.29 \pm 0.19$ ). En la comparación de los períodos (agosto-julio 1997-1998 y 1998-1999) en Xico si se encontró diferencias significativas en la intensidad de daño de las pústula maduras ( $F_{2, 21} = 6.638$ ,  $P = 0.005$ ; período 1, a:  $6 \pm 1$ , b:  $1 \pm 0.5$ ; período 2, a:  $0.3 \pm 1$ , b:  $0.08 \pm 0.5$ ). Los datos de la intensidad abundante no fueron suficientes para aplicarles un estadístico.

En pústulas viejas no se encontró diferencias significativas entre los cafetales sobre la intensidad de daño de los micoparásitos ( $F_{3, 92} = 0.474$ ,  $P = 0.70$ ; Xico, a:  $8 \pm 2$ , b:  $3 \pm 1$ , c:  $0.27 \pm 0.18$ ; Tizal, a:  $11 \pm 2$ , b:  $3 \pm 1$ , c:  $0.27 \pm 0.18$ ). En Xico, las pústulas viejas son las que se encuentran parasitadas con mayor frecuencia y con mayor intensidad (Fig. 8). Sin embargo, tampoco se encontró diferencias significativas en la intensidad de daño de los micoparásitos hacia la roya entre los períodos ( $F_{3, 68} = 0.975$ ,  $P = 0.409$ ; período 1, a:  $9 \pm 2$ , b:  $2 \pm 1$ , c:  $0.2 \pm 0.1$ ; período 2, a:  $7 \pm 2$ , b:  $1 \pm 1$ , c:  $0.05 \pm 0.1$ ).

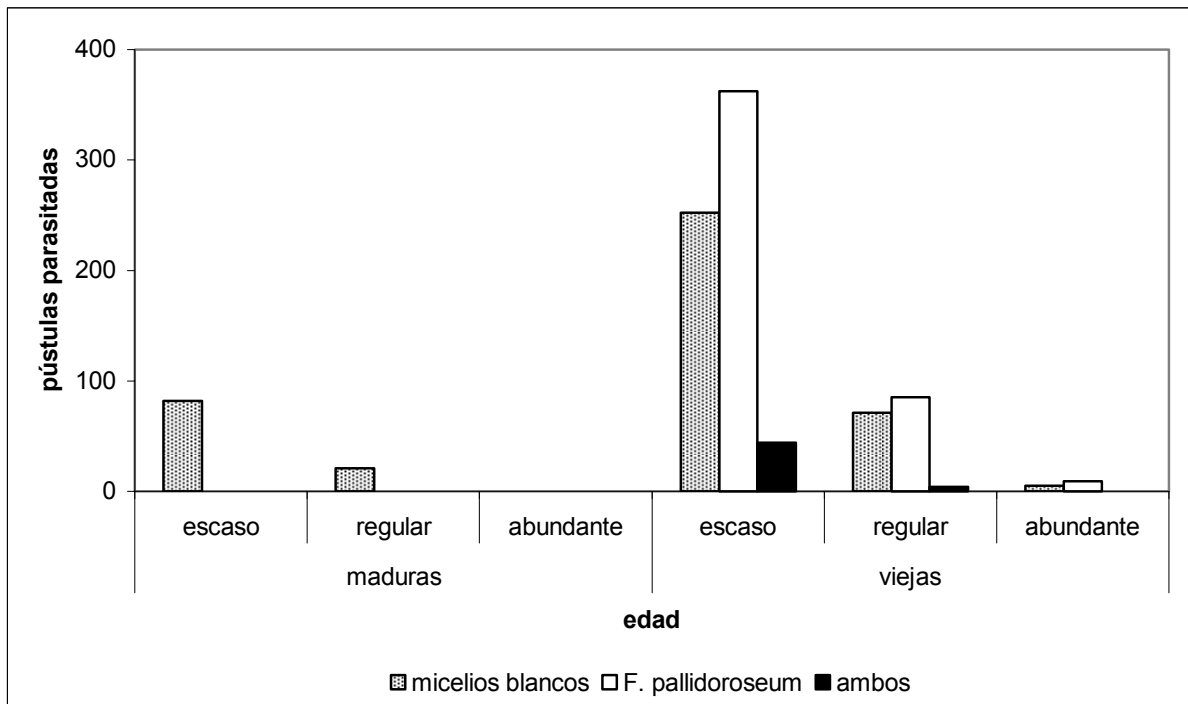


Fig. 8. Intensidad de micoparasitismo sobre las pústulas de roya del cafetal de Xico.

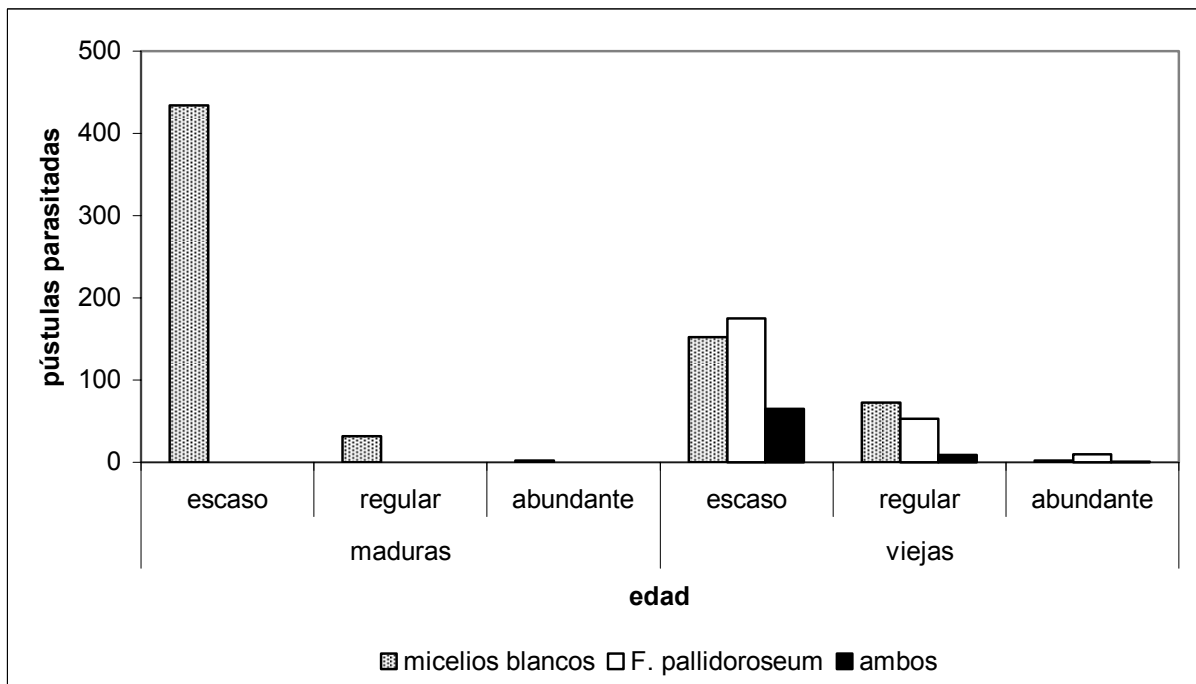


Fig. 9. Intensidad de micoparasitismo sobre las pústulas de roya del cafetal de Tizal.



**Correlación roya y micoparásitos con factores ambientales.** En los cafetales estudiados aunque el mayor número de pústulas micoparasitadas coincide con el período de menor precipitación y evapotranspiración (75-100 mm), el factor ambiental asociado con el número de pústulas de roya y sus micoparásitos fue diferente (Figs. 10 y 11). En Xico la disminución tanto de las pústulas de roya como de sus micoparásitos esta correlacionada con el incremento de la precipitación y evapotranspiración ( $r = 0.6442$ ,  $P = 0.001$ ). En el cafetal de Tizal el aumento de la temperatura esta correlacionado con la disminución de la roya y el aumento del micoparasitismo ( $r = 0.5385$ ,  $P = 0.04$ ).

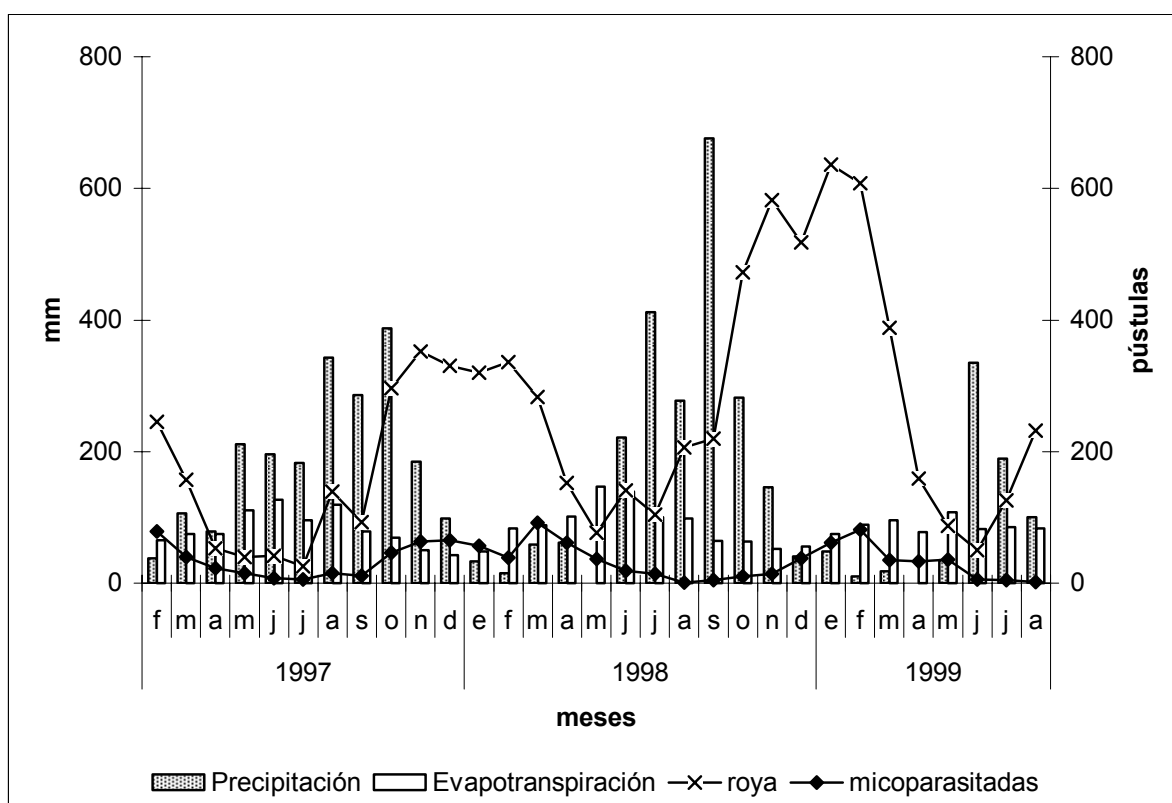


Fig. 10. Número de pústulas de roya y micoparasitadas, comparados con la precipitación y evapotranspiración en la localidad de Xico.

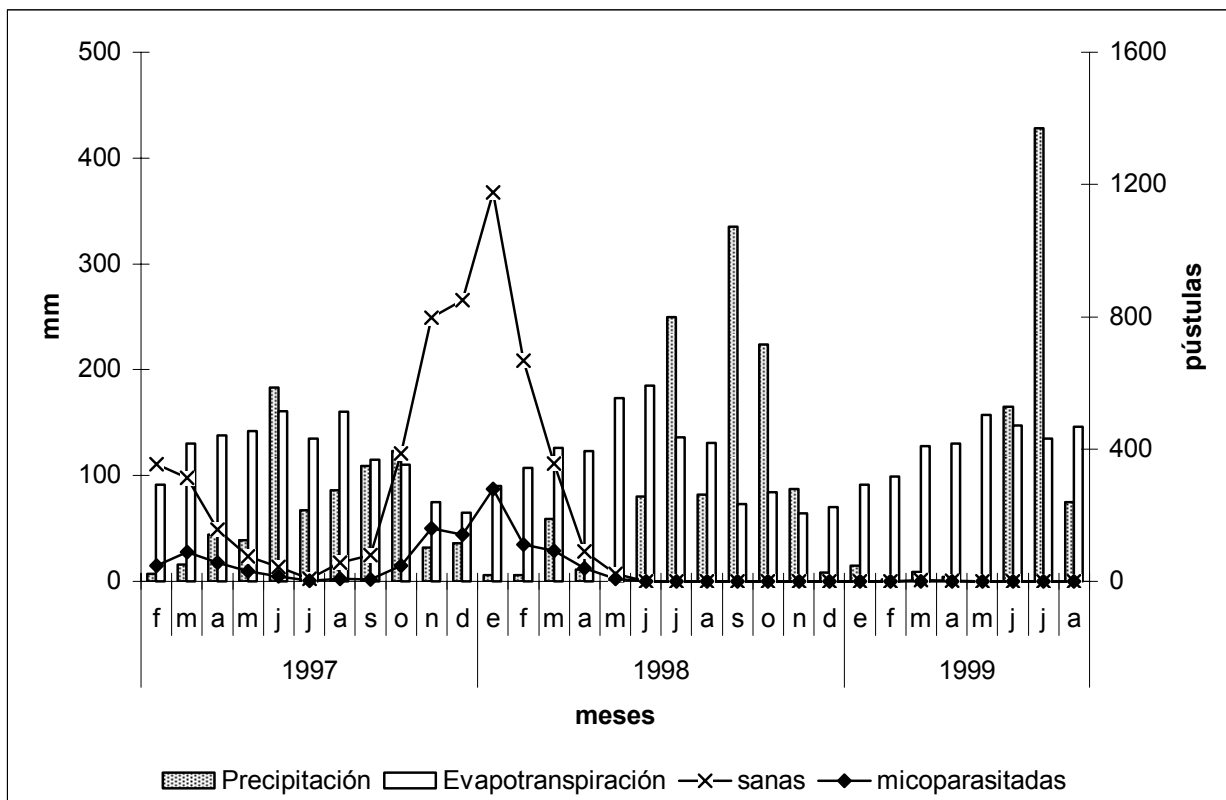


Fig. 11. Número de pústulas de roya micoparasitadas, comparados con la precipitación y evapotranspiración en la localidad de Tizal.

## Discusión

El estudio fenológico nos indicó que la presencia de los micoparásitos es variable durante el período de esporulación de la roya del cafeto, cambia en cuanto a su abundancia como consecuencia no sólo de la presencia o ausencia de la roya, sino debido a las condiciones climáticas. La comunidad natural de micoparásitos sigue el mismo patrón fenológico que la roya del cafeto. El mayor porcentaje de micoparasitismo (menor de 50%) se encontró en la época de mayor esporulación de la roya, cuando la mayor parte de las pústulas de la roya se encontraban en sus estados maduros y viejos. En cambio el ámbito de porcentajes de micoparasitismo (30-88%) obtenidos por Carrión (1988; 1993) y Alarcón y Carrión (1994) por aplicaciones experimentales de *L. lecanii* (= *V. lecanii*) en cafetales de la

región centro del estado de Veracruz, fueron mayores debido al aumento del inóculo del hongo.

En ausencia de micoparásitos la severidad de la roya esta determinada por la precipitación y la temperatura, y la altitud está en relación inversa con la intensidad del daño (Muthappa, 1980; Pedro, 1983; Ramaiah y Venkataramanam, 1985). Sin embargo, cuando la temperatura no es un factor limitante, la severidad de la enfermedad está determinada por la cantidad de follaje e inóculo existente al final de la estación seca (Bock, 1962, Kushalappa y Eskes, 1989). En el cafetal de Xico, además de la presencia del hospedero, se presentaron todas las condiciones climáticas favorables para que la roya alcanzara altos porcentajes de infección. Sin embargo, la infección de la roya fue moderada (20%), por lo que es posible que la presencia de los micoparásitos (41-49%) haya reducido la cantidad de inóculo al final de la época de menor precipitación.

Con la presencia de los micoparásitos en el cafetal, la roya tiene un período corto libre de micoparásitos para liberar sus esporas (pústulas jóvenes). La caída abrupta en el paso de las pústulas maduras a viejas (Fig. 20 del Capítulo 2) en el cafetal de Tizal, de noviembre 1997 a enero 1998, puede explicarse por la gran cantidad de pústulas maduras registradas con micoparasitismo en grado 1. Es decir, las maduras no pudieron pasar de manera natural a la categoría de viejas debido a que fueron parasitadas por las diferentes especies de micoparásitos. La presencia de los hongos blancos y *F. pallidroseum* (VF) al mismo tiempo sobre las pústulas viejas puede indicar que las pústulas maduras parasitadas por varios hongos blancos (V) van pasando a viejas y van siendo atacadas por *F. pallidroseum*, por lo que se puede pensar que es la transición de una edad a otra y de un hongo micoparásito a otro. Esto puede estar asociado a la viabilidad de las esporas de la roya. El área foliar donde la roya se

encuentra esporulando muestra síntomas de necrosis, cuando la pústula madura empieza a envejecer, hasta llegar a la necrosis total del tejido.

El no encontrar diferencias estadísticas significativas en la cantidad de micoparásitos sobre las pústulas de roya, los tipos de hongos y la intensidad de daño de los micoparásitos entre los cafetales estudiados, así como en los porcentajes del total de pústulas parasitadas (12 y 13% de las pústulas, en Xico y Tizal, respectivamente) puede indicarnos que existe un patrón en la relación roya-micoparásitos, ya que los cafetales se encuentran en condiciones ambientales diferentes. Por otro lado encontrar diferencias significativas en la mayoría de los parámetros evaluados entre los periodos de Xico nos puede estar indicando que los ciclos de roya y sus micoparásitos en la misma localidad cambian de una periodo a otro.

Los micoparásitos no sólo influyen en la población de la roya por la interrupción del proceso de re-infección, cuando la roya se encuentra en la fase de establecimiento de su población; sino que también influyen en la cantidad de esporas viables disponibles como inóculo para el establecimiento de la roya del siguiente ciclo de infección. Aunque los porcentajes de micoparasitismo aparentemente son muy pequeños, ya que queda más del 80% de las pústulas libre de micoparásitos, al parecer éstos son suficientes para que la roya no represente un problema en la región.

La constante presencia de los micoparásitos de manera natural en el cafetal hace factible el encuentro de las esporas de micoparásitos con las pústulas de roya para que se reproduzcan sobre ésta eficientemente. En experimentos de laboratorio Verhaar *et al.* (1997) probaron que aspersiones de *L. lecanii* fueron más eficientes en control del mildiú polvoso del pepino cuando se aplicaron dos días después de la inoculación del parásito. Además, las condiciones ambientales en el interior de los cafetales a sombra, si bien proporcionan la humedad relativa (> 70%) y temperatura ( $20 \pm 2^\circ \text{C}$ ) óptimas para el desarrollo de la roya,

también son las condiciones adecuadas para el desarrollo de los micoparásitos. Es posible que en el Tizal haya aumentado el micoparasitismo cuando aumentó la temperatura y la excesiva carencia de agua en enero y febrero de 1998 convirtieron a las esporas en el mejor recurso disponible para los micoparásitos

Los porcentajes de micoparasitismo de la roya alcanzados en condiciones naturales (sin aplicación de fungicidas) en el presente estudio, aunados a los experimentos realizados con *L. lecanii* en campo Carrión (1988; 1993), Alarcón y Carrión (1994) y Carrión *et al.* (1999) abren la perspectiva de un control biológico factible en campo con otras enfermedades causadas hongos en plantas tanto de ciclo largo (árboles y arbustos) como de ciclo corto (frijol, haba, trigo, avena).

#### LITERATURA CITADA

- Alarcón, R. y G. Carrión, 1994. Uso de *Verticillium lecanii* como control biológico de la roya del cafeto. *Fitopatología* 29:82-85.
- Bock, K.R., 1962. Seasonal periodicity of coffee leaf rust and factors affecting the severity of outbreaks in Kenya Colony. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 45: 289-300.
- Booth, C., 1971. **The Genus *Fusarium***. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey. Reino Unido.
- Carrión, G., 1988. Estudios sobre el control biológico de la roya del cafeto mediante *Verticillium lecanii* en México. *Mic. Neotrop. Aplic.* 1: 79-86
- Carrión, G. y F. Ruiz-Belin, 1988. Inoculación en el laboratorio de *Verticillium lecanii* sobre la roya del café (*Hemileia vastatrix*). *Rev. Mex. Mic.* 4:317-321.
- Carrión, G., 1993. Control biológico de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*) con el hongo *Verticillium lecanii*. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias. U.N.A.M., México. 51pp.
- Carrión, G., A. Romero y V. Rico-Gray, 1999. Use of *Verticillium lecanii* as a biocontrol agent against bean rust (*Uromyces appendiculatus*). *Fitopatología* 34: 214-219.

- Carrión, G. y V. Rico-Gray, 2002. Micoparasites of coffee rust in Mexico. *Fungal Diversity* 11: 49-60.
- Hijwegen, T. y Verhaar, M.A., 1993. Induced resistance to *Peronospora parasitica* in red cabbage. *Neth. J. Pl. Path.* 99 (s3): 103-107.
- Hijwegen, T. y J.A.A.M. Dirven, 1993. Mycoparasitism of Powdery and Mildews. *In: Folhema, N.J., Y. Kohl y Y. Elad (Eds.). Biological Control of Foliar and Post-harvest Diseases.* 10BC wprs Bulletin 16: 76-81.
- Jarvis, W.R., L.A. Shaw y J.A. Traquair, 1989. Factors affecting antagonismo of cucumber powdery by *Stephanoascus flocculosus* and *S. rugulosus*. *Mycol. Res.* 92: 162-165.
- Kushalappa, A.C. y A.B. Eskes, 1989. Advances in coffee rust research. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27: 503-531.
- MacCain, J.W. y J.F. Hennen, 1984. Development of the uredinial thallus and sorus in the orange rust fungus. *Hemileia vastatrix*. *Phytopathology* 74: 714-721.
- Muthappa, B.N., 1980. Behaviour of *Hemileia vastatrix* during unfavourable weather. *Jour. Coffee Res.* 11: 4-6.
- Pedro Jr., M.J., 1983. Effects of meteorological factor on the development of coffee leaf rust. *EPPO Bull.* 13: 153-155.
- Ramaiah, P.K. y D. Venkataraman, 1985. Growth and development of coffee in south indian condition- a review. *Jour. Coffee Res.* 15: 1-13.
- Romero, A. y G. Carrión, 1998. Primer registro del género *Dietelia* (Uredinales) en México. *Rev. Mex. Mic.* 14: 53-55.
- Romero, D., M.E. Rivera, F.M. Cazorla, A. de Vicente y A. Pérez-García, 2003. Effect of mycoparasitic fungi on the development of *Sphaerotheca fusca* in melon leaves. *Mycological Research* 107: 64-71.
- StatSoft, Inc., 2000. *Statistica for Windows, computer program manual.* Tulsa, OK.
- Verhaar, M.A., A. Keressies y T. Hijwegen, 1998. Effect of relative humidity on mycoparasitism of rose powdery mildew with and without treatments with mycoparasites. *In: Verhaar, M.A. Studies on biological control of powdery mildew in cucumber (*Sphaerotheca fuliginea*) and rose (*S. pannosa*) by means of mycoparasites.* Tesis Doctorado. Wageningen Agricultural University, Holanda. pp. 13-22.

Verhaar, M.A. y T. Hijwegen, 1993. Efficient production of phialoconidia of *Verticillium lecanii* for biocontrol of cucumber powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea*. Neth. J. Plant Pathol. 99: 101-103.

## Apéndice

**Tabla 1.** Número total de pústulas de roya, pústulas micoparasitadas y porcentaje de micoparasitismo en las localidades de Xico y Tizal.

mes/localidad	Xico			Tizal		
	total	pústulas enfermas	incidencia %	total	pústulas enfermas	incidencia %
feb 1997	245	79	32	294	47	16
mar	157	40	25	312	89	29
abr	53	23	43	156	57	37
may	40	15	38	75	31	41
jun	42	8	19	44	16	36
jul	26	6	23	8	1	13
ago	139	15	11	57	7	12
sep	93	11	12	79	5	6
oct	296	46	16	387	48	12
nov	352	63	18	798	160	20
dic	330	65	20	850	141	17
ene 1998	320	57	18	1176	278	24
feb	336	39	12	668	112	17
mar	283	92	33	357	93	26
abr	152	62	41	91	40	44
may	75	37	49	22	7	32
jun	141	19	13	0	0	0
jul	94	14	15	0	0	0
ago	206	1	0.5	0	0	0
sep	206	5	2	0	0	0
oct	472	10	2	0	0	0
nov	557	14	3	0	0	0
dic	588	38	6	0	0	0
ene 1999	619	62	10	0	0	0
feb	608	81	13	0	0	0
mar	387	35	9	4	0	0
abr	159	33	21	1	0	0
may	87	36	41	0	0	0
jun	50	6	12	0	0	0
jul	126	5	4	0	0	0
ago	232	2	1	0	0	0



**Tabla 2.** Edad de las pústulas de la roya del cafeto en la localidad de Xico.

mes	total			enfermas		
	j	m	v	j	m	v
<b>feb 1997</b>	43	113	89	0	17	62
mar	21	28	108	0	2	38
abr	5	5	43	0	4	19
may	16	8	16	0	4	11
jun	7	20	15	0	3	5
jul	12	3	11	0	0	6
ago	55	47	37	0	1	14
sep	37	29	27	0	3	8
oct	102	125	69	0	17	29
nov	191	78	83	0	26	37
dic	128	84	118	0	14	51
<b>ene 1998</b>	104	80	136	0	7	50
feb	67	77	192	0	0	39
mar	34	85	164	0	5	87
abr	8	34	110	0	16	46
may	17	10	50	0	3	34
jun	36	66	39	0	0	19
ago	91	84	31	0	0	1
sep	84	78	58	0	1	4
oct	350	42	80	0	1	9
nov	286	163	133	0	1	13
dic	319	112	113	0	0	14
<b>ene 1999</b>	255	74	307	0	0	62
feb	181	96	331	0	1	93
mar	28	86	724	0	1	34
abr	4	20	135	0	0	33
may	5	5	77	0	0	36
jun	17	0	33	0	0	6
jul	99	2	25	0	0	5
ago	99	89	44	0	0	2
Total	2750	1755	2991	0	128	881

j: jóvenes; m: maduras; v: viejas

**Tabla 3.** Edad de las pústulas de la roya del cafeto en la localidad de Tizal.

mes	total			enfermas		
	j	m	v	j	m	v
<b>feb 1997</b>	60	218	76	0	16	31
mar	75	155	82	0	37	52
abr	22	45	89	0	9	48
may	4	15	56	0	1	30
jun	7	12	25	0	0	16
jul	6	1	1	0	0	1
ago	28	13	16	0	0	7
sep	38	25	16	0	0	5
oct	131	175	81	0	25	23
nov	382	271	145	0	84	76
dic	321	383	146	0	81	60
<b>ene 1998</b>	357	634	185	0	183	95
feb	101	359	208	0	20	92
mar	58	181	118	0	17	76
abr	32	7	52	0	3	37
may	13	0	9	0	0	7
jun	0	0	0	0	0	0
jul	0	0	0	0	0	0
ago	0	0	0	0	0	0
sep	0	0	0	0	0	0
oct	0	0	0	0	0	0
nov	0	0	0	0	0	0
dic	0	0	0	0	0	0
<b>ene 1999</b>	0	0	0	0	0	0
feb	0	0	0	0	0	0
mar	4	0	0	0	0	0
abr	1	0	0	0	0	0
may	0	0	0	0	0	0
jun	0	0	0	0	0	0
Total	1640	2494	1305	0	476	656

j: jóvenes; m: maduras; v: viejas

**Tabla 4.** Número de pústulas parasitadas por varios hongos blancos (V), por *Fusarium pallidoroseum*, o por VF (ambos) en el cafetal de Xico.

<b>mes</b>	<b>V</b>	<b>F</b>	<b>VF</b>
feb 1997	32	47	0
mar	23	17	0
abr	18	5	0
may	13	2	0
jun	4	4	0
jul	5	1	0
ago	7	9	1
sep	10	0	1
oct	31	5	9
nov	43	6	13
dic	60	1	0
ene 1998	33	6	18
feb	22	16	0
mar	41	46	4
abr	34	26	3
may	22	12	4
jun	4	15	0
jul	2	12	0
ago	0	1	0
sep	1	4	0
oct	4	6	0
nov	7	7	0
dic	6	30	0
ene 1999	6	54	2
feb	31	62	1
mar	1	34	0
abr	6	26	1
may	5	31	0
jun	0	6	0
jul	0	5	0
ago	0	2	0

**Tabla 5.** Número de pústulas parasitadas por varios hongos blancos (V), por *Fusarium pallidorozeum*, o por VF (ambos) en el cafetal de Tizal.

<b>mes</b>	<b>V</b>	<b>F</b>	<b>VF</b>
feb 1997	23	26	1
mar	62	18	9
abr	19	33	4
may	3	26	3
jun	4	10	2
jul	0	0	1
ago	3	5	2
sep	5	1	1
oct	59	12	2
nov	140	15	5
dic	126	6	4
ene 1998	252	13	30
feb	80	25	5
mar	65	19	8
abr	16	24	2
may	1	6	0
jun	0	0	0
jul	0	0	0
ago	0	0	0
sep	0	0	0
oct	0	0	0
nov	0	0	0
dic	0	0	0
ene 1999	0	0	0
feb	0	0	0
mar	0	0	0
abr	0	0	0
may	0	0	0
jun	0	0	0
jul	0	0	0
ago	0	0	0

**Tabla 6.** Grado de daño de las pústulas de roya causado por los micoparásitos en el cafetal de Xico. V: varios hongos con micelio blanco, F: *Fusarium pallidoroseum*, VF: ambos tipos de hongos.

Mes	Escala Hongo	maduras			viejas		
		a	b	c	a	b	c
feb 1997	V	11	3	0	9	8	1
	F	0	0	0	28	18	1
mar	V	1	1	0	18	3	0
	F	0	0	0	16	1	0
abr	V	2	2	0	11	3	0
	F	0	0	0	3	2	0
may	V	3	1	0	4	2	3
	F	0	0	0	2	0	0
jun	V	3	0	0	1	0	0
	F	0	0	0	1	3	0
jul	V	0	0	0	5	0	0
	F	0	0	0	1	0	0
ago	V	1	0	0	6	0	0
	F	0	0	0	9	0	0
sep	VF	0	0	0	0	1	0
	V	3	0	0	6	1	0
oct	F	0	0	0	0	0	0
	VF	0	0	0	1	0	0
nov	V	14	3	0	13	0	1
	F	0	0	0	5	0	0
dic	VF	0	0	0	7	2	0
	V	18	8	0	11	6	0
ene 1998	F	0	0	0	6	0	0
	VF	0	0	0	13	0	0
feb	V	12	2	0	28	18	0
	F	0	0	0	1	0	0
mar	VF	0	0	0	0	0	0
	V	7	0	0	23	3	0
abr	F	0	0	0	5	1	0
	VF	0	0	0	17	1	0
may	V	0	0	0	19	3	0
	F	0	0	0	7	2	7
jun	VF	0	0	0	0	0	0
	V	5	0	0	34	2	0
jul	F	0	0	0	29	17	0
	VF	0	0	0	4	0	0
ago	V	13	0	0	16	5	0
	F	0	0	0	16	10	0
sep	VF	0	0	0	3	0	0

	V	3	0	0	14	4	0
may	F	0	0	0	9	4	0
	VF	0	0	0	2	2	0
	V	0	0	0	4	0	0
jun	F	0	0	0	3	2	0
	VF	0	0	0	0	0	0
	V	1	0	0	1	0	0
jul	F	0	0	0	12	0	0
	VF	0	0	0	0	0	0
	V	0	0	0	0	0	0
ago	F	0	0	0	1	0	0
	VF	0	0	0	0	0	0
	V	0	1	0	0	0	0
sep	F	0	0	0	4	0	0
	VF	0	0	0	0	0	0
	V	2	0	0	1	1	0
oct	F	0	0	0	6	1	0
	VF	0	0	0	0	0	0
	V	0	0	0	4	3	0
nov	F	0	0	0	7	1	0
	VF	0	0	0	0	0	0
	V	0	0	0	3	1	0
dic	F	0	0	0	9	1	0
	VF	0	0	0	0	0	0
	V	0	0	0	4	1	0
ene 1999	F	0	0	0	44	1	0
	VF	0	0	0	2	0	0
	V	1	0	0	14	5	0
feb	F	0	0	0	59	16	0
	VF	0	0	0	0	0	0
	V	1	0	0	1	0	0
mar	F	0	0	0	30	1	1
	VF	0	0	0	1	0	0
	V	0	0	0	1	0	0
abr	F	0	0	0	14	1	0
	V	0	0	0	3	2	0
may	F	0	0	0	22	3	0
	V	0	0	0	0	0	0
jun	F	0	0	0	6	0	0
	V	0	0	0	0	0	0
jul	F	0	0	0	5	0	0
	V	0	0	0	0	0	0
ago	F	0	0	0	2	0	0

Escala de micoparasitismo, a: escaso; b: regular; c: abundante.

**Tabla 7.** Grado de daño de las pústulas de roya causado por los micoparásitos en el cafetal de Tizal. V: varios hongos con micelio blanco, F: *F. pallidoroseum*, VF: ambos tipos de hongos.

Mes	Escala	maduras			viejas		
		a	b	c	a	b	c
Hongo							
feb 1997	V	7	8	2	2	3	1
	F	0	0	0	11	5	10
	VF	0	0	0	0	0	1
mar	V	23	14	0	17	8	0
	F	0	0	0	16	2	0
	VF	0	0	0	6	3	0
abr	V	5	3	0	7	4	0
	F	0	0	0	15	18	0
	VF	0	0	0	3	1	0
may	V	1	0	0	2	0	0
	F	0	0	0	26	0	0
	VF	0	0	0	3	0	0
jun	V	0	0	0	3	1	0
	F	0	0	0	5	5	0
	VF	0	0	0	2	0	0
jul	V	0	0	0	0	0	0
	F	0	0	0	0	0	0
	VF	0	0	0	1	0	0
ago	V	0	0	0	2	1	0
	F	0	0	0	4	1	0
	VF	0	0	0	2	0	0
sep	V	0	0	0	5	0	0
	F	0	0	0	1	0	0
	VF	0	0	0	1	0	0
oct	V	28	1	0	29	1	0
	F	0	0	0	12	0	0
	VF	0	0	0	2	0	0
nov	V	82	2	0	27	29	0
	F	0	0	0	10	5	0
	VF	0	0	0	5	0	0
dic	V	79	1	0	41	5	0
	F	1	0	0	5	0	0
	VF	0	0	0	0	0	0
ene 1998	V	181	2	0	45	7	0
	F	0	0	0	12	1	0
	VF	0	0	0	28	2	0
feb	V	17	1	0	54	6	0
	F	0	0	0	17	8	0
	VF	0	0	0	5	0	0

mar	V	17	0	0	45	3	0
	F	0	0	0	16	3	0
	VF	0	0	0	7	1	0
abr	V	3	0	0	8	4	1
	F	0	0	0	19	5	0
	VF	0	0	0	0	2	0
may	V	0	0	0	0	1	0
	F	0	0	0	6	0	0
	VF	0	0	0	0	0	0

Escala de micoparasitismo, a: escaso; b: regular; c: abundante. En junio/1998-agosto/1999 no hubo roya en el cafetal.



## CAPÍTULO 4

### LA COMUNIDAD DE LOS MICOPARÁSITOS

#### INTRODUCCIÓN

La revisión exhaustiva de las pústulas de roya del café para determinar a las especies de los micoparásitos que están influyendo directamente en la población de la roya nos permitió encontrar en los cafetales estudiados seis especies de hongos: *Acremonium byssoides*, *Calcarisporium arbuscula*, *C. ovalisporum*, *Fusarium pallidoroseum*, *Lecanicidium lecanii* y *Sporothrix guttuliformis*. Estos micoparásitos son considerados como necrotróficos invasivos debido a que se lleva a cabo una penetración directa de la pared de las estructuras de un hongo por otro, acompañado de la degeneración y muerte del citoplasma de la célula hospedera y el uso de los nutrientes liberados como sustrato durante la infección (Heath, 1987; Jeffries y Young, 1994).

El micelio de estos hongos se ve a simple vista como manchas blancas algodonosas sobre los soros de la roya del café, las cuales contrastan con el color amarillo del conjunto de uredinios, con excepción de *F. pallidoroseum*, que es rosado y con apariencia granulosa debido a que el micelio crece sobre los soros de la roya sin formar una masa micelial. El estudio fenológico nos indicó que la presencia de micoparásitos sobre la roya es variable, como consecuencia de la presencia o ausencia de la roya y de las condiciones climáticas (capítulo 3).

Debido a que cinco de los micoparásitos encontrados sobre la roya desarrollan micelios blancos, resultó difícil identificar a nivel de campo las especies de micoparásitos. Sin embargo, en algunas pústulas viejas se podía distinguir tanto micelio blanco como micelio rosado. Las nuevas preguntas que surgieron fueron ¿Los micoparásitos de la roya

del cafeto se presentan simultáneamente o individualmente? ¿Es posible reconocer algún proceso de colonización y sucesión de los micoparásitos sobre la roya? Si es así, ¿la colonización es jerárquica (siempre el mismo orden) o las especies se alternan?

El objetivo del presente capítulo fue registrar la frecuencia de las especies que constituyen la comunidad de micoparásitos sobre las pústulas de la roya del cafeto y comparar la riqueza de especies de micoparásitos entre los cafetales estudiados.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Análisis de las pústulas al microscopio.** En los cafetales seleccionados (Xico y Tizal) se colectaron al azar 100 hojas con roya en el período de mayor esporulación de ésta (octubre-marzo). Aunque los hongos encontrados como micoparásitos de *Hemileia vastatrix* puedan encontrarse en otras partes del cafetal, como el suelo, éstos sólo fueron colectados sobre las pústulas de la roya, única manera de evaluarlos como micoparásitos en el campo, así como se ha evaluado recientemente en otros estudios la interacción de otros parásitos-micoparásitos, como en el caso de *Ampelomyces* spp., un antagonista natural del mildiú polvoso (Kiss *et al.*, 2004).

Cada hoja fue revisada a los microscopios estereoscópico y compuesto, para saber con certeza a cual especie de hongo correspondían las manchas blancas. La frecuencia de los micoparásitos sobre las pústulas maduras y viejas se obtuvo tomando los siguientes datos de las pústulas en las 100 hojas con roya colectadas: número de pústulas por hoja, edad (jóvenes, maduras y viejas) presencia o ausencia de micoparásitos, intensidad de daño del micoparásito (escaso: cuando a simple vista se observa una ligera mancha blanca sobre 30% de la pústula entre, 1-2 mm de diámetro, regular: la mancha blanca cubre 50% de la

pústula, abundante: el desarrollo del micelio del micoparásito cubre 100% de la pústula) y determinación del hongo. Para diferenciar la presencia de los diferentes micoparásitos se anotaron con las siguientes siglas: **LI** (*Lecanicidium lecanii*), **Ca** (*Calcarisporium ovalisporum*), **A** (*Acremonium byssoides*), **F** (*Fusarium pallidoroseum*) y **S** (*Sporothrix guttuliformis*). La riqueza de los micoparásitos fue analizada con el programa Diversity (Henderson y Seaby, 1998) con base en el número de los diferentes hongos encontrados parasitando las pústulas de roya en las hojas colectadas. Se calculó la diversidad de especies de hongos a través del Índice de Simpson y los rangos de abundancia con los datos de marzo de cada localidad y los datos de Xico tomados durante ocho meses. La riqueza de especies de micoparásitos entre ambas localidades fue comparada utilizando la prueba de heterogenicidad de Colman, del programa antes mencionado.

## **RESULTADOS**

El análisis microscópico de los micoparásitos de la roya nos indicó que los cinco hongos *A. byssoides*, *C. ovalisporum*, *F. pallidoroseum*, *L. lecanii* y *S. guttuliformis* se pueden encontrar de manera individual sobre las pústulas de la roya. También se pueden encontrar por pares en la misma pústula, las combinaciones más frecuentes son *A. byssoides-F. pallidoroseum*, *A. byssoides-S. guttuliformis*, *S. guttuliformis-C. ovalisporum* y *S. guttuliformis-F. pallidoroseum*. En raras ocasiones se pueden encontrar hasta tres hongos al mismo tiempo, como en el cafetal de Tizal donde estaba presente *Cladosporium* sp., el cual se aprecia como un micelio grisáceo sobre las pústulas, en la combinación *A. byssoides-S. guttuliformis-Cladosporium*. Los hongos *C. ovalisporum*, *L. lecanii* y *Sporothrix guttuliformis* son los que se encontraron tanto en las pústulas maduras como en las viejas y

*A. byssoides* y *F. pallidoroseum* sólo se encontraron sobre las pústulas viejas. *A. byssoides* se encontró sólo cuando había mayor cantidad de hongos micoparásitos. El mayor número de pústulas viejas se encontraron micoparasitadas por *F. pallidoroseum* y en menor número por los demás hongos.

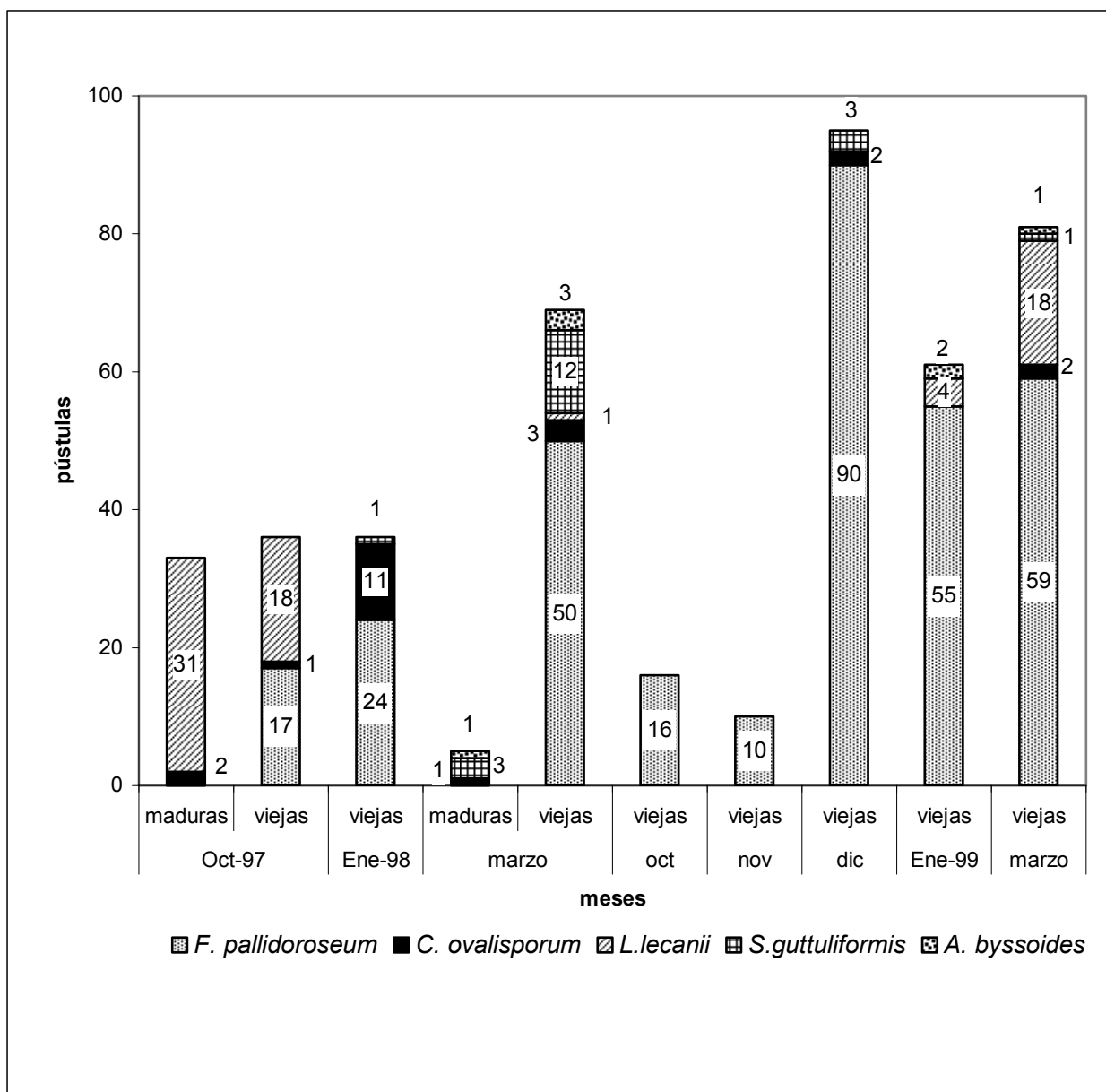


Fig. 1. Frecuencia de micoparásitos sobre las pústulas de roya en el cafetal de Xico, en 100 hojas enfermas, separadas por categorías de edad (maduras y viejas).

El número de especies de micoparásitos registrados en Xico fue variable en las muestras revisadas (Fig. 1). Entre octubre y diciembre 1998 (inicio de la mayor esporulación de la roya) se encontraron de una a tres especies. La mayor diversidad de las especies de micoparásitos se encontró en marzo (cinco hongos) y sobre las pústulas viejas (Índice de Simpson, marzo: 2) y la menor diversidad en octubre y noviembre (Índice de Simpson, 1). El rango de abundancia fue diferente para cada mes (Figura 2).

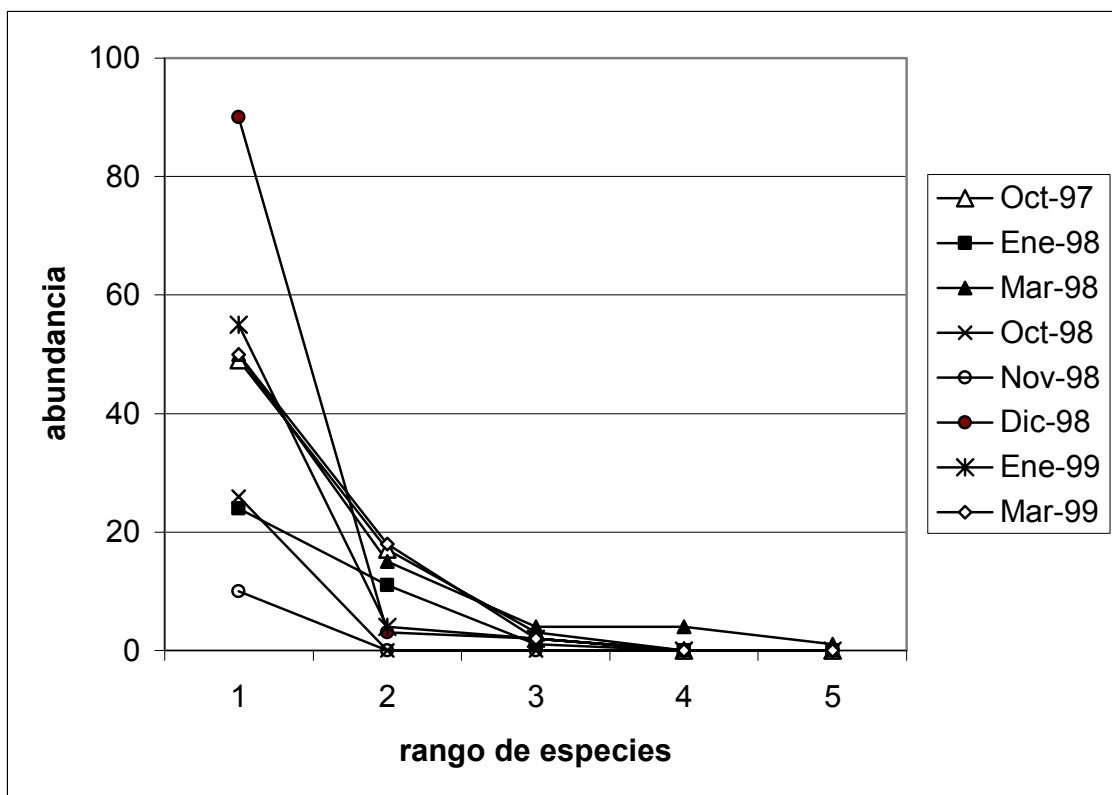


Fig. 2. Rango de abundancia de especies en Xico en ocho meses de estudio.

Para el mes de marzo, sobre las pústulas maduras en Xico se registraron tres especies y en Tizal cuatro (Índice Simpson, Xico: 2.92, Tizal: 3.3). Sobre las pústulas viejas en ambos cafetales se registraron cinco especies, pero la mayor diversidad se presentó en Tizal (Índice de Simpson, Xico: 1.6, Tizal: 4.6). En Xico no se registró *L. lecanii* y en Tizal no se registró *C. ovalisporum*). El límite de abundancia para pústulas micoparasitadas maduras y

viejas fue mayor en Tizal que en Xico (Fig. 3). La prueba de heterogenicidad de Colman (5.87) indicó que no hay diferencia entre la riqueza de especies entre localidades; en ambas localidades se encontraron cinco especies (Tabla 1). La abundancia de cada especie en el mes de marzo fue diferente (cuando se encontraron todos los hongos). La presencia de *L. lecanii* no fue tan abundante como se esperaba. En Xico, *Fusarium pallidoroseum* y *S. guttuliformis* fueron los hongos con mayor abundancia proporcional en las muestras revisadas (Tabla 1). En el Tizal los hongos con mayor abundancia proporcional fueron *S. guttuliformis* y *A. byssoides* (Tabla 1).

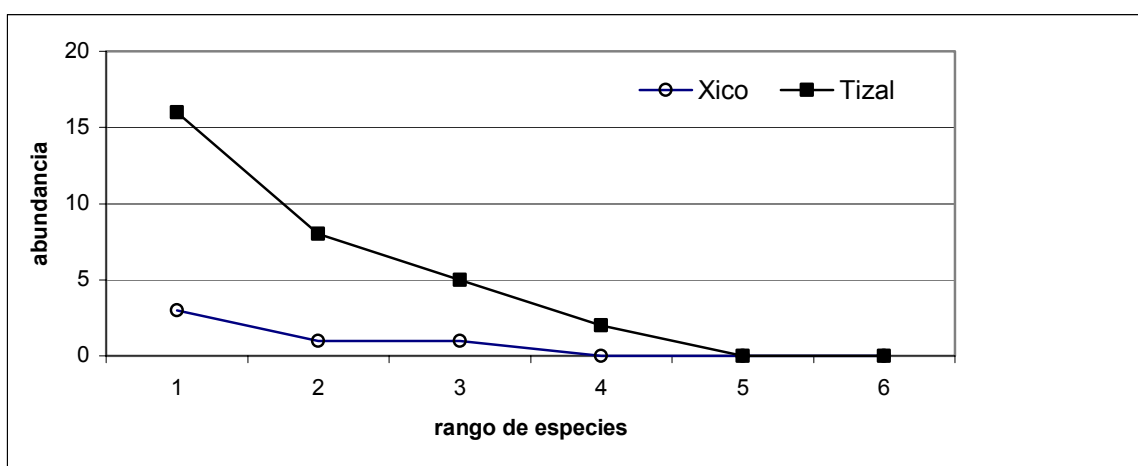


Fig. 3. Rango de abundancia de especies entre los cafetales (Xico y Tizal).

Tabla 1. Abundancia proporcional del número de individuos de micoparásitos de la roya en dos localidades (Xico y Tizal).

Localidad	Xico		Tizal	
	ni	pi	ni	pi
<i>Acremonium byssoides</i>	4	0.048	27	0.203
<i>Calcarisporium ovalisporum</i>	4	0.048	0	0.000
<i>Fusarium pallidoroseum</i>	51	0.621	17	0.127
<i>Sporothrix guttuliformis</i>	12	0.146	48	0.360
<i>Lecanicidium lecanii</i>	0	0.000	19	0.142
<i>Cladosporium sp.</i>	1	0.012	22	0.165
Número total de individuos (N)	82		133	
Número total de especies (S)	S = 5		S = 5	

ni= número de individuos de la especie *i*; pi= abundancia proporcional de la especie *i* ( $pi=ni/N$ ).

## DISCUSIÓN

Las pústulas de roya soportan una comunidad diversa de micoparásitos. Los micoparásitos tardan en establecerse sobre la roya, ya que al principio de la esporulación no se encontraron todas las especies en el conjunto de hojas colectadas. Tanto la riqueza de especies como la abundancia proporcional son considerablemente más bajas al inicio de la esporulación de la roya. Al parecer cuando más especies de micoparásitos se presentan es menor la abundancia de estas. Así, la estructura de la comunidad emerge a través de un proceso de ordenamiento, ya que un ambiente heterogéneo puede soportar una comunidad diversa y cada especie tiende a predominar en un hábitat donde crece mejor que otras (Bell, 2001). Los hongos encontrados al mismo tiempo sobre las pústulas pueden ser la evidencia de un proceso de sucesión dentro del grupo de micoparásitos.

A nivel de pústulas maduras no parece haber una especie dominante, ya que el número de pústulas micoparasitadas fue pequeño. Aunque todos son importantes en la comunidad de micoparásitos, *F. pallidoroseum* puede ser la especie determinante en la localidad de Xico, ya que fue el más abundante y su presencia sólo en las pústulas viejas es importante en el funcionamiento del agroecosistema. Las combinaciones de dos y hasta tres hongos son un indicativo de una sucesión, posible competencia entre los micoparásitos por el recurso, o de una red trófica. Sin embargo, el tipo de interacción entre estos micoparásitos no se conocía, por lo que se planteó su estudio en el siguiente capítulo.

#### LITERATURA CITADA

- Bell, G., 2001. Neutral macroecology. *Science* 293: 2413-2418.
- Heath, M.C., 1987. Evolution of parasitism in the fungi. *In*: Evolutionary Biology of the Fungi (eds. A.D. H. Rayner, C.M. Grasier y D. Moon). Symposium of the British Mycological Society, Cambridge University Press, Nueva York, pp. 149-160.
- Henderson, P.A. y R.M.H. Seaby, 1998. Diversity. Pisces Conservation Ltd, IRC House, Pennington, Lymington, Reino Unido.
- Jeffries, P. y T.W.K. Young, 1994. **Interfungal Parasitic Relationships**. CAB International Mycological Institute. Wallingford. Reino Unido. pp. 296.
- Kiss, L. , J.C. Russell, O. Szentiványi, X. Xu y P. Jeffries, 2004. Biology and biocontrol potencial of *Ampelomyces* mycoparasites, natural antagonists of powdery mildew fungi. *Biocontrol Science and Technology* 14: 635-651.



## CAPÍTULO 5

### CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE MICOPARÁSITOS DE LA ROYA DEL CAFETO Y SU INTERACCIÓN *IN VITRO*

#### INTRODUCCIÓN

Los hongos encontrados como micoparásitos de la roya del café tienen preferencia por diferentes hospederos, ya sean hongos, insectos o detritos (Carrión y Rico-Gray, 2002). Esto puede ser un indicativo de que las especies están divergentemente adaptadas a diferentes condiciones de crecimiento (Bell, 2001). Sin embargo, tienen en común a las urediniosporas de la roya del café como hospedero o sustrato. Como se vio en el capítulo 4, tanto la presencia como la abundancia de los micoparásitos es variable en el tiempo. La presencia de los micoparásitos puede estar más asociada a la cantidad del recurso (roya) y a las condiciones ambientales. Sin embargo, la abundancia de los diferentes micoparásitos puede estar más relacionada con el tipo de interacción que hay entre ellos. El crecimiento rápido de un hongo en medios de cultivo está asociado a los hongos saprobios, y el crecimiento lento a los que necesitan ciertas sustancias que sólo obtienen de los hongos vivos para su crecimiento. ¿Cuál es el comportamiento de estos hongos en cuanto a velocidad de crecimiento, en las mismas condiciones?

Debido a que algunas pústulas se encontraron micoparasitadas con un hongo y otras con dos, y raramente con tres hongos, surgieron nuevas preguntas. En el período de mayor esporulación hay suficientes recursos (esporas de roya), y si todos pueden crecer sobre la roya, ¿por qué no todos se presentan al mismo tiempo y con la misma abundancia? ¿Esta abundancia está relacionada con la velocidad con la que algunos hongos pueden desarrollarse sobre los soros? Si pueden convivir varias especies de micoparásitos ¿Lo hacen secuencialmente o simultáneamente? o Si se presentan por separado ¿Es posible

describir algún sistema por el cual una especie excluya a la otra? y finalmente ¿Los micoparásitos compiten entre ellos?

Si bien todos estos hongos están funcionando como micoparásitos de la roya del café, es importante saber las relaciones de estos hongos hacia el interior de la comunidad. De los micoparásitos encontrados sobre los soros de la roya del café y mencionados en el capítulo 1. El objetivo de este estudio fue evaluar la velocidad de crecimiento de los cinco principales micoparásitos encontrados sobre los soros de la roya del café, en tres diferentes medios de cultivos y compararlas entre sí. Además, conocer el tipo de interacción en el laboratorio a nivel de caja Petri entre las cinco principales especies de micoparásitos encontrados sobre la roya del café. Para lo cual se hicieron crecer individualmente a las cinco especies encontradas en los cafetales estudiados. También se hicieron crecer en cultivos duales en todas las combinaciones posibles, incluyendo aquellas que no se encontraron en los cafetales en la revisión de las pústulas. Los parámetros evaluados fueron la velocidad de crecimiento micelial para los cultivos individuales. Para los cultivos duales además de la velocidad se examinaron las estructuras de los hongos en busca de algún indicio de micoparasitismo entre ellos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Aislamiento.** Se colectaron hojas de café parasitadas con la roya, y cuyos soros esporulan en el envés de las hojas. El conjunto de soros de la roya (pústulas) encontrados con algún otro hongo se llevaron al laboratorio para examinarlos al microscopio estereoscópico. Fragmentos de micelio y/o esporas fueron inoculados para su aislamiento en placas de agar con papa y dextrosa (PDA), agar con extracto de malta (EMA), agar con jugo V8 y agar con zanahoria (AZ). Cultivos puros de estos hongos fueron examinados al microscopio de

luz para corroborar que concordaban con el material de la muestra. Las cepas utilizadas para medir la velocidad de crecimiento fueron *Acremonium byssoides* (cepa IE- 300), *Calcarisporium ovalisporum* (cepa IE-326), *Fusarium pallidoroseum* (cepa IE-340), *Lecanicidium lecanii* (cepa IE-367) y *Sporothrix guttuliformis* (cepa IE-359).

**Caracterización.** Una vez aislados en cultivo puro, el crecimiento del micelio de las cepas de cada una de las especies de micoparásitos encontradas fue evaluado en diferentes medios de cultivo (5 repeticiones). Los medios de cultivo utilizados fueron PDA, EMA y agar con dextrosa y Sabouraud (SAD). Las cajas de Petri con los micoparásitos se mantuvieron a  $21 \pm 2$  °C y con períodos de 12 h luz. El crecimiento de los micelios (mm de diámetro) fue evaluado cada dos días hasta los 24 días en cada medio en dos ejes de crecimiento, y de esta manera obtener mediante la fórmula de la elipse el área total de crecimiento. Las áreas de crecimiento fueron analizadas mediante un análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA) y la prueba de diferencia de medias de Tukey, utilizando el programa estadístico Statistica (StatSoft, Inc. 2000).

**Conservación de cepas de los micoparásitos.** Cada una de las cepas aisladas se hizo crecer en semillas de sorgo esterilizado. Para su conservación se colocaron en crio-viales y se liofilizaron utilizando como protector leche semidescremada (Smith y Onions, 1994). Se mantienen a -30° C en el cepario del Departamento de Biodiversidad y Sistemática del Instituto de Ecología.

**Interacción *in vitro*.** Para observar el comportamiento y registrar el tipo de interacción de los hongos micoparásitos de la roya del cafeto, se colocaron por pares cepas de estos hongos en cajas Petri (5 repeticiones) en todas las combinaciones posibles, con excepción de *Cladosporium* sp. y *Calcarisporium arbuscula*, debido a que el primero fue muy raro encontrarlo y el segundo no se encontró en los cafetales seleccionados para el estudio, sino

en una de las colectas en cafetales lejanos a la zona de estudio. Como tratamiento control cada hongo fue sembrado por separado. Cada dos días durante 20 días se evaluó el crecimiento micelial de cada hongo en mm y se obtuvo el área de crecimiento ( $\text{mm}^2$ ).

Las combinaciones probadas fueron: *A. byssoides* vs. *C. ovalisporum*, *A. byssoides* vs. *F. pallidoroseum*, *A. byssoides* vs. *S. guttuliformis*, *A. byssoides* vs. *V. lecanii*, *V. lecanii* vs. *C. ovalisporum*, *V. lecanii* vs. *F. pallidoroseum*, *V. lecanii* vs. *S. guttuliformis*, *S. guttuliformis* vs. *F. pallidoroseum*, *S. guttuliformis* vs. *C. ovalisporum*, y *F. pallidoroseum* vs. *C. ovalisporum*.

## RESULTADOS

**Velocidad de crecimiento de los micoparásitos en diferentes medios de cultivo.** Los hongos crecieron bien en los tres medios de cultivo PDA, EMA y SAD (Fig. 1, ABC). Cada especie de hongo micoparásito mostró diferente velocidad de crecimiento. Todos los hongos formaron sus estructuras reproductoras desde los primeros tres días de haber sido inoculados. Los hongos que presentaron mayor velocidad de crecimiento y abundante micelio en los tres medios de cultivo fueron *F. pallidoroseum* y *A. byssoides* ( $1964 \text{ mm}^2$  a los ocho y 10 días, respectivamente), en comparación con *S. guttuliformis*, *L. lecanii* y *C. ovalisporum* ( $1964 \text{ mm}^2$  a los 14, 16 y 20 días, respectivamente). El análisis de varianza, tomando en cuenta los factores hongo y medio de cultivo, indicó diferencias significativas del área de crecimiento ( $F_{88, 642} = 12.9$ ,  $P = 0.0001$ ) desde el día seis hasta el día 22, con excepción del día 14 (Tabla 1). Aunque el crecimiento micelial de cada especie en los tres medios de cultivo es similar, *F. pallidoroseum* y *L. lecanii* crecieron mejor sobre SAD; *A. byssoides*, *S. guttuliformis* y *C. ovalisporum* crecieron mejor sobre PDA (Tabla 2).

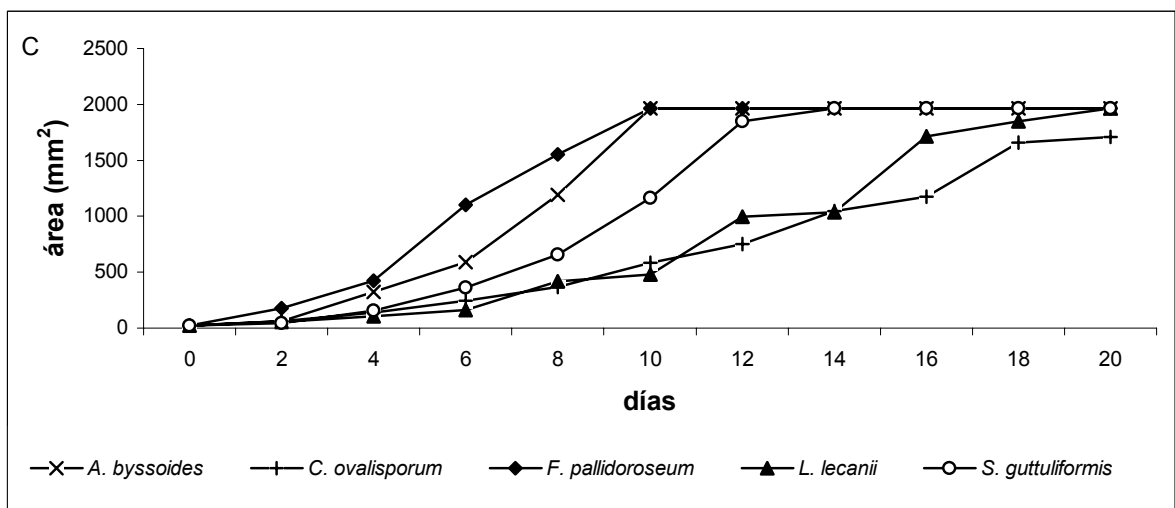
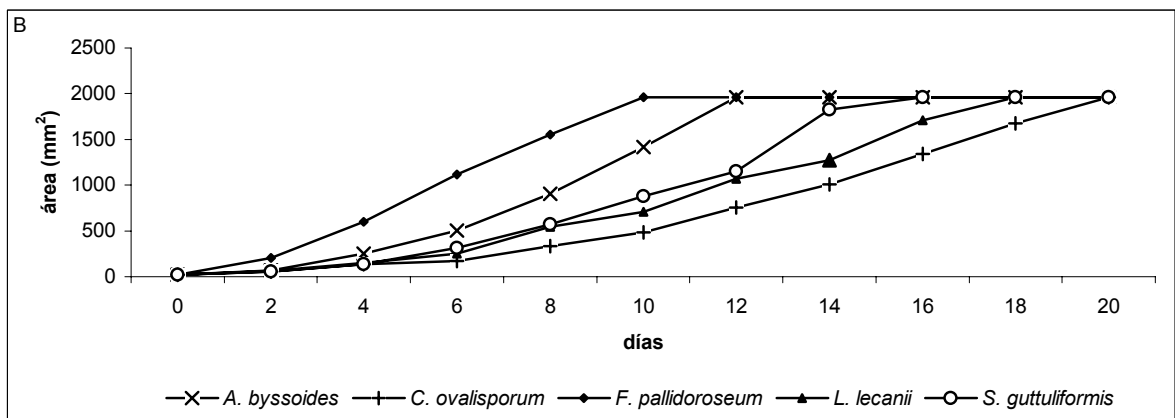
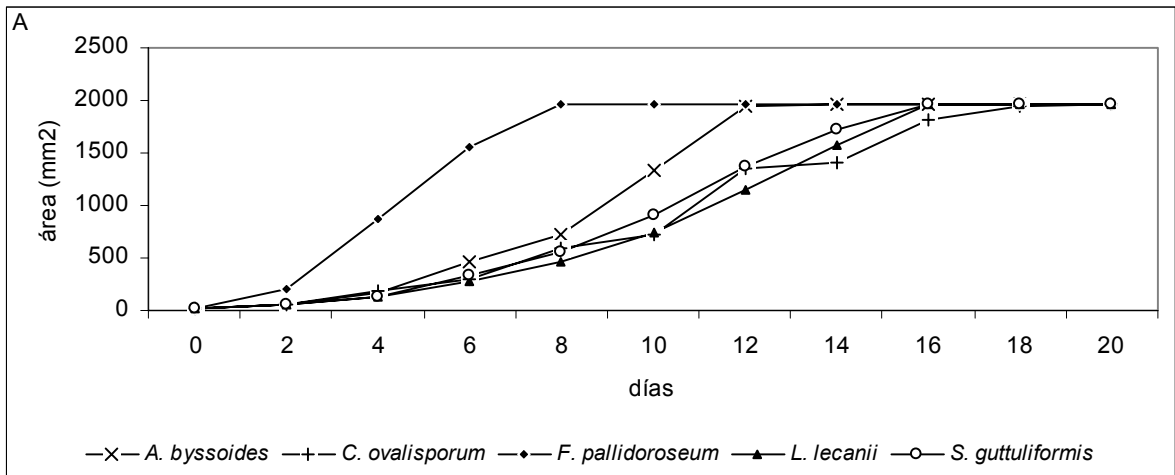


Fig.1. Crecimiento micelial de los micoparásitos de la roya del café en tres medios de cultivo. A: SAD, B: EMA, C: PDA.

Tabla 1. Crecimiento promedio de las cepas de micoparásitos en tres diferentes medios de cultivo.

Hongo/ medio de cultivo	Área de crecimiento micelial (mm <sup>2</sup> ) en días de observación											
	Inicio	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
<i>Acremonium byssoides</i>												
SAD	20	56b	163bc	470cd	722de	1336b	1937a	1964e	1964d	1964c	1964b	1964b
EMA	20	71b	254bc	502cd	908cd	1420b	1964a	1964e	1964d	1964c	1964b	1964b
PDA	20	59b	324bc	588c	1194bc	1964a	1964a	1964e	1964d	1964c	1964b	1964b
<i>Calcarisporium ovalisporum</i>												
SAD	20	53b	188bc	288cd	600de	714de	1360ab	1399cd	1809ab	1950a	1954b	1964b
EMA	20	54b	137c	172d	333e	484f	759b	1011d	1342bc	1679b	1963a	1964b
PDA	20	64b	141c	247cd	370de	584ef	752b	1046d	1173c	1661b	1707a	1963a
<i>Fusarium pallidoroseum</i>												
SAD	20	201a	879a	1556a	1963a	1964g	1964c	1964e	1964d	1964c	1964b	1964b
EMA	20	207a	598ab	1119b	1556ab	1964g	1964c	1964e	1964d	1964c	1964b	1964b
PDA	20	179a	421bc	1104b	1555ab	1964g	1964c	1964e	1964d	1964c	1964b	1964b
<i>Lecanicidium lecanii</i>												
SAD	20	50b	133c	284cd	459de	749de	1147b	1581bc	1963a	1964c	1964b	1964b
EMA	20	59b	148bc	254cd	543de	707de	1071b	1277cd	1707ab	1963a	1964b	1964b
PDA	20	57b	107c	159d	420de	480f	995b	1034d	1713ab	1848ab	1964b	1964b
<i>Sporothrix guttuliformis</i>												
SAD	20	53b	133c	340cd	555de	916cd	1379ab	1720ab	1963a	1964c	1964b	1964b
EMA	20	54b	138c	314cd	575de	880de	1151b	1829a	1963d	1964c	1964b	1964b
PDA	20	47b	157bc	362cd	656cd	1164bc	1847a	1963a	1964d	1964c	1964b	1964b

■ : diferencia significativa

### ***Acremonium byssoides***

El micelio presentó tanto crecimiento aéreo como sumergido, por lo que deforma el medio de cultivo. No presentó crecimiento radial perfecto. En PDA presentó mayor velocidad de crecimiento, por lo que al octavo día ya había alcanzado en promedio 1194 mm<sup>2</sup>, y al décimo día alcanzó 1964 mm<sup>2</sup>; en SAD y EMA la velocidad de crecimiento fue ligeramente menor (Fig.1). La diferencia en el crecimiento micelial de este hongo en los tres medios de cultivo se observó entre los seis y diez días después de la inoculación (Tabla 1).

### ***Calcarisporium ovalisporum***

El micelio de este hongo fue el de menor velocidad de crecimiento en los tres medios, aunque en EMA alcanzó en promedio 1963 mm<sup>2</sup> a los 20 días después de la inoculación. Sobre EMA y SAD creció a una velocidad similar hasta el día 18, pero en PDA no alcanzó a llenar la caja de Petri al día 20. Las diferencias en el crecimiento micelial de este hongo en los tres medios de cultivo se observaron desde el día cuatro hasta el final del experimento (Tabla 1).

### ***Fusarium pallidoroseum***

En los tres medios de cultivo el micelio presentó la misma coloración, blanco rosáceo a blanco rojizo, con algunos tonos amarillentos al principio, hasta llegar al café-rojizo cuando viejo. La velocidad de crecimiento fue mayor en SAD, donde a los ocho días después de la inoculación había alcanzado en promedio 1963 mm<sup>2</sup>. En EMA y PDA alcanzó el mismo crecimiento dos días después. Las diferencias significativas en la velocidad del crecimiento micelial de este hongo en los tres medios se observaron entre los días cuatro y ocho después de la inoculación (Tabla 1).

### ***Lecanicidium lecanii***

El micelio creció de manera similar en los tres medios de cultivo durante los primeros 10 días; se observó en el crecimiento micelial una ligera diferencia en SAD entre los días 14 y 16. Las diferencias significativas en la velocidad del crecimiento micelial de este hongo en los tres medios se observó entre los días 14-16 y los días 14-18 después de la inoculación (Tabla 1).

### ***Sporothrix guttuliformis***

Este hongo desarrolla una capa dura en la superficie del medio. En el reverso de la caja se observaron tonos amarillentos en el centro. No presenta exudados ni olor. En SAD y EMA creció de manera similar durante los 10 días. En PDA el crecimiento fue ligeramente mayor del 8-12 día después de la inoculación, donde se encontraron las diferencias significativas en el crecimiento micelial de este hongo (Tabla 1).

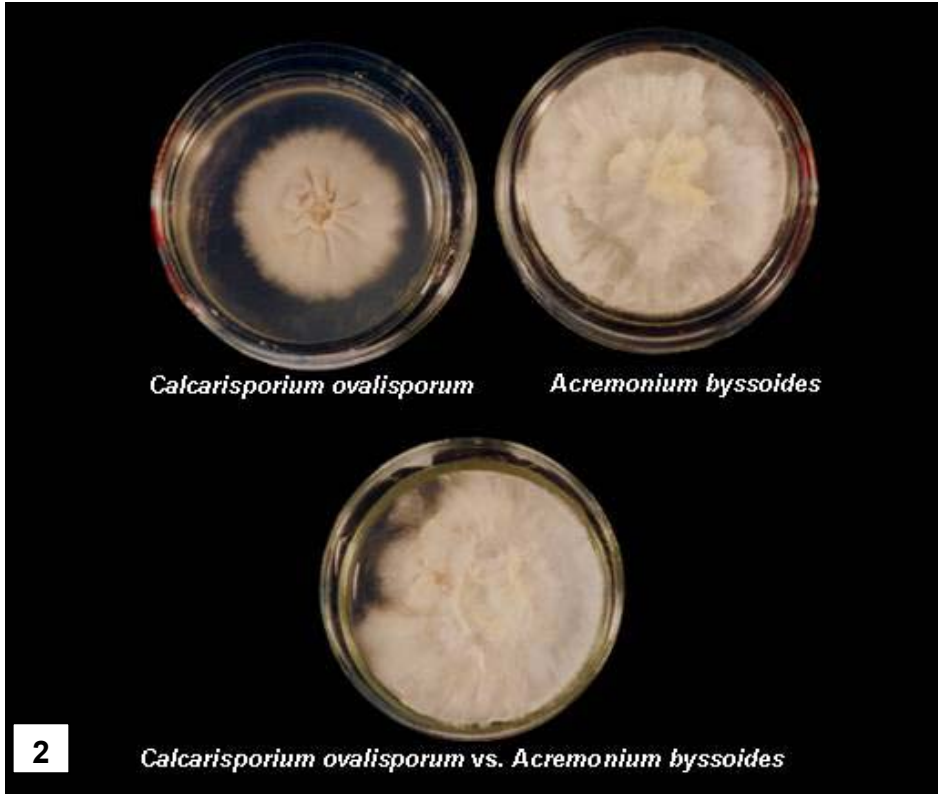
**Interacción *in vitro*.** La confrontación de los micelios de los diferentes hongos por pares, incluyó combinaciones que en la naturaleza no fueron encontradas. Los resultados de este experimento se resumen en la Tabla 2. Los micelios de *A. byssoides* y *F. pallidoroseum*, al igual que en los cultivos individuales, crecieron rápidamente en las placas de medio de cultivo, sin embargo, cuando se les colocó en los cultivos duales el primero tuvo la capacidad de crecer sobre el segundo. En el caso de *S. guttuliformis* y *L. lecanii* cuando estos se hicieron crecer juntos, la velocidad de crecimiento de *L. lecanii* fue mayor a diferencia de lo ocurrido en los cultivos individuales. Posteriormente, el micelio de *S. guttuliformis* creció sobre el de *L. lecanii*. En las interacciones de *C. ovalisporum* con los demás hongos, este creció lentamente como en los cultivos individuales.

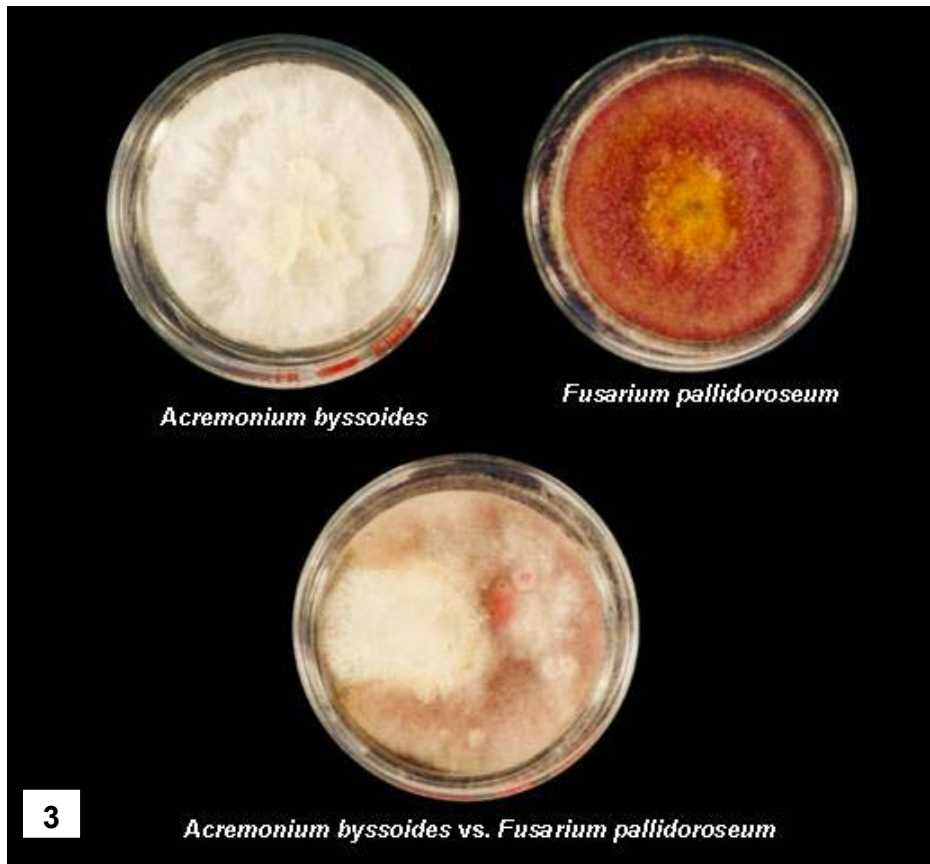


Tabla 2. Interacción *in vitro* de los hongos micoparásitos de la roya del café.

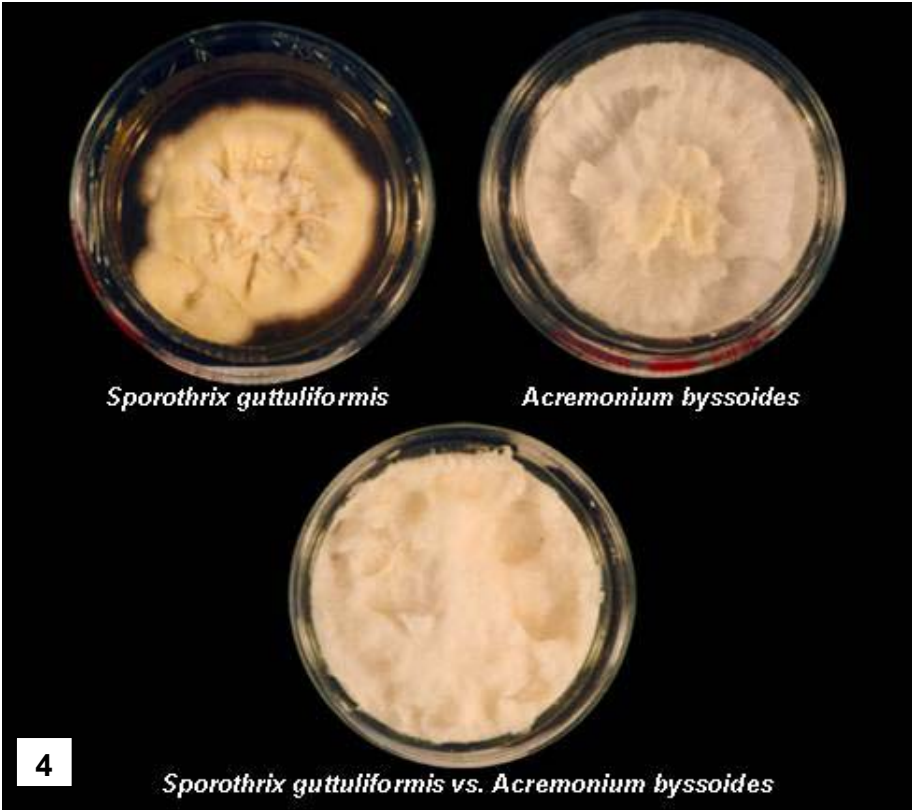
HONGO	Vs.	HONGO
<i>A. byssoides</i> micelio algodonoso, crecimiento aéreo denso (30mm) en 8 días, desplazó al otro hongo.	vs.	<i>C. ovalisporum</i> micelio aéreo, crecimiento (12mm) menor que sin competencia. Fig. 2
<i>A. byssoides</i> micelios algodonosos densos, (25mm), esporulación al séptimo día. Después de 20 días crece sobre <i>F.pallidoroeseum</i>	vs.	<i>F. pallidoroeseum</i> micelios algodonosos densos, crecimiento rápido (50 mm), evita el desarrollo de <i>A. byssoides</i> . Fig. 3
<i>A. byssoides</i> micelio algodonoso denso (50 mm) y fialides muy largas. Fig. 4	vs.	<i>S. guttuliformis</i> crecimiento lento (12 mm) se mantiene inmerso en el medio y esporula antes que <i>A. byssoides</i>
<i>A. byssoides</i> micelio algodonoso denso y aéreo, crecimiento rápido (45mm). Fig. 5	vs.	<i>L. lecanii</i> micelio inmerso, deforma el medio de cultivo, crecimiento (15mm)
<i>L. lecanii</i> más rápido (19 mm) crece en dirección opuesta al encuentro de los micelios, resalta pigmento amarillo en el medio en la zona de contacto, esporula sin invadir a los 8 días, no deformó el medio, cuando hacen contacto los micelios, crece sobre micelio y conidióforos de <i>C.ovalisporum</i>	vs.	<i>C. ovalisporum</i> (12 mm) crece en dirección opuesta al encuentro de los micelios, pigmento amarillo en el medio en la zona de contacto, esporula sin invadir. Conidioforos deformados y aglutinados por el micelio de <i>V. lecanii</i> . Figs. 6-7
<i>L. lecanii</i> 20 mm en 8 días, después de 20 días el micelio creció enrollando el micelio de <i>F. pallidoroeseum</i>	vs.	<i>F. pallidoroeseum</i> el crecimiento rápido (30 mm). Figs. 8-10
<i>L. lecanii</i> micelio crece en dirección opuesta a la zona de contacto de los micelios a 20 mm. que el de <i>S. guttuliformis</i> . Figs. 11-13	vs.	<i>S. guttuliformis</i> crece en dirección opuesta a la zona de contacto de los micelios, 15 mm pigmento amarillo en el medio de cultivo. Crece sobre conidioforos de <i>V.lecanii</i>
<i>S. guttuliformis</i> crece 12 mm, esporulación abundante y forma otros micelios de pequeño diámetro, impide crecimiento de <i>F. pallidoroeseum</i>	vs.	<i>F. pallidoroeseum</i> crecimiento rápido, 20 mm en dirección contraria al micelio, micelio aéreo desaparece del lado donde se encuentra <i>S. guttuliformis</i> . Figs. 14-15
<i>S. guttuliformis</i> crece en dirección opuesta al encuentro de los micelios, crecimiento rápido (16 mm). Cuando los micelios llegan a hacer contacto, crece sobre el micelio de <i>C. ovalisporum</i>	vs.	<i>C. ovalisporum</i> crece en dirección opuesta al encuentro de los micelios, deforma el medio de cultivo al crecer inmerso en el medio (11mm). Fig. 16-18
<i>F. pallidoroeseum</i> crecimiento rápido (50 mm), abundante micelio flooso algodonoso. Fig. 19-21	vs.	<i>C. ovalisporum</i> creció 9 mm, abundante esporulación, crece sobre el micelio de <i>F. pallidoroeseum</i> cuando envejece

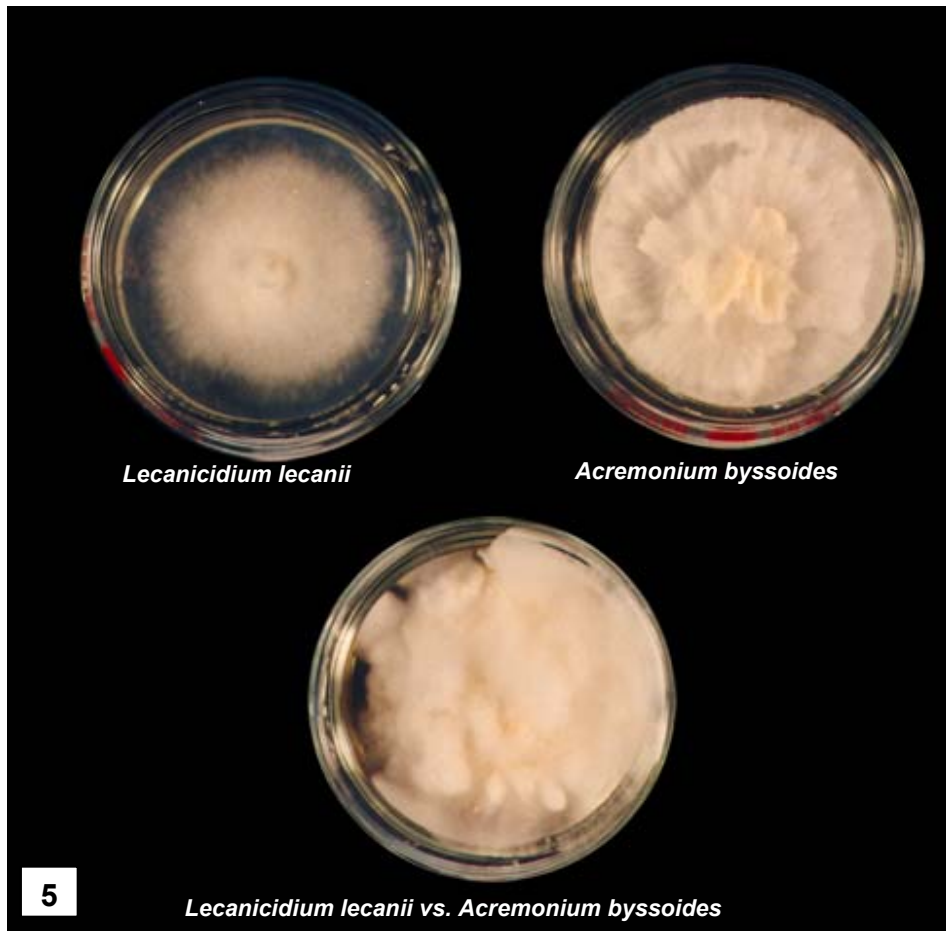
Las especies sombreadas resultaron exitosas en los cultivos duales.



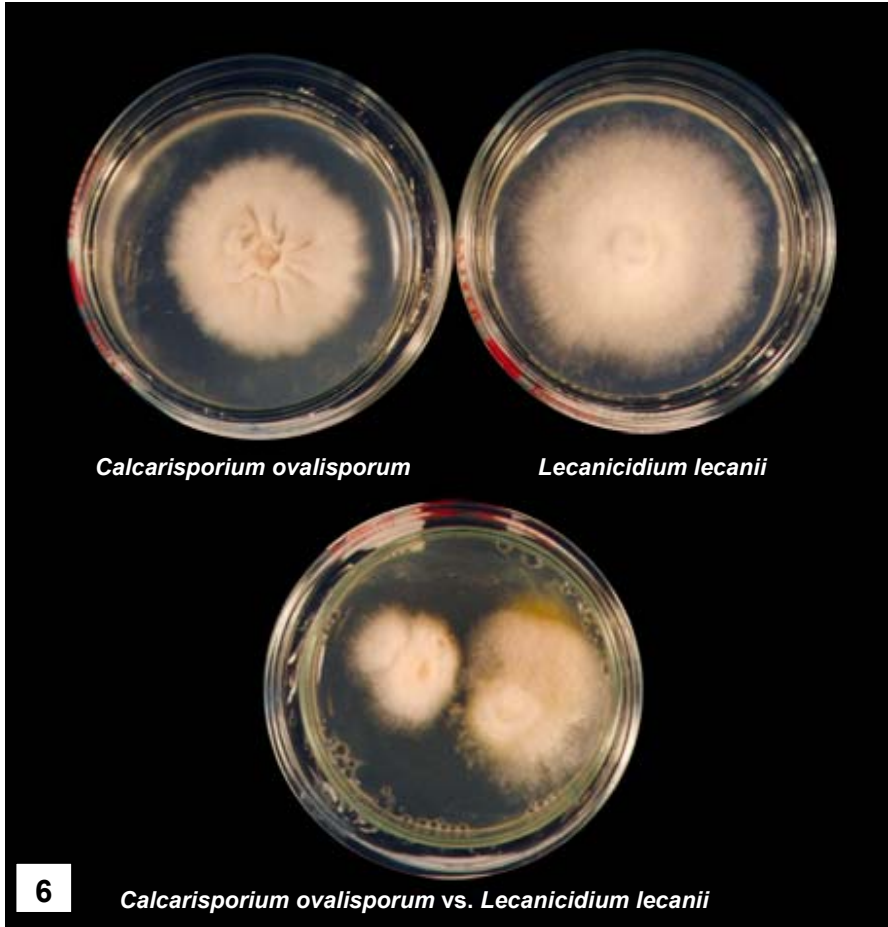


Figuras 2-3. Competencia *in vitro* entre, 2: *Acremonium byssoides* y *Calcarisporium ovalisporum*; 3: *A. byssoides* y *Fusarium pallidoroseum*.

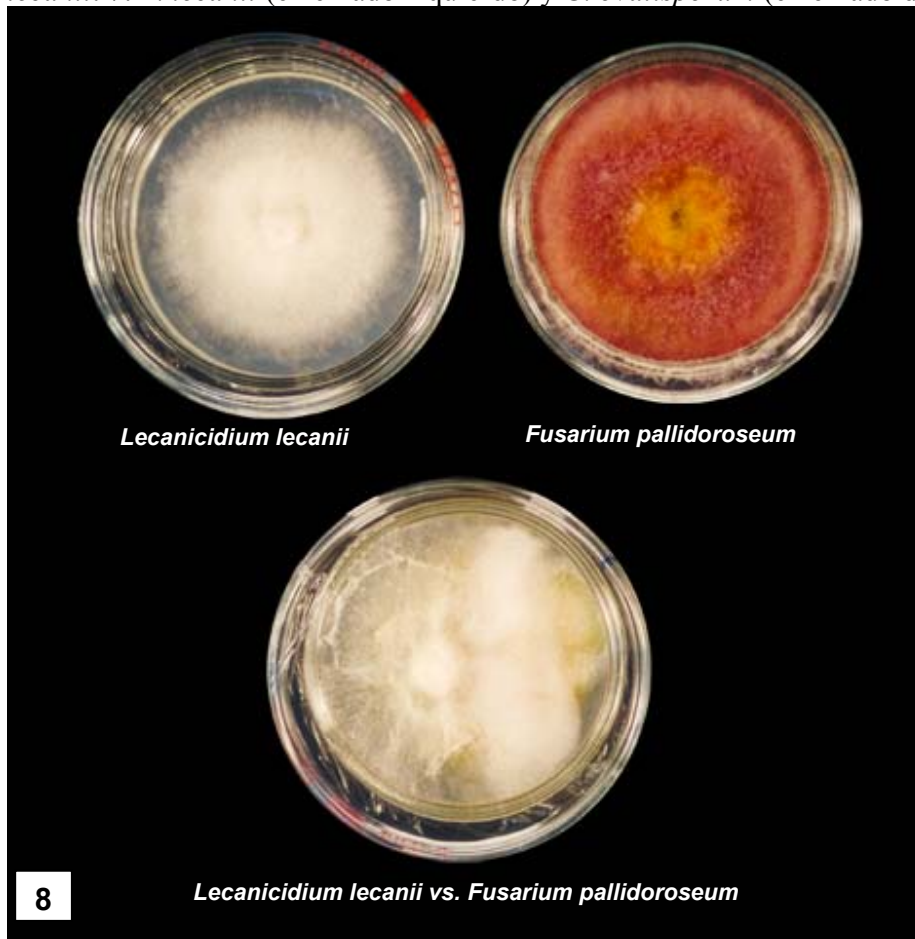




Figuras 4-5. Competencia *in vitro* entre, 4: *Acremonium byssoides* y *Sporothrix guttuliformis*; 5: *A. byssoides* y *Lecanicidium lecanii*.

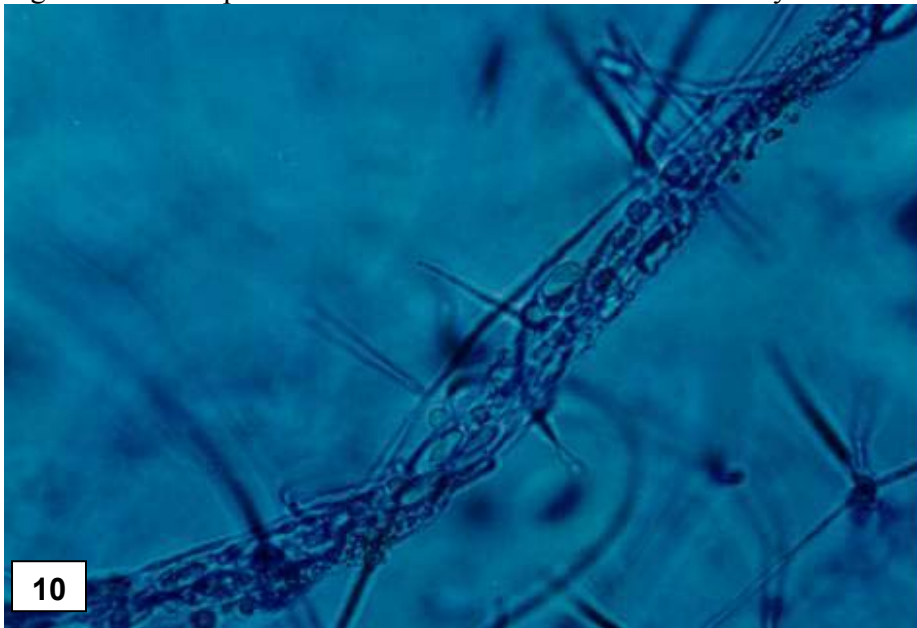


Figuras 6-7. Competencia *in vitro* entre *Calcarisporium ovalisporum* y *Lecanicidium lecanii*. 7: *L. lecanii* (en el lado izquierdo) y *C. ovalisporum* (en el lado derecho).





Figuras 8-9. Competencia *in vitro* entre *Lecanicidium lecanii* y *Fusarium pallidoroseum*.

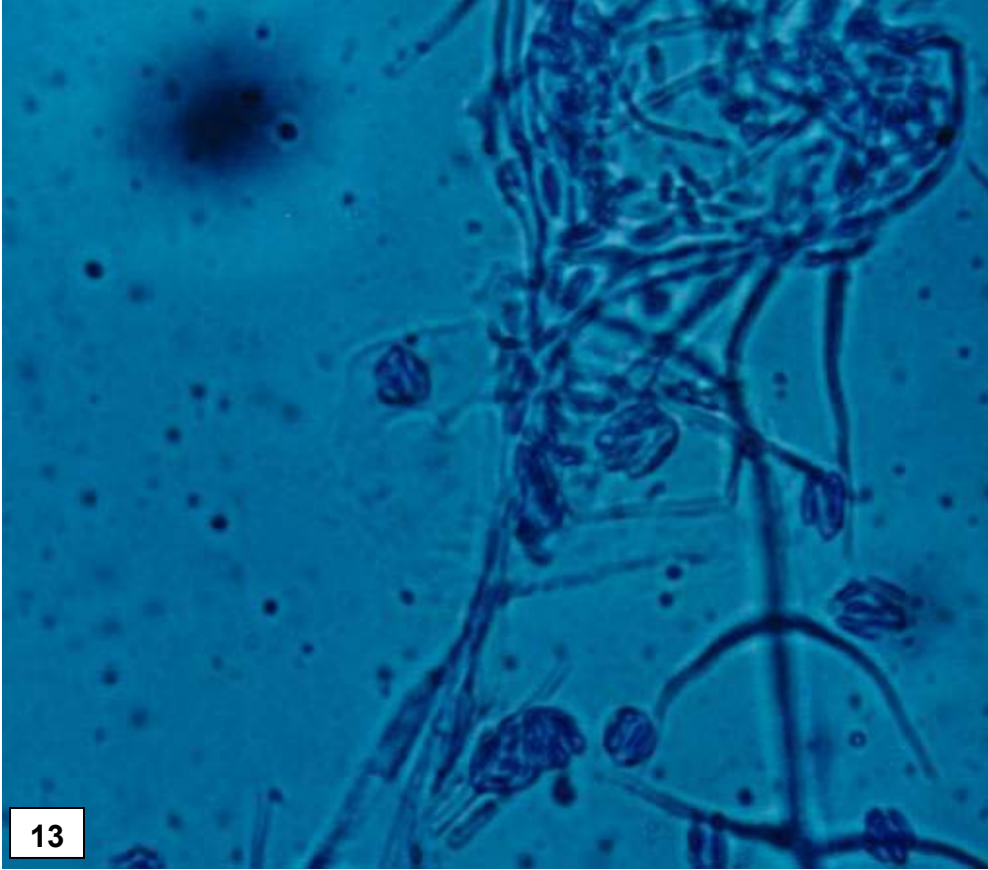






Figuras 10-11. 10: Conidióforos de *Lecanicidium lecanii* desarrollándose sobre el micelio de *Fusarium pallidoroseum*, 1000X; 11: Competencia *in vitro* entre *Sporothrix guttuliformis* y *L. lecanii*

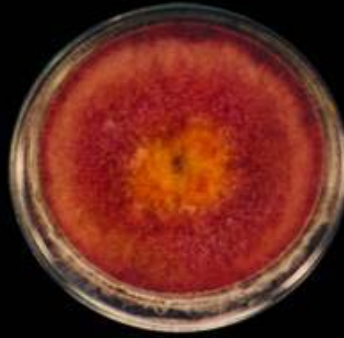




Figuras 12-13. 12: Micelio de *Sporothrix guttuliformis* empezando a crecer sobre el de *Lecanicidium lecanii*; 13: Conidióforos de *L. lecanii* enrollados por el micelio de *Sporothrix guttuliformis*, 1000 X.



*Sporothrix guttuliformis*



*Fusarium pallidroseum*



*Sporothrix guttuliformis vs Fusarium pallidroseum*

14

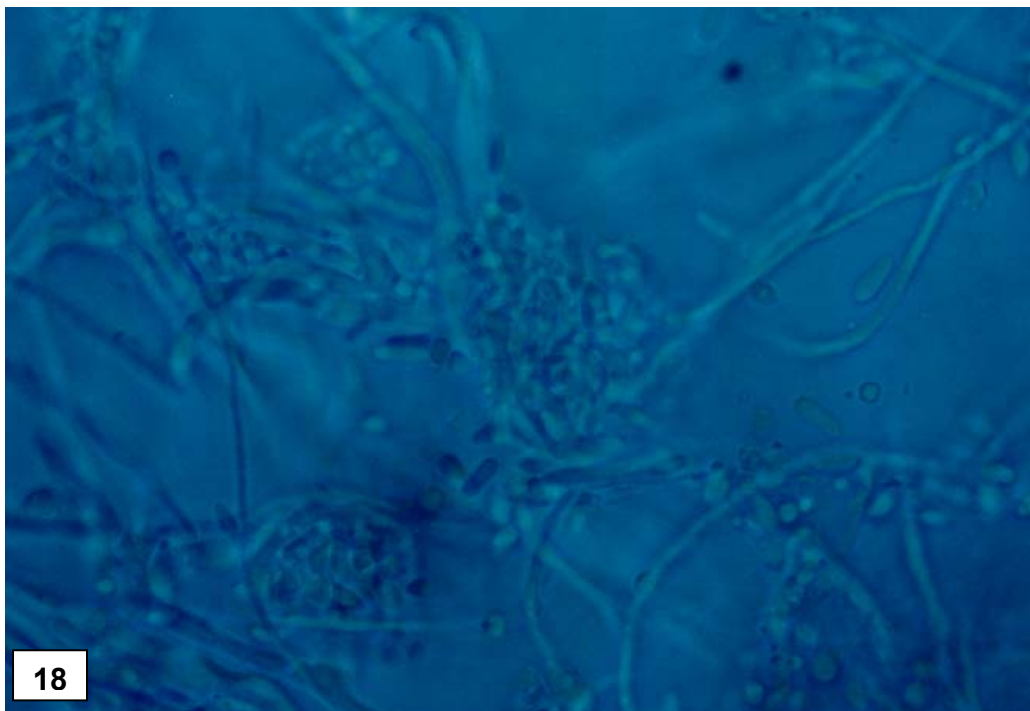


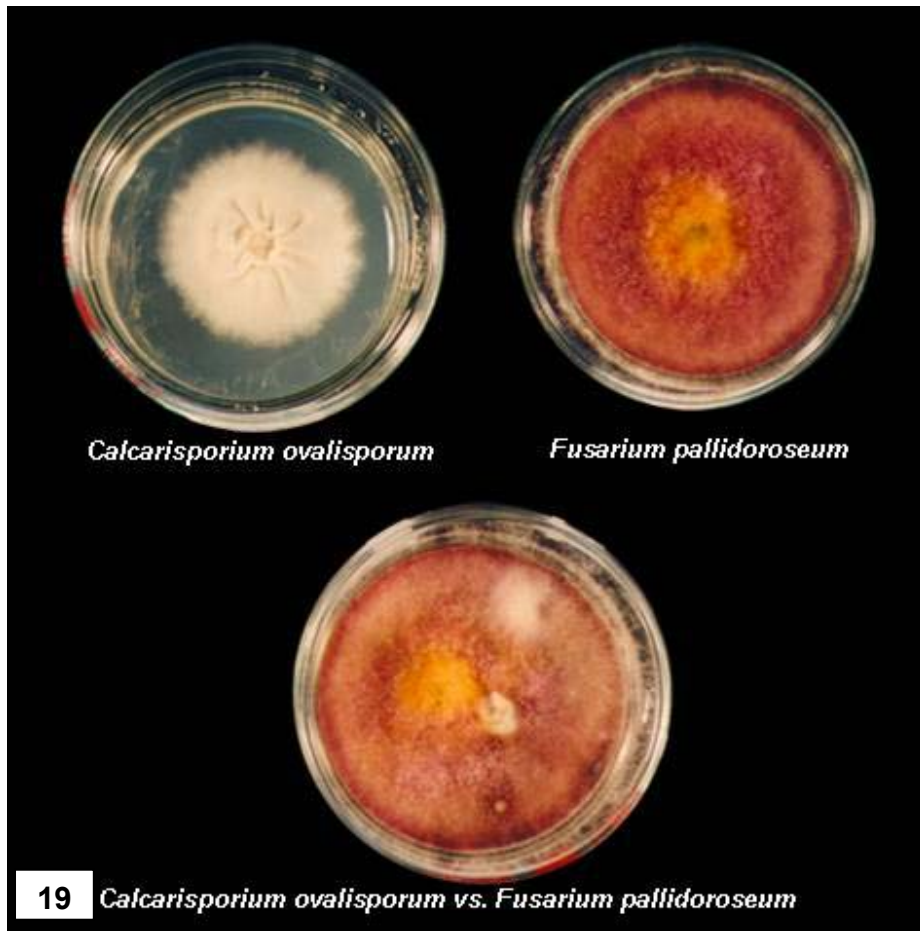
15

Figuras 14-15. Competencia *in vitro* entre *Sporothrix guttuliformis* y *Fusarium pallidoroseum*.



Figuras 16-17. 16: Competencia entre *Sporothrix guttuliformis* y *Calcarisporium ovalisporum*.17: Micelio de *S. guttuliformis* (creciendo en el lado izquierdo) y el de *C. ovalisporum* (en el lado derecho).



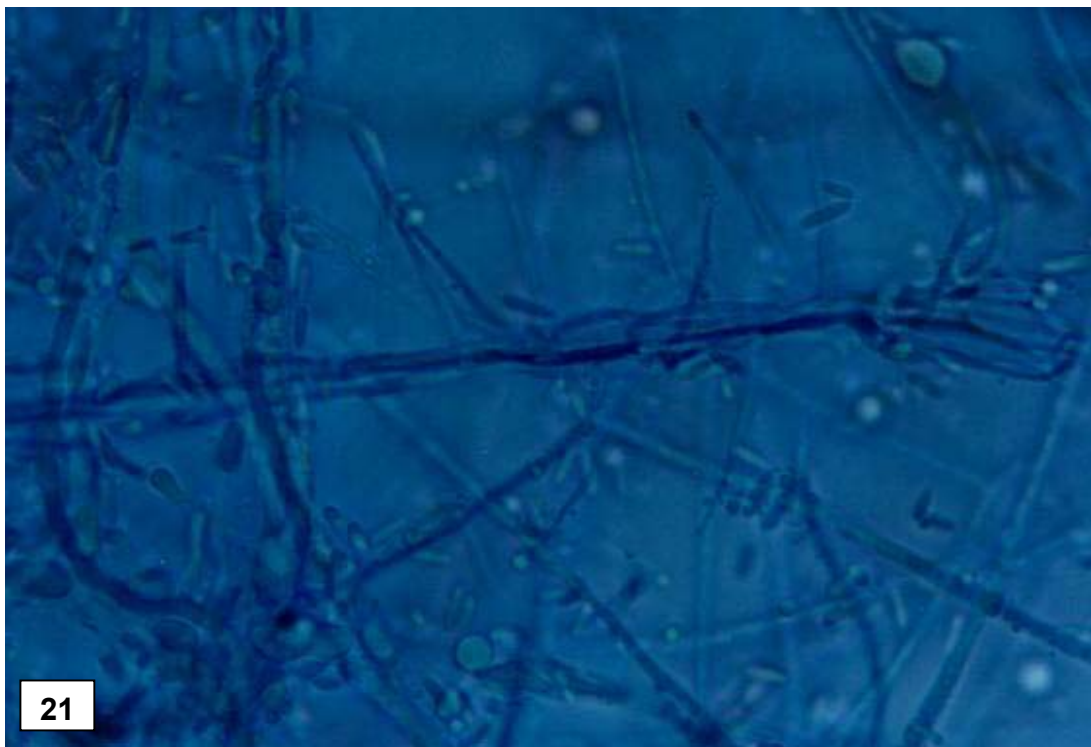


Figuras 18-19. 18: Micelio de *Sporothrix guttuliformis* creciendo sobre el micelio de *Calcarisporium ovalisporum*, 1000X; 19: Competencia *in vitro* entre *C. ovalisporum* y *Fusarium pallidoroseum*.





20



21

Figuras 20-21. 20: Micelio de *Calcarisporium ovalisporum* creciendo sobre el de *Fusarium pallidoroseum*; 21: Conidióforos de *C. ovalisporum* sobre el micelio de *F. pallidoroseum*, 1000X.

## DISCUSIÓN

Tomando en cuenta la velocidad de crecimiento de *F. pallidroseum* y *A. byssoides* en los medios de cultivo y su presencia solamente en las pústulas viejas, probablemente tienen una función saprobia en el cafetal aunque están funcionando en este microsistema como micoparásitos. En cambio *S. guttuliformis*, *L. lecanii* y *C. ovalisporum* crecen muy lento a nivel de medio de cultivo y desarrollan micelios de diámetro pequeño, aunque también son saprobios pues crecen en los medios de cultivo; es probable que dependan más de la presencia de hongos como la roya para su crecimiento.

La presencia simultánea de estos hongos sobre la roya del cafeto, además de ser una relación de micoparásitos hacia la roya, se debe a la relación de micoparasitismo al interior de la comunidad de micoparásitos. Los resultados indican varios tipos de relaciones entre los micoparásitos, competencia por el recurso y el espacio, como es el caso de *A. byssoides* y *F. pallidroseum* con su rápido crecimiento; un fuerte antagonismo de *S. guttuliformis* hacia *F. pallidroseum*, y el micoparasitismo que ejercen entre ellos *S. guttuliformis*, *L. lecanii* y *C. ovalisporum*. De manera que *A. byssoides* a nivel de caja de Petri predomina sobre *C. ovalisporum*, *F. pallidroseum*, *S. guttuliformis* y *L. lecanii*. Mientras que *S. guttuliformis* y *L. lecanii* dominan sobre *C. ovalisporum* y *F. pallidroseum*. Finalmente *C. ovalisporum* puede degradar a *F. pallidroseum* cuando el micelio envejece (Fig.22).

Como vimos en el Capítulo 1, los hongos encontrados como micoparásitos están asociados a diversos grupos de hongos. El rápido crecimiento de *A. byssoides* en medios de cultivo compitiendo con los otros hongos micoparásitos, su presencia sobre las pústulas cuando otros hongos están parasitando la roya del cafeto, y la asociación del género *Acremonium* con varios grupos de hongos, nos hacen pensar que, para crecer, es un hongo saprobio que aprovecha la presencia tanto de la roya como de los micoparásitos. *Sporothrix*

spp. están asociadas a hongos entomopatógenos, por lo que no es extraño que pueda parasitar a *L. lecanii*, el cual también parasita insectos y nemátodos. Hawkins (1994) indicó que para explicar la riqueza de especies en una relación que involucra varios niveles tróficos (por ejem. hospedero-parásito-parasitoide-hiperparasitoide), el patrón más simple sería la existencia de una relación entre el número de especies de hiperparasitoides en un sistema y el número de especies de parasitoides primarios, ya sea porque 1) más especies de parasitoides primarios representan más potencial de recursos para hiperparasitoides, o 2) los hiperparasitoides buscan hospederos que les ofrezcan sustento, del mismo modo como lo hacen los parásitos primarios con sus hospederos, de manera tal que los parásitos son encontrados por muchos parasitoides primarios que también serán encontrados por más hiperparásitoides. Aunque todos los hongos aquí estudiados los consideramos como micoparásitos, entre ellos también se presenta este patrón hospedero-parásito-micoparásito-hiper-micoparásito.

Estudios más detallados sobre la interacción entre estos hongos serían de utilidad en la aplicación de micoparásitos como controladores de enfermedades de plantas. Recientemente la competencia que ejercen las diferentes especies utilizadas como agentes de control biológico está tomando importancia, debido a la necesidad de combatir a la vez plagas y enfermedades, para la producción de productos orgánicos (Krauss et al., 2004).

#### LITERATURA CITADA

- Bell, G., 2001. Neutral macroecology. *Science* 293: 2413-2418.
- Carrión, G. y V. Rico-Gray, 2002. Mycoparasites on the coffee rust in Mexico. *Fungal Diversity* 11: 49-60.
- Hawkins, B.A. 1994. **Pattern and Process in Host-Parasitoid Interactions**. Cambridge University Press, Cambridge. pp 182.

- Jeffries, P. y T.W.K.Young, 1994. **Interfungal Parasitic Relationships**. CAB International Mycological Institute. Wallingford. Reino Unido, pp. 296.
- Krauss, U., E. Hidalgo, C. Arroyo y R. Piper. 2004. Interaction between the entomopathogens *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* and the micoparasites *Clonostachys* spp., *Trichoderma harzianum* and *Lecanicidium lecanii*. *Biocontrol Science and Technology* 14: 331-346.
- Smith, D. y A.H.S. Onions, 1994. **The Preservation and Maintenance of Living Fungi**, 2<sup>nd</sup> edn. IMI Technical Handbooks 2. pp 122. CAB International Mycological Institute. Wallingford. Reino Unido.
- StatSoft, Inc, 2000. *Statistica for Windows*, computer program manual. Tulsa, OK.

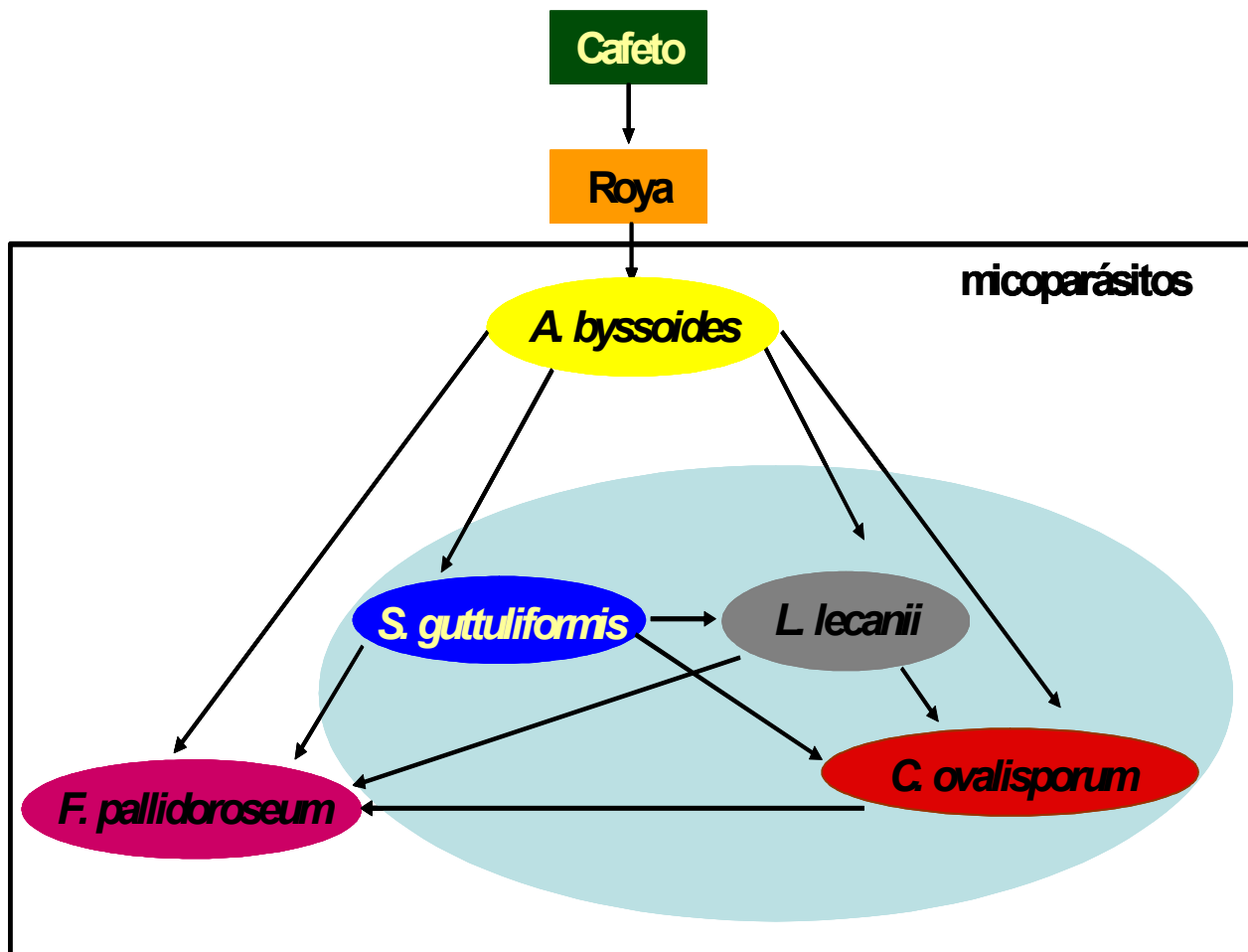


Fig. 22. Diagrama de las interacciones de las especies involucradas en los tres diferentes niveles tróficos. La dirección de las flechas indica el hongo que se alimenta del otro hongo. Hongo encerrado en la elipse azul considerado a manejar en el laboratorio como agentes de control biológico.

## CAPÍTULO 6

### HONGOS ENDÓFITOS DEL CAFETO

#### INTRODUCCIÓN

El encontrar *Acremonium* entre los micoparásitos sugirió que alguno de estos hongos fuera un endófito, ya que especies del género *Acremonium* se han encontrado como endófitos de diversas plantas (Schulz *et al.* 1993; White, 1987). Además, este hongo (*Acremonium*) en algunas ocasiones parece estar saliendo del tejido vegetal que la roya está parasitando. Por lo que la pregunta a responder fue ¿Alguno de los hongos micoparásitos es un hongo endófito?

En la literatura se han registrado como endófito del café solamente a *Phomopsis* sp. (Boddy y Griffith, 1989). El objetivo en este capítulo fue corroborar que los hongos que están funcionando como micoparásitos no vienen del interior de la hoja (endófitos). Para contestar la pregunta planteada se aislaron de hojas sanas de café los hongos endófitos y se determinaron al menos a nivel de género.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Para aislar los hongos endófitos se usó el método de Petrini y Dreyfuss (1981), con modificaciones en los tiempos de lavado. Esta técnica consiste en la esterilización de la superficie de las hojas de manera que el hongo que esté en el interior de la hoja salga a crecer en el medio que se le provea.

Los endófitos fueron aislados de hojas sanas maduras (N= 50) de plantas de *Coffea arabica* colectadas al azar en la localidad del Tizal, Municipio Emiliano Zapata. Cada hoja colectada fue desinfectada primero con etanol al 96% (1 min), después con hipoclorito de sodio al 3% (3 min), posteriormente etanol al 70% (30 seg), por último se enjuagaron con

agua destilada estéril. Se tomaron dos fragmentos (círculos 0.5 cm de diámetro) de cada parte de la hoja (apical, media y basal) y se colocaron en placas de agar con papa y dextrosa (PDA), mantenidas en incubación a  $21 \pm 2^\circ$  C. Los fragmentos se revisaron diariamente para observar el crecimiento de los hongos. Cada una de las diferentes especies de los hongos se aisló para mantenerla en cultivo puro y se determinaron con literatura especializada (Sutton, 1980), al menos a nivel de género. Los aislamientos que no presentaron estructuras reproductoras se presentan como micelios estériles. Cepas de estos hongos se conservan liofilizadas (cuatro réplicas), utilizando leche semidescremada como protector (Smith y Onions, 1994). Las cepas se encuentran depositadas en el cepario del Departamento de Biodiversidad y Sistemática del Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz. Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis (ANOVA de una vía sobre rangos) al número de micelios por especie obtenidos de cada fragmento de hoja por sección (ápice, media, base).

## **RESULTADOS**

El micelio de los hongos endófitos empezó a crecer a los cinco días de haberlos inoculado. En 239 fragmentos de hoja de los 300 inoculados crecieron micelios, en 60 fragmentos no creció nada y de los cuales nueve se contaminaron con bacterias. De cada fragmento salieron de 1-5 micelios, hasta con tres diferentes tipos. Se obtuvieron 418 aislamientos, los cuales quedaron agrupados en 11 diferentes especies. Dos fueron determinados hasta especie, siete hasta género y dos quedaron como no determinados. Ninguno de los hongos encontrados como micoparásitos de la roya del cafeto se encontró como endófito de las hojas del cafeto.

No se encontró diferencia significativa entre el número de especies de hongos obtenidas de las diferentes secciones de la hoja (Kruskal-Wallis ANOVA de una vía sobre rangos, H= 10, g.l.= 10, P = 0.44).

Tabla 1. Frecuencia del número de micelios extraídos de las hojas sanas de *Coffea arabica*.

Especie	Micelios			% ocurrencia		
	ápice	media	base	ápice	media	base
<i>Coniosporium</i> sp 1.	71	80	61	49	59	45
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	27	22	24	18	16	17
<i>Xylaria</i> sp. 2	18	8	12	12	6	9
<i>Hymenopsis</i> sp.	7	6	11	5	4	8
<i>Coniosporium</i> sp. 2.	4	10	10	3	7	7
<i>Xylaria</i> sp. 1	10	3	6	7	2	4
Micelio estéril 1	3	3	4	2	2	3
Micelio estéril 2	1	0	6	1	0	4
<i>Xylaria</i> sp. 3	2	2	1	1	2	1
<i>Phyllosticta bokensis</i>	1	1	2	1	1	1
<i>Penicilium</i> sp.	2	0	0	1	0	0
Total	146	135	137			

#### 1. *Coniosporium* sp 1.

Micelio gris homogéneo, bordes del crecimiento irregulares. Crece muy lento, 2 mm en 6 días. Durante 30 días que se mantuvo en observación, el fragmento de la hoja del café se conservó verde y no hubo síntomas de pudrición. Cepa IEF-46.



2. *Coniosporium* sp. 2.

Micelio gris con tonos amarillentos. Este hongo (35 micelios) también crece muy lento.

3. *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

Micelio algodonoso hialino con conidiomas de color naranja. Crece 11 mm en 6 días. Cepa IEF-44. Walter *et al.* (1993) separaron esta especie por la característica de no ser patógena, a diferencia de la recién descrita por los mismos autores, *C. kahawae*, la cual sí es patógena, además de otras características, como ser menos rápida en su crecimiento, no poder utilizar citratos o tartratos como única fuente de carbono y de no formar un conidioma acervular.

4. *Hymenopsis* sp.

Micelio inmerso y aéreo, hialino al principio, gris verdoso oscuro cuando maduro. El micelio cubre los conidiomas cuando están en formación; posteriormente, cuando maduran los conidiomas, el micelio se reabsorbe. Conidioma acervular, globoso elongado, de 120 x 100  $\mu\text{m}$ ; cuando el conidioma se abre es blanco-amarillento, después se torna gris-negruzco. Células conidiógenas holoblásticas, determinadas, integradas. Setas presentes hasta que los conidiomas abren, de color café oscuro, de 16 x 6  $\mu\text{m}$  en la base de 4  $\mu$ , en el ápice m. Conidios cilíndricos, de 20 x 8  $\mu\text{m}$ . Cepa IEF-43.

5. *Phyllosticta bokensis* (P. Henn.) van der Aa.

Micelio inmerso de color olivo 2F2, que se torna café-oliváceo; el micelio aéreo es gris-verdoso, muy escaso, ambos con crecimiento irregular, no radial. Conidioma picnidial, globoso, solitario o gregario, en la superficie del micelio o inmerso en el medio de cultivo, unilocular, ostiolado, glabro, cuando inmaduro cubierto por micelio blanco, que al madurar

se vuelve de color café oscuro, de 170  $\mu\text{m}$  de altura y 176  $\mu\text{m}$  de ancho, con un pequeño cuello que se abre cuando madura el conidioma, de 17  $\mu\text{m}$  de diám. y 25  $\mu\text{m}$  de altura. Pared de 45-90  $\mu\text{m}$  de espesor. Células conidiógenas de 8-10  $\mu\text{m}$ . Conidios con apéndice y vaina mucilaginosos, ovoides, piriformes, elipsoide, truncados en la base, gutulados, de 10-14 x 7-8  $\mu\text{m}$ . Apéndice de 8-10  $\mu\text{m}$  y la vaina de 2  $\mu\text{m}$  de grosor. Aparentemente esta especie esta descrita como parásita del cafeto.

6. *Xylaria* sp. 1. Micelio blanco plumoso, de 14 mm en 6 días.

7. *Xylaria* sp. 2. Micelio blanco algodonoso.

8. *Xylaria* sp. 3. Micelio flocoso semialgodonoso.

9. **Micelio1**. Algodonoso con filamentos grices.

10. *Penicillium* sp. (verde-azulado). Micelio blanco, con la esporulación verde mate; el medio de cultivo se torna amarillo limón. Crece 4 mm de diám en 13 días. Rápida esporulación. Se mantiene en micelios de diámetros pequeños. Cepa IEF-48.

11. **Micelio 2**. Aéreo, flocoso, semialgodonoso, crecimiento rápido e irregular, de color café. Muy rápido crecimiento. Sólo creció un micelio. Cepa IEF-47.

## DISCUSIÓN

La comunidad de los hongos endófitos de las hojas de cafeto es diferente a la comunidad de los hongos micoparásitos de la roya. De los hongos aislados de los tejidos de las hojas de cafeto, predominaron los hongos del grupo de los Coelomycetes. En los tejidos muy necrosados por cualquier parásito, incluyendo la roya, se detectaron picnidios de *Phomopsis* sp, el cual no se presentó en los micelios aislados de los fragmentos de hojas.

En los dos aislamientos preliminares de los hongos endófitos se aisló *Nigrospora* sp., pero en este experimento no se registró ningún micelio de este hongo. *Nigrospora* sp.

ha sido registrada sobre los frutos del cafeto de Centro América, produciendo una pudrición negra, y se han obtenido esporas de gotas de frutos verdes (Wellman, 1977). Es posible que este hongo no se haya encontrado debido a que para su aislamiento sólo se utilizaron hojas maduras, y está más relacionado con estructuras en estado de descomposición.

Los micelios de las cepas determinadas como *Coniosporium* sp.1 y *Colletotrichum gloeosporioides* fueron los que se presentaron con mayor frecuencia. En general *Coniosporium* sp.1 y sp. 2 fueron fácilmente invadidos por los micelios de otros hongos principalmente, el de *C. gloeosporioides*.

#### LITERATURA CITADA

- Boddy, L. y G.S. Griffith, 1989. Role of endophytes and latent invasion in the development of decay communities in sapwood of angiospermous trees. *Sydowia* 41: 41-73.
- Petrini, O. M. Dreyfuss, 1981. Endophytische Pilze in epiphytischen Araceae, Bromeliaceae und Orchidaceae. *Sydowia* 34: 135-145.
- Schulz, P., U. Wanke, S. Draeger y H.-J. Aust, 1993. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycol. Res.* 97: 1447-1450.
- Smith, D. y A.H.S. Onions, 1994. **The Preservation and Maintenance of Living Fungi.** 2<sup>nd</sup> edn. IMI Technical Handbooks 2. CAB International Mycological Institute. Wallingford. Reino Unido. 122 pp.
- Sutton, B.C., 1980. **The Coelomycetes.** Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, U.K. 626 pp.
- Walter, J.M., P.D. Bridge, R. Black y G. Hakiza, 1993. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. *Mycol. Res.* 97: 989-994.
- Wellman, F.L., 1977. **Dictionary of Tropical American Crops and Their Diseases.** The Scarecrow Press, Inc. Metuchen.
- White, J.F., 1987. Endophyte-host associations in forage grasses. X. Cultural studies on some species of *Acremonium* Sect. *Albo-lanosa*, including a new species, *A. starri*. *Mycotaxon* 30: 87-95.

## DISCUSIÓN GENERAL

A medida que el hombre ha entendido el funcionamiento de los organismos en la naturaleza algunos han sido aprovechados para utilizarlos en su beneficio. Así, algunos hongos parásitos son actualmente utilizados exitosamente como controladores de malezas (Aneja, 1999). Mayor desarrollo han tenido las investigaciones encauzadas a combatir diferentes plagas de insectos, principalmente con los hongos *Verticillium*, *Beauveria* y *Metarrhizium* (Faull, 1999). Sin embargo, el control de los hongos parásitos causantes de enfermedades de plantas, ha tenido con los micoparásitos un avance significativo en los últimos diez años, (Hofstein, 1996; Paulitz y Bélanger, 2001; Bélanger y Labbé, 2002; Kiss, 2003). Un parásito puede tener margen de capacidad para aprovechar dos o más especies de hospederos Thompson (1994). En este caso, la roya del café es altamente específica pues sólo tiene la capacidad para atacar al café. Pero los micoparásitos al parecer tienen la capacidad de atacar a más de una especie. Aunque esto no fue probado en el laboratorio en este trabajo, existe evidencia de esto ya que en trabajos como el de de Ayala-Zermeño *et al.* (2005) al menos una de las cepas de *L. lecanii* aislada de la roya del café fue probada parasitando a la mosquita blanca, presentando una esporulación abundante.

Retomando una de las primeras preguntas que nos hicimos antes de iniciar este trabajo ¿qué estaba pasando en los cafetales que la roya no se convirtió en una enfermedad problema incontrolable? La respuesta la encontramos en los micoparásitos, que representan el tercer nivel trófico. Aunque al inicio del estudio sólo se conocía *L. lecanii* ahora se sabe que 5-7 especies de hongos (*A. byssoides*, *C. arbuscula*, *C. ovalisporum*, *F. pallidoroseum*, *S. guttuliformis* y *Cladosporium* sp.) funcionan como micoparásitos de la roya del café.

En los cafetales de México las esporas de la roya del cafeto al ingresar al agroecosistema y producir como resultado de sus infecciones una gran cantidad de esporas, se convirtieron en una fuente de recursos disponible y abundante para un grupo de hongos, ya que son como pequeños paquetes de energía condensada. Considerando que la roya llegó a México en 1981, los micoparásitos necesitaron relativamente poco tiempo (menos de 16 años, hasta la detección en este trabajo de los diferentes micoparásitos) para utilizar una nueva fuente de recursos. Esto puede indicar cierta plasticidad en el agroecosistema cafetalero debido a su alta diversidad. Los datos obtenidos de la interacción cafeto-roya-micoparásitos muestran que la población de la roya es afectada negativamente por el conjunto de micoparásitos, ya que reduce eficientemente las cantidades de inóculo de esta roya y evita su diseminación, de tal manera que el número de esporas que pueden llegar a realizar una nueva infección es mucho menor, y al haber pequeñas cantidades de inóculo la roya tardará más tiempo para llegar a umbrales económicamente significativos. Actualmente en la mayoría de los cafetales de México no se aplica ningún producto químico (fungicida) en contra de la roya del cafeto, la cual está completamente regulada por la naturaleza de los hongos micoparásitos.

La edad de las pústulas de la roya, como se suponía, también es un factor que influye en su colonización. Sólo las maduras y las viejas son parasitadas y de éstas las viejas aún más. Todos los hongos micoparásitos aquí tratados pueden afectar tanto pústulas maduras como viejas, con excepción de *F. pallidoroseum* y *A. byssoides* que únicamente se encuentran en las pústulas viejas. Esta especialización en cuanto a la madurez o vejez de las estructuras que van a degradar, debe estar más en función de las enzimas que poseen estos hongos para poder degradar la pared.

En resumen la presencia de los micoparásitos sobre la roya esta en función de: 1) la presencia de la roya, la mayor cantidad de micoparásitos coincide con la mayor esporulación de la roya. 2) la edad de las pústulas, los micoparásitos sólo se encuentran sobre las pústulas viejas y maduras. 3) los factores ambientales (precipitación, temperatura, humedad relativa) que favorecen la re-infección y esporulación de la roya, también favorecen el desarrollo de los micoparásitos, por lo tanto, influyen en los tres niveles tróficos: hospedero-parásito-micoparásito. Así la presencia de las especies es variable en el tiempo. Al menos se puede encontrar un micoparásito en el cafetal afectando la roya como sucedió en los meses de octubre y noviembre de 1998 en los que sólo fue encontrado *F. pallidoroseum* en la localidad de Xico. Se puede considerar que la especie persistente en los diferentes estaciones del año es *F. pallidoroseum*, le siguen *C. ovalisporum* y *S. guttuliformis* y el menos abundante y persistente es *L. leanii*. En cuanto a *A. byssoides* se encontró abundante sólo en presencia de los otros cuatro hongos. Es probable que estos hongos micoparásitos sobrevivan de un ciclo de esporulación de roya a otro sobre las pocas pústulas que se encuentran entre abril-septiembre, o en ascomas cuando desarrollan su estado perfecto o como parásitos o saprobios de otros organismos en el suelo.

En cuanto al interior de la comunidad de micoparásitos, éstos se presentan individualmente y por pares, las combinaciones más frecuentes son *A. byssoides-F. pallidoroseum*, *A. byssoides-S. guttuliformis*, *S. guttuliformis-C. ovalisporum* y *S. guttuliformis-F. pallidoroseum*. Las combinaciones que no se encontraron en la naturaleza fueron *A. byssoides-L. leanii* y *A. byssoides-C. ovalisporum*. Tomando en cuenta los resultados de las interacciones *in vitro* de los hongos micoparásitos, en las combinaciones donde *A. byssoides* interactuó con *L. leanii* y *C. ovalisporum*, estos hongos no tuvieron la

oportunidad de competir por los nutrientes por el rápido crecimiento del micelio de *A. byssoides*. Este hongo a nivel de campo se presentó de manera abundante en marzo de 1998 cuando los cuatro hongos restantes estaban presentes. Los hongos que no presentaron propiamente interferencia entre ellos fueron *Lecanicidium lecanii* y *Sporothrix guttuliformis*. Sin embargo, esta combinación es poco frecuente en la naturaleza, sólo se encontró en una pústula en marzo de 1998. En el laboratorio en esta combinación *S. guttuliformis* tuvo la capacidad de parasitar a *L. lecanii*.

De manera general podemos reconocer un proceso de colonización y sucesión de los micoparásitos sobre la roya, el cual aparentemente no tiene un orden específico salvo por el estado de la roya (madura o vieja). Los hongos *C. ovalisporum*, *L. lecanii* y *Sporothrix guttuliformis* son los que principalmente se encuentran en las pústulas maduras y *A. byssoides* y *F. pallidoroseum* son los que se encuentran sólo sobre las pústulas viejas. Tanto el registro de los hongos encontrados al mismo tiempo sobre las pústulas de roya como el experimento de la interacción entre los micoparásitos demuestran que los micoparásitos no conviven sobre la roya, sino que hay una competencia entre ellos por el recurso.

Aunque los hongos aquí presentados son micoparásitos de la roya del cafeto, entre los mismos micoparásitos se presenta parasitismo. Sobre las pústulas se encontraron combinaciones en las cuales a nivel de laboratorio (caja Petri) un hongo puede crecer sobre el otro después de cierto período de tiempo. Así, *A. byssoides* por su rápido crecimiento no sólo evita el desarrollo de *C. ovalisporum*, *F. pallidoroseum*, *L. lecanii* y *S. guttuliformis*, sino que puede crecer sobre ellos. Se tiene evidencia que los dos últimos hongos a nivel de laboratorio pueden ser micoparásitos de *C. ovalisporum*, *F. pallidoroseum*. Finalmente, *C. ovalisporum* tiene la capacidad de parasitar y degradar a *F. pallidoroseum* cuando el micelio ha envejecido.

Si consideramos de entre los micoparásitos quién utiliza a quién como alimento, entonces en el flujo de energía es de *F. pallidoroseum* hacia *C. ovalisporum*, estos dos a su vez son parasitados por *S. guttuliformis* y *L. lecanii*, para ser degradados posteriormente por *A. byssoides*.

Los hongos micoparásitos que se pueden utilizar como agentes de control biológico de enfermedades causadas por royas son *S. guttuliformis*, *L. lecanii* y *C. ovalisporum*, no sólo por sus cualidades de micoparásitos, sino por el manejo a nivel de laboratorio. Aunque *F. pallidoroseum* se encontró con mayor frecuencia sobre los soros de la roya del cafeto y tiene un rápido crecimiento, es parasitado por todos los demás micoparásitos que comparten el recurso, por lo que no se considera apropiado como agente de control.

Los resultados de las evaluaciones indican que los hongos micoparásitos son buenos agentes de control biológico de enfermedades de plantas. La aplicación de los conocimientos generados en este trabajo es muy amplia, ya que se pueden controlar las royas de plantas cultivadas productoras de alimentos básicos (maíz, frijol, trigo) o de aquellos productos que generan divisas por su exportación como plantas ornamentales e incluso especies maderables. Los diversos hongos micoparásitos pueden ser usados para el control de una enfermedad en particular, por medio de estrategias inundativas, con los beneficios de no contaminar suelo y mantos freáticos o que los productos cosechados no contengan alguna sustancia residual.

Por otro lado, este estudio abre un panorama amplio de investigación sobre otras especies de parásitos de plantas con sus micoparásitos, y sobre las interacciones entre esos micoparásitos. Aunque es probable que se encuentren coincidencias en especies de hongos micoparásitos, también es probable que los micoparásitos sean diferentes especies a las encontradas en este sistema roya del cafeto.



### Literatura citada

- Alarcón, R. y G. Carrión, 1994. Uso de *Verticillium lecanii* en cafetales como control biológico de la roya del café. *Fitopatología* 29: 82-85.
- Aneja, K.R., 1999. Biotechnology for the production and enhancement of mycoherbicide potential, pp. 91-114. In : J. Singh y K.R. Aneja. **Enthnomycology to fungal biotechnology. Expliting fungi from natural resources for novel products**. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York.
- Ayala-Zermeño, M.A., T. Mier, J. Sánchez-Robles, C. Toriello, 2005. Variabilidad intraespecífica del crecimiento de *Lecanicidium lecanii* (= *Verticillium lecanii*) por efecto de la temperatura. *Revista Mexicana de Micología* 20: 93-97.
- Becker, S., 1979. **Estudio sobre la propagación de las urediniosporas de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., agente causal de la roya, en Kenia**. Soc. Alem. Coop. Tec., Eschborn, Alemania. pp 70.
- Becker, S., 1984. Epidemiology and spread of *Hemileia vastatrix*. In: Fulton R. H. (ed. comp.). **Coffee Rust in the Americas**. American Phytopathological Society. San Pablo, Minn. E. U. A.
- Bélanger, R.R. y C. Labbé, 2002. Control of powdery mildews without chemicals prophylactic and biological alternatives for horticultural crops. In: pp.256-267, Bélanger R.R., W.R. Bushnell, A.J. Dick, T.L.W. Carver (eds). **The Powdery Mildews: A comprehensive Treatise**. St. Paul, Minesota
- Boosalis, M. G., 1964. Hyperparasitism. *Annual Review of Phytopathology* 2: 363-375.
- Burton, J.P. y G.A. Show, 1983. Triadimefon controls fusiform rust in young slash pine out planting. *Plant Disease* 67: 853-854.
- Carrión, G., 1988. Estudios sobre el control biológico de la roya del café mediante *Verticillium lecanii* en México. *Micología Neotropical Aplicada* 1: 79-86
- Carrión, G. y F. Ruiz-Belin, 1988. Inoculación en el laboratorio de *Verticillium lecanii* sobre la roya del café (*Hemileia vastatrix*). *Revista Mexicana de Micología*. 4: 317-321
- Carrión, G. y A. Romero, 1999. Primer registro de *Zygosporium gibbum* sobre *Puccinia oxalidis*. *Revista Mexicana de Micología* 15: 111-114.
- Consejo Mexicano del Café, 2006. <http://www.cafesdemexico.com/consejomexicanodelcafe>.

- Cummins, G.B. y Y. Hiratsuka, 1983. **Illustrated genera of rust fungi**. Edición revisada. San Pablo Minnesota. American Phytopathological Society. 152 pp.
- Faull, J.L., 1999. Fungal biotechnology for the development and improvement of insecticidal fungi. 51-56. In : J. Singh y K.R. Aneja. *Entnomycology to fungal biotechnology. Expliting fungi from natural resources for novel products*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. Nueva York.
- Gams, W., 1971. **Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes)**. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 262 pp.
- Gray, D.J. y G. Morgan-Jones, 1980. Notes on Hyphomycetes. XXXIV. Some mycoparasitic species. *Mycotaxon* 10: 375-404.
- Hawkins, B.A., 1994. **Pattern and Process in Host-Parasitoid Interactions**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hawksworth, D.L., P.M. Kirk, B.C. Sutton y D.N. Pegler, 1995. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 8<sup>th</sup>. Edn. CAB International, Wallingford, Reino Unido.
- Hijwegen, T., 1988. Effects of seventeen fungicolous fungi on sporulation of cucumber powdery mildew. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 94:185-190.
- Hijwegen, T. y J.A.A.M. Dirven, 1993. Biological control of foliar and post-harvest diseases, *In: Folhema, N.J., Y. Kohl, y Y. Elad (eds.)*. 10BC wprs Bulletin 16: 76-81.
- Hofstein, R., R.A. Daoust, J.P. Aeschlimann, 1996. Constrains to the development of biofungicides: the example of "AQ-10", a new product for controlling powdery mildews. *Entomophaga* 41: 455-460.
- Hoog, G.S. de, 1974. The genera *Blastobotrys*, *Sporothrix*, *Calcarisporium*, and *Calcarisporiella* gen. nov. *Stud. Mycol.* 7: 1-84.
- Hoog, G.S. de, 1978. Notes on some fungicolous Hyphomycetes and their relatives. *Persoonia* 10:33-81.
- Hoch, H.C. y G.S. Abawi, 1979. Mycoparasitism of oospores of *Phythium ultimum* by *Fusarium merismoides*. *Mycologia* 71:621-625.
- INMECAFE. 1988. Informes internos. Instituto Mexicano del Café. Xalapa, Veracruz.
- Jeffries, P. y T.W.K. Young, 1994. **Interfungal Parasitic Relationships**. CAB International Mycological Institute. Wallingford. Reino Unido. 296 pp.

- Kavková, M., C. y V. Čurn, 2005. *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potencial mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales). *Mycopathologia* 159: 53-63.
- Kiss, L., 2003. A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potencial as biocontrol agents. *Pest Management Science* 59: 475-483.
- Kushalapa, A.C., 1990. Development of forecasts: Timing fungicide applications to manage coffee rust carrot blight. *Can. Jour. Plant Pathology* 12: 92-99.
- Kushalapa, A.C. y A.B. Eskes, 1989. Advances in coffee rust research. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27: 503-531.
- Li, G.Q., H.C. Huang, E.G. Kokko y S.N. Acharya, 2002. Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 43: 211-218.
- Lim, T.K. y W.Z. Nik, 1983. Micoparasitism of the coffee rust pathogen *Hemileia vastatrix*, by *Verticillium psalliotae* in Malaysia. *Pertanika* 6: 23-25.
- Moguel, P. and V.M. Toledo, 1999. Biodiversity conservation in traditional coffee systems of Mexico. *Conservation Biology* 13: 11-21.
- Nestel, D., F. Dickschen y M.A. Altieri, 1993. Diversity patterns of soil macro-Coleoptera in Mexican shaded and unshaded coffee agroecosystems : an indication of habitat perturbation. *Biodiversity and Conservation* 2: 70-78.
- Paulitz, T.C. y R.R. Bélanger, 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology* 39: 103-133.
- Pei, M.H., T. Hunter, C. Ruiz, C. Bayon y J. Harris, 2003. Quantitative inoculation of willow rust *Melampsora larici-epitea* with the mycoparasite *Sphaerellopsis filum* (teleomorph *Eudarluca caricis*). *Mycological Research* 107: 57-63.
- Posada, F., F.E. Vega, S. A. Rehner, M. Blackwell, D. Weber. S-O. Suh y R.A. Humer, 2004. *Syspastospora parasitica*, a mycoparasites of the fungus *Beauveria bassiana* attacking the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*: a tritrophic asociation. *Journal of Insect Science* 4(24): 1-3.

- Price, P.W., C. E. Bouton, P. Gross, B.A. McPheron, J.N. Thompson y A.E. Weis, 1980. Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11:41-65.
- Price, P.W., M. Westoby, B. Rice, P.R. Atsatt, R.S. Fritz, J.N. Thompson, K. Mobley, 1986. Parasite mediation in ecological interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17:487-505.
- Rivera Fernández, A., 1990. Variedades de café cultivadas en México. In: Sáenz Colín, A. (ed. comp.). *El cultivo del cafeto en México*. Instituto Mexicano del Café. Xalapa. 248 pp.
- Romero, A. y G. Carrión, 1995. Patogenicidad de *Verticillium lecanii* sobre la roya del frijol. *Fitopatología* 30: 30-34.
- Romero, A. y G. Carrión, 2000. Primer registro de *Tuberculina persicina* en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 17: 131-133.
- Schieber, E. y G.A. Zentmyer, 1984. Distribution and spread of coffee rust in Latin America. In: pp.1-14, Fulton R.H. (ed.). **Coffee Rust in the Americas**. American Phytopathological Society. San. Paulo, Minesota.
- Steyaert, R.L., 1930. *Cladosporium hemileiae* n.spec. un parasite de l'*Hemileia vastatrix* Berk. Et Br. Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique 53 :47-49.
- Tangley, L., 1996. The case of missing migrants. *Science* 274:1299-1300.
- Thompson, J.N., 1982. *Interaction and Coevolution*. John Wiley & Sons, Nueva York.
- Thompson, J.N., 1994. **The Coevolutionary Process**. University of Chicago Press, Chicago.
- Velasco, J.D., 1979. Anotaciones sobre la biología de los diferentes tipos de roya. La roya del cafeto. Ed. Universitaria. Universidad de El Salvador. San Salvador.
- Wellman, F.L., 1972. **Tropical American Plant Disease** (Neotropical Phytopathology Problems). The Scarcrows Press. Inc. Metuchen, Nueva Jersey. pp. 989.