



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

LICENCIATURA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Escuela Nacional de Estudios Superiores,
Unidad Morelia

Identificación de bacterias antagonistas a *Hemileia
vastatrix*, causante de la roya del café

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

P R E S E N T A

Yareli Pérez Bautista

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Alfonso Méndez Bravo

CO-DIRECTORA: Dra. Frédérique Reverchon

MORELIA, MICHOACÁN

2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD MORELIA
SECRETARÍA GENERAL
SERVICIOS ESCOLARES

MTRA. IVONNE RAMÍREZ WENCE
DIRECTORA
DIRECCIÓN GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la **sesión ordinaria 02** del **Comité Académico** de la Licenciatura en Ciencias Ambientales de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad Morelia celebrada el día **17 de febrero del 2021**, acordó poner a su consideración el siguiente jurado para la presentación del Trabajo Profesional de la alumna **Yareli Pérez Bautista** de la Licenciatura en **Ciencias Ambientales**, con número de cuenta **416094662**, con el trabajo titulado: **"Identificación de bacterias antagonistas a *Hemileia vastatrix*, causante de la roya del café"**, bajo la dirección como **tutor** del Dr. Alfonso Méndez Bravo y como **co-tutora** la Dra. Frédérique Reverchon.

El jurado queda integrado de la siguiente manera:

Presidente: Dr. Hernando Alonso Rodríguez Correa
Vocal: Dr. Jesús Llanderal Mendoza
Secretario: Dr. Alfonso Méndez Bravo
Suplente: Dra. Rocío Hernández León
Suplente: Dr. Ignacio Torres García

Sin otro particular, quedo de usted,

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Morelia, Michoacán a, 07 de septiembre de 2021.

DRA. YESENIA ARREDONDO LEÓN
SECRETARIA GENERAL

Agradecimientos Institucionales

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Morelia.

A la Licenciatura en Ciencias Ambientales.

Al Sistema de Becas para Estudiantes de Pueblos Indígenas y Afrodescendientes del PUIC-UNAM, por la beca asignada desde al año 2016 al 2020.

Al Dr. Alfonso Méndez Bravo y Dra. Frédérique Reverchon, por aceptar en su equipo de trabajo y ser mis asesores durante este proyecto. Infinitas gracias por siempre apoyarme, iniciamos un proyecto con muy pocas herramientas sin tener si quiera un espacio en donde trabajar, sin embargo su entusiasmo siempre me motiva a seguir trabajando. Nunca olvidare la noticia del día en que le asignaron al Dr. Alfonso el Laboratorio de Ecología, por fin tendíamos un espacio para guardar a nuestros pequeños aliados (nuestras bacterias y hongo). Con ustedes no solo aprendí a cultivar bacterias y hongos, aprendí la importancia de apasionarte por un tema y a ser una persona constante en lo que hace. Porque ni un paro, ni un refrigerador descompuesto y mucho menos una pandemia nos detuvieron a terminar este proyecto. Siempre les estaré agradecida por estar ahí cuando alguna duda me invadía, porque ambos hacen un excelente equipo.

Al M.Sc. Edgar Couttolenc Brenis quien fue un gran apoyo en las salidas a campo y las colectas de material biológico, así como los consejos que me sirvieron para desarrollo de este proyecto.

A los siguientes laboratorios, por su apoyo en el préstamo de equipos y material:

- Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del INECOL, a cargo del Dr. Martín Mata Rosas
- Laboratorio de Biología Molecular de la ENES Morelia, UNAM, a cargo de la Dra. Nancy Calderón Cortés.
- Laboratorio de Ecología Evolutiva de la ENES Morelia, UNAM, a cargo del Dr. Jorge Contreras Garduño.
- Laboratorio de Ecología Evolutiva y Conservación de Bosques del IIES, UNAM, a cargo del Dr. Gumersindo Sánchez Montoya.

Al Dr. Jesusu Llanderal Mendoza, por su apoyo en la realización de los análisis moleculares, mil gracias chucho porque no solo eres un increíble académico sino un gran ser humano, gracias por nunca desesperarte cuando llegaba a tocar tu puerta y decía – Chuco una duda..., en verdad muchas gracias por ser tan paciente y tan optimista, siempre brindando un sonrisa sincera cada que terminabas de explicarme algo y veías mi cara de perdida.

A la señora Claudia María Brenes Bautista por ayudarme con el material de laboratorio y por siempre tener todo limpio y ordenado. Muchisimas gracias por ser una gran amiga, porque definitivamente las pláticas con usted eran una buena forma de olvidar mi estrés y mis crisis en el laboratorio. Siempre me recibía (o yo cuando me tocaba abrir la escuela) con un abrazo

y una enorme sonrisa que la caracteriza, gracias por estar ahí y siempre darme un buen consejo.

A mis sinodales, Dra. Roció Hernández, Dr. Jesús Llanderal, Dr. Ignacio Torres y al Dr. Hernando Rodríguez, por sus observaciones y aportes a este trabajo.

Agradecimientos personales

En primer lugar a Dios por darme la fuerza, nunca abandonarme y ser mi guía en esta travesía llamada vida.

A mi familia...

A mis amados padres, por estar siempre. Su apoyo incondicional me ayudo a nunca darme por vencida, porque a pesar de la distancia los sentía sosteniendo mi mano en cada paso que daba. Simplemente no hubiera logrado llegar a este momento de mi vida sin su ayuda. Infinitas gracias por no dejarme caer nunca, por siempre dar lo mejor de ustedes, por todos los sacrificios que hicieron para darme todo.

A mis hermanos Rosa M., Jovita, Alberto, Marilut, Rebeca, Ebert y Deyra, por ser mis ejemplos a seguir, por demostrarme que con esfuerzo y dedicación podemos llegar muy lejos, cada uno me ha apoyado de distintas maneras y siempre les estaré agradecida por no dejarme sola.

En especial a mi hermana Deyra, mi compañera y mi cómplice de vida... gracias por darme los mejor consejos de hermana mayor, por las pláticas motivacionales y por nunca soltarme cuando el mundo se me oscurecía. Gracias por que a pesar de la distancia siempre te sentía cerca, porque a pesar de que todo cambio cuando despegaste las alas nunca me dejaste atrás y no te olvidaste de mí.

A Pavel, Juanito, Kati, Camilita, Montse, Pamelita, Mikel, Noah, Jorgito y Rafael, gracias por ser los mejores sobrinos del mundo mundial, por hacerme la tía favorita del algunos y por darme tantos momentos de alegría.

A mi familia moreliana...

A Luis y Berenice los mejores amigos que la LCA me pudo regalar, son los mejores amigos del mundo mundial, gracias por escucharme y ayudarme a no darme por vencida. Gracias por darme los mejores momentos que pude vivir en Morelia.

A David, Aranza, Itzel Anayansi y Marian por ser unos excelentes amigos, cómplices y compañeros de laboratorio, por siempre estar ahí y escucharme cuando la crisis me invadía, nunca faltaron las risas, las crisis existenciales y los sabios consejos. Muchas gracias por ayudarme a rescatar mis bacterias de un terrible destino. Quizá cada uno vivía en su proyecto, pero siempre encontrábamos la manera de ayudarnos y estar siempre el uno para el otro. En especial a Itzel Anayansi por ayudarme con el análisis estadístico de los resultados de este trabajo.

A Doña Lupe y a Don Ale, por ser mi familia michoacana, por haberme dejado vivir casi 5 años en su casa y hacerme sentir como parte de su familia.

A Don Pompe y Doña Pila por ser mi abuelitos Morelianos, jamás olvidare las pláticas que teníamos, me encantaba escuchar sus aventuras y sus historias. Gracias por siempre

brindarme algo para comer, por escucharme y darme sabios consejos, de esos que solo te pueden dar las personas mayores.

¡Infinitas Gracias!

Dedicada a...



David Jefte Arias Aguirre

Índice

Agradecimientos	2
Dedicatoria	6
Resumen.....	9
Abstrac	10
1. Introducción	13
2. Marco teórico	15
2.1. Café	15
2.1.1. Aspectos Biológico – Ecológicos	15
2.1.2. Enfermedades que afectan la producción	17
2.2. Roya en el café	18
2.2.1. Ciclo de vida del hongo	20
2.2.2. Manejo de la Roya	21
2.3. Microbiota del cafeto	22
2.4. La filósfera y su importante interacción con los microorganismos	22
2.5. Control Biológico	24
3. Pregunta de investigación y objetivos	26
4. Materiales y Métodos	27
4.1. Obtención de esporas de <i>H. vastatrix</i>	27
4.2. Aislamiento de bacterias provenientes del área foliar con y sin daño evidente de roya en plantas de café	27
4.2.1. Preparación de diluciones	27
4.2.2. Medio de cultivo	29
4.2.3. Aislamiento y preservación.....	29
4.2.4. Pruebas de viabilidad	30
4.3. Identificación molecular de aislados de la zona de Huatusco, Veracruz	30
4.3.1. Extracción de ADN	30
4.3.2. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	31
4.3.3. Obtención y análisis de secuencias	31
4.4. Caracterización morfológica de aislados bacterianos	32
4.5. Evaluación de bacterias con actividad antagónica ante <i>H. vastatrix</i>	33
4.5.1. Preparación de solución de esporas	33
4.5.2. Preparación de solución de aislados bacterianos	33

4.5.3. Prueba de antagonismo directo	33
4.6. Análisis estadístico	34
5. Resultados	35
5.1. Características morfológicas de aislados bacterianos de área foliar con y sin daño evidente de roya en hojas de café, de la zona de muestreo en la comunidad de San Miguel reyes, Putla villa de Guerrero, Oaxaca	35
5.2. Identificación molecular de aislados bacterianos de áreas foliares con y sin daño evidente de roya, de la zona de muestreo en Huatusco, Veracruz	43
5.3. Características morfológicas de aislados bacterianos que no fueron identificados molecularmente de áreas foliares con y sin daño evidente de roya, de la zona de muestreo de Huatusco, Veracruz	45
5.4. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antagónica de los aislados bacterianos contra <i>H. vastatrix</i> , de la zona de muestreo en la comunidad de San Miguel reyes, Putla Villa de Guerrero, Oaxaca	48
5.5. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antagónica de los aislados bacterianos contra <i>H. vastatrix</i> , de la zona de muestreo de Huatusco, Veracruz	54
6. Discusión	61
7. Conclusión	66
8. Recomendaciones	67
9. Referencias	68
10. Anexos	80

Resumen

El café es considerado como una de las bebidas más populares del mundo y ha tenido un crecimiento constante en la importancia comercial. La producción de este grano es una actividad agrícola con un importante impacto social y económico a nivel nacional. En los últimos años, la productividad a nivel nacional se ha visto afectado por una de las enfermedades más destructivas, la roya del cafeto. Esta enfermedad es causada por el hongo biótrofo *Hemileia vastatrix* que afecta la producción a nivel mundial. El control convencional de esta enfermedad se basa en la aplicación de formulaciones químicas, y recientemente en la sustitución de plantas por variedades resistente. Dada la importancia que tiene este cultivo y el daño que ha provocado, se plantea la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para el manejo de la enfermedad. La mayoría de los estudios se han enfocado en la búsqueda de agentes de control biológico en plantas sanas, sin embargo recientemente se ha probado el éxito en el control biológico de enfermedades a partir de microorganismo asociados con plantas enfermas (Ellis, 2017). Es por ello que en este estudio, se evaluó *in vitro* la actividad antagónica de bacterias asociadas a la filósfera de café (*Coffea arabica*) con síntomas de roya. La colecta de material biológico (hojas) se realizó en diferentes cafetales ubicados en la comunidad de San Miguel Reyes, Putla Villa de Guerrero, Oaxaca y en cafetales de la zona de Huatusco, Veracruz. Se realizaron diez cortes circulares con un diámetro de 0.5 cm en cada una de las hojas recolectadas, cinco cortes se realizaron en áreas con daño evidente y cinco en áreas sin daño evidente. Al finalizar los cortes, se conformaron cuatro muestras compuestas. Dos muestras correspondientes a la zona de estudio en Oaxaca, una muestra compuesta de áreas sin daño evidente, las cuales fueron nombradas BSOx y otra de áreas con daño evidente con las siglas BEOx; y las otras dos muestras para la zona de estudio en Huatusco, Veracruz, la primera de áreas sin daño evidente y registradas con BS y la segunda de áreas sin daño evidente con las letras BE. Se obtuvieron un total de 31 aislados bacterianos correspondientes a las áreas foliares sin daño evidente, clasificados; y 266 aislados pertenecientes a las áreas con daño evidente. En los cafetales de Huatusco, Veracruz se aislaron un total de 61 aislados, 30 aislados provenientes de área sin daño evidente y 31 aislados de área con daño evidente. Se obtuvieron las secuencias de 30 aislados bacterianos de la zona de muestreo de Huatusco, Veracruz, 11 provenientes de área foliar sin daño evidente de roya y 19 del área con daño evidente de roya. De los aislados provenientes del área foliar sin daño evidente, *Curtobacterium* fue el género más abundante (69%), seguido de *Frigoribacterium* (27%) y de *Microbacterium* (18%), este último género siendo exclusivo de muestras sin daño evidente de roya. Por otro lado, del área foliar con daño evidente de roya, los géneros más abundantes fueron *Pseudomonas* (58%), *Frigoribacterium* (21%) y *Curtobacterium* (11%); además, los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* (5%) y *Xanthomonas* (5%) se aislaron exclusivamente a partir de estas muestras. De acuerdo a los resultados, 35 aislados inhibieron de manera significativa la germinación de esporas de *H. vastatrix* a las 36 horas (8 aislados bacterianos provenientes de la zona de muestreo en San Miguel Reyes, Oaxaca y 27 aislados bacterianos en el municipio de Huatusco, Veracruz). Aunado a esto, se

observó que las bacterias asociadas a plantas con síntomas de roya y en específico de áreas con daño evidente, redujeron significativamente la germinación de *H. vastatrix*. En el caso de las bacterias aisladas de la zona de muestreo en Oaxaca y de áreas con daño evidente, se obtuvo que el 27.45% tuvo efectividad a las 36 horas de estar en contacto con la roya, en el caso de las áreas sin daño evidente el 18.19% tuvo efectividad en el mismo tiempo. Por otro lado, las bacterias aisladas de la zona de muestreo en Veracruz y de áreas con daño evidente, el 76.47% tuvieron efectividad a las 36 horas de estar en contacto con la roya, y del área sin daño evidente, el 50% demostró ser efectivo en el mismo tiempo. Este trabajo enfatiza la importancia de la microbiota asociada al plano filosférico, particularmente de plantas de *Coffea arabica*, adicionalmente, se demuestra que las bacterias asociadas a plantas con síntomas de roya y en específico de áreas con daño evidente, reduce significativamente la germinación de *H. vastatrix*.

Abstract

The coffee is considered as one of the most popular drinks in the world and it has grown constantly due to its commercial importance. This crop has a heavy nationwide social and economic impact. In more recent years, national productivity of coffee beans has been threatened by a humongous and destructive plague, the coffee rust. This plague is caused by the biotroph fungus *Hemileia vastatrix* which affects nationwide production. Conventional management of this disease is based on the application of chemicals and more recently the plants substitution by more resistant ones. Due to the relevance that this crop has and the damage that has caused, is the need of developing new strategies in order to the better management of this disease. Most of the studies approaches the research of biological control agents in healthy plants, however, recently biological control with microorganism in sick plants has been done successfully (Ellis, 2017). Therefore, this study evaluated *in vitro* the antagonistic activity of bacteria related to coffee (*Coffea arabica*) philosopher with rust symptoms. Biological material (leafs) has been collected from different coffee plantations near San Miguel Reyes, Putla Villa de Guerrero, Oaxaca and Huatusco, Veracruz. Ten circular cuts were done with a 0.5 cm diameter on every collected leaf, five cuts were done in areas where damage was evident and five where it was not. Once the cuts were made, they constituted four composite samples. Two of the samples corresponds to Oaxaca's study zone, one with no evident damage composite sample was named BSOx and the other with evident damage was named BEOx; the other two samples that corresponds to Huatusco, Veracruz, was named BS for the one with no evident damage and BE for evident damage. 31 bacterial isolated related to foliar areas with no evident damage were obtained; and 266 isolated belonging to areas with evident damage. 61 isolated were done for Huatusco, Veracruz coffee plantations, 30 of them for no evident damage and 31 for evident damage areas. 30 bacterial isolated sequences were obtained for Huatusco, Veracruz zone, 11 of them where from foliar area without evident damage and 19 from rust evident damage. From isolated with no foliar evident damage, *Curtobacterium* was the most lavish gender (69%), then *Frigobacterium* (27%) and *Microbacterium* (18%), the last gender being exclusive of no evident damage areas. On the other hand, for areas with foliar evident damage, the most ample gender where *Pseudomonas* (58%), *Frigobacterium* (21%) and *Curtobacterium* (11%); moreover, genders *Pseudomonas*, *Bacillus* (5%) and *Xanthomonas* (5%) were isolated exclusively as of these samples. In accordance with results, 35 isolated inhibited significantly germination from *H. vastatrix* spores in 36 hours (8 bacterial isolated from San Miguel Reyes, Oaxaca and 27 isolated from Huatusco, Veracruz). Combined with this, it was observed that bacteria associated to plants with rust symptoms, specifically on areas with evident damage, reduced significantly *H. vastatrix* germination. For Oaxaca's isolated bacteria and on areas with evident damage, it was obtained that 27.45% were effective after 36 hours of being in contact with rust, in the case of the ones with no evident damage, 18.19% were effective in the same time. Furthermore, isolated bacteria from Veracruz zone and areas with evident damage, 76.47% were effective after 36 hours of being in contact with rust and for the areas with no

evident damage 50% of effectiveness was obtained in the same time. This work emphasizes the importance of associated microbiota to the rhizospheric plane, particularly in *Coffea arabica* plants, supplementary, it was demonstrated that associated bacteria to plants with rust symptoms and specifically of areas with evident damage, reduces substantially *H. vastatrix* germination.

1. Introducción

Existen diversas narrativas que explican el origen de la bebida denominada café, la más aceptada es la que tiene su origen en el siglo XII en la actual República Democrática Federal de Etiopía, ubicado en el nororiente de África (Pendergrast, 2002). A través de los años este grano ha sido consumido y cultivado mundialmente, actualmente se encuentra recorriendo los circuitos del mercado internacional y formando parte de la agricultura campesina (Mendoza y Teresa, 2009). La llegada del café a México se dio a finales del siglo XVIII y su expansión y desarrollo ocurrieron durante el XIX, considerándolo hasta entonces como cultivo de plantación. Posteriormente, entre los años 1920 y 1950, se convirtió principalmente en cultivo campesino (Pendergrast, 2002; Montoya y Toledo, 2020).

El café es considerado como una de las bebidas más populares del mundo y ha tenido un crecimiento comercial constante durante los últimos 150 años (Daglia *et al.*, 2000). La producción de café es una actividad agrícola con un importante impacto social y económico a nivel nacional (Berlanga, 2011). México se ha posicionado como el quinto productor de café a nivel mundial, exportando el 83% de su producción, el resto es comercializado en el mercado nacional (Figueroa-Hernández *et al.*, 2016). El café se produce en catorce estados de la República Mexicana, localizados en la región Centro-Sur del territorio nacional; los estados con mayor producción son Chiapas con 34.8%, Veracruz con 25.2%, Oaxaca y Puebla con un 28%. En total, estos cuatro estados aportan un 88% de la producción nacional total (Figueroa-Hernández *et al.*, 2016).

La caficultura en México se considera una actividad estratégica fundamental en el sector agrícola, emplea más de 500 mil productores en cerca de 730 mil hectáreas de las 14 entidades federativas en donde se produce; involucra exportaciones por 897 millones de dólares/año, y México es el principal productor de café orgánico en el mundo (SAGARPA, 2016). Este sector agrícola permite la integración de cadenas productivas, la generación de divisas y empleos, la subsistencia de pequeños productores y alrededor de 30 grupos indígenas (García, 2008). Es de enorme relevancia ecológica, ya que más del 90% de la superficie cultivada de café se encuentra bajo el sistema de sombra diversificada, que contribuye a la conservación de la biodiversidad, al secuestro de carbono (C) y, de igual manera, provee de servicios ambientales a la sociedad (Davidson, 2004; García, 2008).

En los últimos años, la productividad de café a nivel nacional se ha visto afectada por la enfermedad más destructiva de este cultivo, la roya del cafeto (Avelino *et al.*, 2015). Esta infección es causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, afecta las hojas vivas de las plantas de especies del género *Coffea*, particularmente de *C. arabica* (Aguilar, 1990). Los primeros síntomas aparecen en el envés de las hojas, donde se desarrollan las estructuras de penetración del hongo (los apresorios), provocando pequeñas lesiones amarillentas que con el tiempo se vuelven coalescentes y producen uredosporas de color anaranjado. En el haz de las hojas se forman manchas cloróticas que finalmente se vuelven necróticas (Aguilar, 1990; Agrios, 2005).

El control convencional de esta enfermedad se basa en la aplicación de formulaciones químicas, y recientemente en la sustitución de plantas por variedades resistentes. Se ha reportado la generación de resistencia del patógeno a fungicidas y su versatilidad virulenta, afectando variedades aparentemente resistentes (Zambolim, 2016). Debido a la importancia que tiene este cultivo y el daño que provoca esta enfermedad, se plantea la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para el manejo de la roya del café. El objetivo de este trabajo es aislar bacterias provenientes de hojas de café (*C. arabica*) con síntomas de roya con actividad antagónica contra el agente causal de la roya, *H. vastatrix*, lo cual podría representar una alternativa encaminada hacia el manejo integrado de la enfermedad mediante la búsqueda de agentes microbianos de control biológico.

2. Marco teórico

2.1. Café

2.1.1. Aspectos biológicos – ecológicos.

El café pertenece al género *Coffea* L. (Rubiaceae Juss.) que está conformado por más de 100 especies. Las dos especies cultivadas para fines comerciales son *C. arabica* Linneo y *C. canephora* Pierre ex A.Froehner (Anzueto, 1985). En México se cultiva principalmente el café de la especie Arábica (AMECAFE, 2012). La planta de café, o cafeto, comprende desde pequeños arbustos hasta árboles de 5 a 10 metros de altura (Pulgarín, 2007). Las hojas de estas plantas son elípticas, acabadas en punta y su disposición es opuesta, el color depende mucho de la especie (verde lima, verde oscuro, bronce o con matices de estos). Los frutos del cafeto son de tipo drupa con epicarpio carnoso y contienen dos semillas. Las flores se desarrollan en inflorescencias axilares, pequeñas y su corola es de color blanco (Waller *et al.*, 2007).

El cultivo del café se desarrolla adecuadamente entre altitudes que van desde los 500 y 2000 msnm, por encima de este nivel se presentan fuertes limitaciones en relación al desarrollo de la planta (ICAFE, 2011). Se presenta en zonas con temperatura media que oscila entre 17 y 23 °C, con precipitación anual entre 1800 a 4000 mm/año, humedad relativa del 70 al 85%, y con vientos menores a los 5 km/h (Sánchez, 2015).

El manejo de los cafetales ha permitido la generación de una gran diversidad ecológica y cultural, en especial dentro de los sistemas de café bajo sombra (Moguel y Toledo, 1996; Hernández-Martínez *et al.*, 2009). Diversas investigaciones subrayan los diferentes servicios ambientales que proporcionan estos sistemas, tales como: mantenimiento de las cuencas hidrológicas, protección del suelo, mantenimiento de la biodiversidad, mantenimiento de recursos forestales no maderables (RFNM), captura de carbono, valor paisajístico, entre otros (Ruelas-Monjardín *et al.*, 2014).

La distribución de los sistemas cafetaleros dentro del territorio Mexicano coincide con las regiones con mayor diversidad de flora y fauna (Moguel y Toledo, 2004). El 40% de la producción se realiza en áreas con selvas altas y medianas, 22% en bosques de pino y encino, 22% en selvas bajas caducifolias y el 15% en bosques mesófilos de montaña (AMECAFE, 2012). De las 115 zonas identificadas como áreas prioritarias de conservación en México, establecidas por la CONABIO, 14 coinciden con las principales regiones productoras de café. En este mismo sentido, los cafetales se han convertido en los últimos refugios para una fauna y flora que se encuentran fuertemente amenazadas por la deforestación (Moguel y Toledo, 2004).

La producción cafetalera desempeña un papel ambiental importante, ya que su producción se da bajo sistemas que mantienen una cubierta vegetal casi permanente (Moguel y Toledo,

2004). Aunado a esto, los sistemas cafetaleros en México comúnmente se desarrollan en zonas donde nacen numerosos arroyos y ríos que al unirse forman grandes flujos hídricos. Estos sistemas constituyen una pieza clave para el mantenimiento de buena parte de los flujos hidrológicos, permiten obtener PFNM comercializables y de subsistencia, alterando en una mínima porción la estabilidad del ciclo del agua (Moguel y Toledo, 1996; Ruelas-Monjardín *et al.*, 2014).

La sombra de los cafetales contribuye a mantener la fertilidad del suelo, reduciendo la erosión y aporta una gran cantidad de materia orgánica producida por la hojarasca (Jiménez-Ávila y Gómez-Pompa, 1982; Moguel y Toledo, 1996). Aunado a esto, el mantenimiento de los cafetales con sombra diversificada constituye una alternativa para mitigar el efecto del cambio climático, por medio de la fijación de carbono (Pineda-López *et al.*, 2005).

Existe un gradiente de cinco principales modalidades de producción de café que van desde los dos sistemas “tradicionales” con sombra diversificada y con árboles de la vegetación original, un sistema de policultivo comercial con árboles introducidos, y dos sistemas especializados, con sombra de una sola especie o a pleno sol (Moguel y Toledo, 2004). En los estados de Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Puebla, Guerrero e Hidalgo se concentra el 94% de la superficie cultivada (AMECAFE, 2012).

La forma de manejo de estos sistemas cafetaleros se denomina agrobosques, espacios que fueron modificados por los seres humanos con el objetivo de cumplir alguna necesidad, en este caso la producción de café. Estos sistemas mantienen la estructura y buena parte de las funciones del ecosistema original a través de la coexistencia de especies de plantas silvestres y cultivadas, nativas e introducidas (Moreno-Calles *et al.*, 2016). En los sistemas agroforestales se han registrado especies comerciales de gran importancia, resaltando el café, cacao y piña; estos sistemas suelen proporcionar especies maderables, ornamentales, frutales y de leña (Moreno-Calles *et al.*, 2016).

Veracruz y Oaxaca se encuentran entre los tres principales estados productores de café, en el Estado de Veracruz las regiones en las que se encuentra el 55.6% del área cultivable son Huatusco (21.8%), Coatepec (19.4%) y Córdoba (14.4%); el cultivo bajo sombra es predominante en estas zonas, en el cual generalmente hay especies nativas del dosel original del bosque (Moguel y Toledo, 1999; Hernández-Martínez *et al.*, 2009). Predominan los pequeños y medianos productores de tipo empresarial, con un manejo convencional de los cultivos, poco tecnificado, uso limitado de agroquímicos y preferente uso de mano de obra familiar (Sánchez y Nava-Tablada, 2017). Por otro lado, en el Estado de Oaxaca, se localizan un total de 84,482 productores distribuidos en 124 municipios con 771 comunidades principalmente indígenas, representando el 23.59% del área cultivable en el país (Beltrán, 2000). Los municipios que resaltan son Villa Alta, Ixtlan, Teotitlán; Cuicatlán, Putla Villa de Guerrero, Miahuatlan, Yautepec, Sola de vega y Pluma Hidalgo (INEGI, 1997). El cultivo bajo sombra diversificada predomina en estas zonas, aunado a un manejo de producción orgánica que no implica un modelo tecnificado, y en donde el uso de insumos no tiene un impacto negativo en el ambiente. La sombra de estos cafetales, generalmente, está conformada por árboles y arbustos, de los cuales resaltan: chalahuite (*Inga sp.*), plátano

(*Musa* spp.), naranjo (*Citrus sinensis* L. Osbeck), duela (*Schizolobium parahybum* Vell.), copalillo (*Protium copal* Schlecht & Cham.), ixpepe (*Trema micrantha* L. Blume) y mango (*Mangifera indica* L.) (Hernández-Solabac *et al.*, 2011).

2.1.2 Enfermedades que afectan la producción

En condiciones naturales las plantas interactúan con un gran número de microorganismos, estas interacciones van desde relaciones altamente perjudiciales para el hospedante, hasta aquellas que benefician tanto al hospedante como al microorganismo (Ordeñana, 2002; Gómez y Rodríguez, 2012; Méndez-Bravo *et al.*, 2018). La producción agrícola enfrenta permanentemente el desafío de controlar enfermedades y plagas; las enfermedades son causadas por organismos vivos denominados fitopatógenos, que pueden ser microorganismos como hongos, bacterias, virus y nematodos (Canet *et al.* 2016).

Se han descrito tres diferentes tipos de respuestas durante las interacciones planta-patógeno, la susceptibilidad, la resistencia y la tolerancia. La susceptibilidad, que se refiere a la colonización del patógeno sobre el hospedante ocasionándole graves daños e incluso la muerte; la resistencia, donde el hospedante se impone al patógeno dando lugar a la reducción o desaparición del mismo (Eenink, 1977; Beraldo, 2015); y finalmente, la tolerancia, donde los daños producidos por el patógeno afectan en una mínima parte la productividad del hospedante (Cobb, 1993).

El ataque por fitopatógenos afecta desfavorablemente la productividad de las plantas, sin embargo, éstas tienen la capacidad de reaccionar ante los ataques, activando una serie de mecanismos de defensa con el fin de aminorar, contrarrestar o detener la infección, desarrollando así una interacción de resistencia (Ordeñana, 2002). El mecanismo de defensa en plantas, se refiere a su habilidad de reconocer y responder rápidamente frente a un posible invasor (Gómez y Rodríguez, 2012).

El género *Coffea* es atacado por más de cien hongos parásitos, de los cuales algunos son de gran importancia económica (Becker-Raterink *et al.*, 1991). Las enfermedades que ocasionan las pérdidas más importantes son: la roya (*H. vastatrix* Berk. & Bromme), mal de hilachas (*Corticium koleroga* Cooke), ojo de gallo (*Mycena citricolor* Berkeley & Curtis) y mancha de hierro (*Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke), ya que provocan severas defoliaciones en los cafetos y, por consiguiente, una reducción considerable de su capacidad fotosintética, ocasionando una baja en la productividad de la planta (Sotomayor-Herrera y Duicela-Guambi, 1995).

En México existen registros sobre dos principales enfermedades que han mermado la producción de café. La broca del fruto, causada por el escarabajo *Hypothenemus hampei* Ferrari, la cual se encuentra presente en todas las zonas cafetaleras importantes del país, y la roya, ocasionada por el hongo biótrofo *H. vastatrix* (MacCook, 2009). *H. vastatrix* es un hongo parásito obligado, que ha provocado alerta fitosanitaria en Centro y Sudamérica (MacCook, 2009).

La roya del café se presenta como la enfermedad más destructiva del cafeto y de mayor importancia económica a nivel mundial. Esta enfermedad provoca la caída permanente de las hojas, propiciando la reducción de la capacidad fotosintética, así como el debilitamiento de árboles enfermos y en infecciones severas, puede ocasionar muerte regresiva en ramas hasta la muerte de los árboles (Ignacio-Cárdenas, 2007; CESVVER, 2015; Couttolenc-Brenis *et al.*, 2020).

Desde que la enfermedad fue introducida al Continente Americano en 1970, se estiman pérdidas en la cosecha que van de un 20 a 90% en diferentes países del continente americano (Shiomi *et al.*, 2006; McCook, 2006; McCook, 2009; ICAFE, 2011). Aunado a esto, el Programa regional para la protección y modernización de la caficultura en Centroamérica y Panamá (Promecafé) en conjunto con el Instituto Internacional de Cooperación para la Agricultura (IICA) (2013), indican que las pérdidas en el sector cafetalero en Centroamérica se han estimado en más del 19% de la producción, alrededor de 3,5 millones de sacos de café de 60 kg.

El 80% de los caficultores afectados son pequeños productores que carecen de otras fuentes de ingresos. Se estima que unas 373,584 personas (17,2% de la fuerza laboral del sector) fueron desplazadas como consecuencia de la enfermedad. En México, se reportaron para el año 2017 daños ocasionados por la roya del café hasta en el 50 % de la producción nacional (SAGARPA, 2016; SINAVEF, 2017).

2.2. Roya en el café

La roya del café es producida por un hongo de la clase Urediniomycetes perteneciente al género *Hemileia*. Avelino y Rivas (2013), señalan que la clasificación taxonómica del hongo es:

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *H. vastatrix*

Phylum:	Basidiomycota
Clase:	Urediniomycetes
Orden:	Uredinales
Familia:	Chaconiaceae
Género:	<i>Hemileia</i>
Especie:	<i>vastatrix</i>

H. vastatrix parasita las hojas del género *Coffea*, de las cuales se alimenta, y completa su ciclo de vida en células vivas. Las estructuras reproductivas del hongo son las uredosporas, que constituyen su medio de reproducción y dispersión. La uredospora alberga un proceso de meiosis, esta reproducción sexual fue denominada criptosexualidad (Virginio y Astroga,

2015). Las uredosporas son reniformes, de paredes gruesas adaptadas a la supervivencia, equinuladas sobre su mitad superior y lisa ventralmente, característica que le dio su nombre al género, el cual significa mitad-liso (Agrios, 2005). Estas estructuras pueden sobrevivir hasta por seis semanas bajo condiciones ambientales adversas (SAGARPA, 2013).

La enfermedad provoca defoliación y reducción del área fotosintética activa, llegando a ocasionar una reducción progresiva en la productividad de la planta. Los primeros síntomas que se observan son pequeñas manchas de color amarillo pálido de aproximadamente 2 mm de diámetro en la parte superior de las hojas (Agrios, 2005). Estas manchas aumentan de tamaño gradualmente hasta producir unas masas amarillas en el envés de las hojas que corresponden a cúmulos de uredosporas. El hongo no rompe la epidermis de la hoja, debido a que esporula a través de los estomas, que es por donde también las coloniza. Las lesiones polvorientas en el envés de las hojas pueden ser de color amarillo-naranja a rojo-anaranjado y existe una variación considerable de color de una región a otra (Virginio y Astroga, 2015). Cada mancha o lesión, puede contener aproximadamente 150 mil esporas, considerándose por ello excelente fuente de inóculo (Tranconi, 2003). Las lesiones pueden desarrollarse en cualquier parte de la hoja, aunque principalmente en los bordes donde se concentran las gotas de lluvia y rocío (Figura 1). El centro de las lesiones eventualmente se seca y se torna de color café; los márgenes continúan expandiéndose y produciendo uredosporas (Agrios, 2005).



Figura 1. Lesiones ocasionadas por *Hemileia vastatrix* en hojas de café.

El Centro de Investigación de la Roya del café (CIFC) de Oeiras, Portugal, reconoce hasta más de 50 razas fisiológicas del patógeno, a partir de 3,500 muestras recolectadas en diferentes países productores de este grano (Barquero-Miranda, 2013; Virginio y Astroga, 2015); en el caso de México, se identificó que las cepas aisladas pertenecen a la raza II (Gichuru, 2012).

Se han identificado nueve genes dominantes de resistencia a la roya en las diferentes especies de café: SH1, SH2, SH4 y SH5 en *C. arabica*; SH6, SH7, SH8 y SH9 en *C. canephora*; y SH3 en *C. liberica* (Bettencourt y Noronha-Wagner, 1971). *H. vastatrix* presenta el mismo número de genes de virulencia: V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8 y V9. (Rodrigues et al, 1975; Cabral et al, 2009; Gichuro, 2012). La resistencia ligada a SH5 es vencida por el gen de virulencia V5,

el cual es característico de la raza II, haciendo que las variedades de *C. arabica* sean susceptibles al ataque de esta raza (Avelino y Rivas, 2013).

2.2.1. Ciclo de vida del hongo

Esta enfermedad se desarrolla entre los 750 y 1,200 msnm, para la germinación de la uredosporas se requiere de la presencia de agua libre por al menos durante seis horas y de temperaturas entre 21-25° C (Jaramillo-Robledo, 1988). El comportamiento turbulento del viento dentro del cafetal es un factor que contribuye a la dispersión de las uredosporas del hongo (Avelino y Rivas, 2012). Aunado a esto, la precipitación actúa como un factor determinante en la germinación y dispersión de las esporas; e indirectamente, sobre otros factores ambientales como la humedad relativa, la temperatura y la luminosidad (Virginio y Astroga, 2015).

La humedad relativa y la mojadura de la hoja tienen un efecto sobre la germinación de la uredospora de la roya. Cuando hay alta humedad relativa en el ambiente, mejora la disponibilidad de agua y los tejidos (hojas, frutos y ramas) permanecen húmedos, lo que favorece la germinación de la uredospora de la roya del café y la proliferación de la infección (Virginio y Astroga, 2015).

El ciclo de vida de *H. vastatrix* por lo general tiene una duración de 30 días, inicia con el proceso de liberación y deposición de la espora en la hoja de café; posteriormente, la espora germina y se inicia el proceso de infección (Avelino y Rivas, 2012). Transcurrido el 75% de este tiempo (aproximadamente 24 días), se presentan los síntomas de la enfermedad, cuando aparecen las manchas de color amarillo pálido en el envés de las hojas. Pasado el 90% del tiempo, aquellas manchas aumentan de tamaño y se unen, formando las características manchas amarillas o anaranjadas con polvo fino amarillo que producen las nuevas esporas del hongo (Avelino y Rivas, 2012). Barquero-Miranda (2013) señala que el tiempo entre la germinación de la espora, penetración a los tejidos internos de la hoja e inicio de la producción de esporas oscila entre 20 a 40 días. Además, señala que entre más favorables sean las condiciones de temperatura y permanencia de agua sobre la hoja, menor será el tiempo para completar el ciclo reproductivo del hongo (Barquero-Miranda, 2013).

Para la formación de apresorios (modificación de las hifas para la infección de una célula epidérmica del hospedante) se requiere de un periodo de entre 5.3 y 8.5 horas (SENASICA, 2016). La germinación se inhibe con la presencia de luz y falta de agua entre 24 y 48 horas (Avelino y Rivas, 2013); cuando se evapora o se reduce la disponibilidad de agua en la hoja, se detiene el proceso de germinación, ya que afecta el crecimiento de los tubos germinativos de las esporas (SENASICA, 2016). Luego de germinar, el hongo penetra en las hojas a través de los estomas (aberturas epidérmicas especializadas por donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso) situados en mayor densidad en el envés de las hojas maduras (Agrios, 2005). Una vez que ha penetrado al interior de la hoja, el hongo desarrolla estructuras denominadas haustorios, los cuales entran en contacto con las células de la planta para extraer los nutrientes necesarios para su crecimiento (Avelino y Rivas, 2013).

Transcurridos los 30 días después de la colonización, el hongo está lo suficientemente maduro para diferenciarse en estructuras conocidas como soros, que son las encargadas de producir nuevas uredosporas. El tiempo transcurrido desde la infección hasta la producción de esporas se denomina periodo de latencia (SENASICA, 2016).

2.2.2. Manejo de la roya

El método de control más utilizado para mitigar el impacto de la roya es la aplicación de plaguicidas. La Asociación Nacional del Café (Anacafé) propone dos tipos de fungicidas para el control de la roya: sistémicos y de contacto. Los fungicidas de contacto solamente inhiben la germinación de esporas o evitan la penetración en la planta, en comparación, los fungicidas sistémicos actúan cuando el nivel de la infección es muy alto y reducen el ataque de la roya (Anacafé, 2013); sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos afecta fuertemente la inocuidad del producto, la salud de los agricultores y la calidad de los ecosistemas (Durán *et al.*, 2013).

Algunas medidas de prevención para reducir la incidencia de esta enfermedad son: 1) regulación de la sombra de los cafetales para reducir la humedad. Las condiciones de temperatura y humedad bajo los árboles no permiten el desarrollo y propagación de la roya. Mientras más cercana esté la temperatura a los 22° C, más probable es que se desarrolle la roya del café, ya que la humedad relativa y la mojadura de la hoja tienen un efecto sobre la germinación de *H. vastatrix*; altos valores de humedad (> 70 y 85%) favorecen la germinación de las uredosporas y la proliferación de la infección (Avelino y Rivas, 2013); 2) regulación de la acidez del suelo y optimización de la nutrición de los cafetos. A medida que el suelo se acidifica, algunos elementos se fijan en las arcillas ocasionando un proceso de sustitución de elementos y la liberación de iones de hierro y aluminio, los cuales pueden resultar tóxicos para las plantas (Virginio y Astroga, 2015). Los elementos nutritivos para una planta se dividen en dos categorías: los macronutrientes (H, C, O₂, N, K, Ca, Mg, P y S) y los micronutrientes (Cl, Fe, B, Mn, Zn, Cu, Ni y Mo). Las plantas necesitan de una mayor proporción de macronutrientes y en menor cantidad de micronutrientes (Virginio y Astroga, 2015). En términos generales, la época de mayor incidencia de la roya del café se presenta asociada a una reducción en los contenidos foliares de N, P, K y S, y a un aumento en los contenidos de Ca y Mg, por lo que se deben proporcionar los elementos deficientes por medio de la fertilización (Acuña *et al.*, 1992); 3) control de maleza, manteniendo un adecuado mantillo de hojarasca y material orgánico para la correcta conservación del suelo; 4) efectuar podas periódicas, a fin de renovar la estructura productiva del cafeto, permitiendo una adecuada ventilación (Virginio y Astroga, 2015; Hernández y Velázquez, 2016).

El método más efectivo para el control de *H. vastatrix* consiste en la propagación y cultivo de variedades resistentes a este patógeno mediante la selección de cruas dirigidas (Heredia, 2013; Couttolenc-Brenis *et al.*, 2020). Se han generado cultivares con alta resistencia a este hongo y que han contrarrestado la pérdida de productividad y calidad de grano ocasionados por la enfermedad, disminuyendo así el uso de pesticidas (Carvalho *et al.*, 2012). La variedad Catimor ha sido utilizada para la sustitución de plantas susceptibles a la roya, debido a que responde bajo alta presión de inóculo manteniendo a un nivel de infección menor a un 15%

(SAGARPA, 2013); sin embargo, la resistencia conferida por el fondo genético de estas variedades ha sido superada crecientemente mediante cambios adaptativos del patógeno (Zambolim, 2016).

La fuente de resistencia genética a la roya proviene de la especie *Coffea canephora* (Virginio y Astroga, 2015; Anacafé, 2018). Diferentes institutos de investigación en países como Brasil y Colombia han producido nuevas variedades resistentes a la enfermedad a partir de al menos un progenitor del híbrido de Timor que le confiere la resistencia a la roya de la raza II (Virginio y Astroga, 2015). Este híbrido tuvo su origen en un cruzamiento espontáneo entre las variedades *Typica* de *C. arabica* y *Robusta* de *C. canephora* (Anacafé, 2018). En el caso de México, el CIFIC envió líneas avanzadas de cafetos Catimor, un cruzamiento de Caturra y el híbrido de Timor (Anacafé, 2018); tras varios años de estudio a esta línea, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), liberó la variedad “Oro Azteca” (González y Ramírez, 2013), la cual posee altos niveles de resistencia a la raza II y un amplio rango de adaptación (González y Ramírez, 2013; Virginio y Astroga, 2015; Couttolenc-Brenis *et al.*, 2020).

2.3. Microbiota del café

La microbiota de una planta se puede definir como la totalidad de comunidades microbianas que habitan los tejidos internos y externos de la misma, como son los procariotas (bacterias y arqueas) y eucariotas (hongos, oomicetos y otros protistas) (Mejía, 2015; Parasuraman *et al.*, 2019). Muchos de estos microorganismos son beneficiosos e influyen positivamente en el desarrollo y el estado fisiológico de la planta (Turner *et al.*, 2013). Estos pueden producir compuestos que estimulan el crecimiento de la planta (hormonas, aminoácidos y vitaminas), mejoran la captura de nutrientes y aumentan su disponibilidad, activan los mecanismos de defensa contra fitopatógenos y les confieren resistencia a las plantas frente a estrés biótico y abiótico (Turner *et al.*, 2013; Mejía, 2015; Méndez-Bravo *et al.*, 2018; Parasuraman *et al.*, 2019; Báez-Vallejo *et al.*, 2020).

En el caso del café, se han reportado hongos y bacterias endófitas que fueron aislados a partir de hojas, frutas, raíces y semillas en diferentes países de América, África y Asia, con el objetivo de caracterizar su diversidad y estudiar su potencial de controlar plagas y patógenos que afectan este cultivo (Vega *et al.*, 2005; 2008; Posada *et al.*, 2007; Belayneh *et al.*, 2013; Mejía, 2015).

La microbiota del café es altamente diversa taxonómicamente, sin embargo sólo unas pocas especies han sido evaluadas en su capacidad de controlar a distintos patógenos (Mejía, 2015). El primer estudio en describir la diversidad de bacterias cultivables en distintos tejidos de plantas (pulpa, semilla, hojas, tallos y raíces) de café (*Coffea arabica*) fue realizado por Vega *et al.* (2005), quienes lograron identificar 22 géneros bacterianos, siendo dominantes los géneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Stenotrophomonas* y en menor abundancia los géneros *Kocuria*, *Xanthomonas* y *Yersinia*.

Recientemente Benoit *et al.*, (2021) aislaron treinta géneros bacterianos endófitos de raíces

y semillas de plantas de *Coffea canephora* y *C. liberica*, los géneros dominantes fueron *Nocardia*, *Bacillus* y *Burkholderia*. Doce de los géneros bacterianos encontrados fueron reportados por primera vez en asociación a plantas de café, consistiendo en miembros de los géneros *Brachybacterium*, *Caballeronia*, *Kitasatospora*, *Lechevalieria*, *Leifsonia*, *Luteibacter*, *Lysinibacillus*, *Mycolicibacterium*, *Nakamurella*, *Paracoccamurella*, *Sinomonas* y *Sphingobium*. De igual manera, se probó el potencial de los aislados bacterianos obtenidos como agentes de control biológico con el patógeno fúngico *Fusarium oxysporum* y los principales resultados demuestran que cepas de los géneros *Bacillus*, *Burkholderia* y *Streptomyces* inhibieron eficazmente el crecimiento de este patógeno hasta en un 40%. Finalmente se probaron aislados bacterianos contra nematodos parásitos del café *Radopholus duriophilus* y *Pratylenchus coffeae*, y los autores concluyeron que aislados del género *Bacillus* pudieron conducir al 100% la mortalidad de ambos nematodos (Benoit *et al.*, 2021).

2.4. La filósfera y su importante interacción con los microorganismos

La filósfera está constituida por la superficie vegetal que se encuentra por encima del suelo (hojas, tallos y flores) (Parasuraman *et al.*, 2019), proporciona hábitats para distintos microorganismos albergando una amplia diversidad de bacterias, hongos, y virus (Farré-Armengol *et al.*, 2016; Parasuraman *et al.*, 2019). La diversidad, la dispersión y el desarrollo de estos microorganismos en la superficie de la hoja se basan en las condiciones ambientales y factores fisiológicos de las plantas, tales como la disponibilidad de agua, temperatura, corrientes de aire y lluvia, radiación solar, área foliar, condiciones de pH, la disponibilidad de nutrientes, tasa fotosintética y contenido de nitrógeno (N) en hojas (Lindow y Brandl, 2003; Laforest-Lapointe *et al.*, 2017; Parasuraman *et al.*, 2019; Sivakumar *et al.*, 2020).

Las bacterias representan los colonos filósfericos más abundantes, los cuales pueden tener efectos tanto perjudiciales como beneficiosos sobre las plantas (Farré-Armengol *et al.*, 2016; Parasuraman *et al.*, 2019; Sivakumar *et al.*, 2020). Participan en diferentes procesos como el ciclaje de nutrientes y actividades biológicas de las hojas, lo que les permite apoyar a su planta hospedera en la adaptación de las condiciones ambientales a las que se encuentra expuesta (Vacher *et al.*, 2016).

Existe evidencia de que algunas bacterias presentes en la filósfera inducen mecanismos en la planta para resistir a ciertos patógenos a través del aumento de la competencia por nichos ecológicos, el agotamiento de las reservas de nutrientes y el aumento de la producción de antibióticos (Laforest-Lapointe *et al.*, 2017). Los principales géneros reportados que se desarrollan en el plano filósferico son *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Massilia*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas* y *Pantoea* (Knief *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2013; Báez-Vallejo *et al.*, 2020).

2.5. Control Biológico

El control biológico (CB) ha sido utilizado como una herramienta para el desarrollo sustentable, en este caso para la sustentabilidad agrícola (Sarandón y Sarandón, 1993; Sánchez de Prager, 2009). El CB se refiere “al uso de enemigos naturales para reducir poblaciones de plagas, ya sea temporal o permanentemente” (Van-Driesche *et al.*, 2007). Por otra parte, la Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB) ha definido al CB como “la utilización de organismos vivos o de sus productos para impedir o reducir las pérdidas o daños causados por organismos nocivos” (Benassy, 1977).

El CB ha ganado terreno para minimizar el uso de fungicidas, reducir los impactos ambientales y los costos de producción (Báez-Vallejo *et al.*, 2020). Uno de los problemas que se viven a nivel mundial es la conservación del medio ambiente y la salud humana, lo que ha conllevado a la necesidad de ampliar, en la agricultura, la investigación sobre la utilización de métodos biológicos para la protección de los cultivos, en este caso en el cultivo de café (Guedez *et al.*, 2008).

El CB de patógenos foliares constantemente involucra la aplicación del microorganismo antagonista sobre la superficie de la hoja (Spurr, 1981; Blakeman y Fokkema, 1982). Una de las estrategias, dentro de la regulación biológica de fitopatógenos, consiste en el uso de microorganismos antagonistas productores de sustancias antibióticas y enzimáticas líticas que actúen sobre sus esporas o tubos germinativos, en su fase epífita de crecimiento (Andrews, 1992; Elad *et al.* 2002).

En cuanto a la búsqueda de controladores biológicos de *H. vastatrix* en la microbiota del cafeto, se han reportados algunos hongos aislados con actividad parasitaria sobre *H. vastatrix*, destacándose *Lecanicillium lecanii*, una especie de hongo que también posee actividad entomopatógena (Roldán *et al.*, 2016). En otro estudio se aislaron distintos micoparásitos de pústulas de *H. vastatrix* en hojas de café, los resultaron obtenidos se midieron en porcentajes de micoparasitismo en las uredosporas de roya, los mayores porcentajes se obtuvieron con el uso de *Simplicillium* sp. (89%) y *Lecanicillium* sp. (68%) (Gómez-De La Cruz *et al.*, 2018).

Algunos géneros bacterianos, asociados a la filósfera de distintas especies de plantas, que han sido reportados con actividad antifúngica son *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas* y *Pantoea*, que son eficientes en el control de distintos patógenos (Rastogi *et al.*, 2013; Báez-Vallejo *et al.*, 2018). En el caso de la roya, un estudio realizado por Shiomi *et al.* (2006) reportó que los aislados que inhibieron por arriba del 50% la germinación de uredosporas pertenecen al género *Bacillus*, los cuales fueron aislados de hojas y ramas de plantas sanas de *C. arabica* y *C. robusta*. En otros estudios, se evaluó la actividad antifúngica de *Bacillus thuringiensis* B157 y *Pseudomonas putida* P286 en plantas de café Catuai, y redujeron en un 100% la germinación de esporas y lograron reducir la incidencia de la enfermedad; además, el aislado *B. thuringiensis* B157 logró prevenir la formación de tubos germinativos (Haddad *et al.*, 2009; Haddad *et al.*, 2013).

Existe una creciente evidencia que demuestra el potencial de las bacterias asociadas a las hojas para aumentar la salud de las plantas, mediante la modulación de mecanismos de

defensa y acciones como el control biológico para reducir los patógenos en las plantas (Ab Rahman *et al.*, 2018). Es importante comprender el papel de los microorganismos asociados a la filósfera de cultivos de interés en el control de enfermedades, y su aplicación como biofertilizantes y bioplaguicidas, cuyo éxito en el campo aun es inconsistente (Ab Rahman *et al.*, 2018). La mayoría de los estudios se han enfocado en la búsqueda de agentes de control biológico en plantas sanas; sin embargo, recientemente se ha probado el éxito en el control biológico de enfermedades a partir de microorganismos asociados a plantas enfermas (Ellis, 2017; Guevara-Avenidaño *et al.*, 2018). Por ejemplo, Méndez-Bravo *et al.*, (2018) e aislaron bacterias asociadas a árboles sintomáticos de aguacate con muerte regresiva, con potencial de CB contra el patógeno *Phytophthora cinnamomi*.

Dada la importancia económica y cultural que tiene la producción del café a nivel nacional, y al impacto negativo de *H. vastatrix* sobre su producción, es importante desarrollar nuevas estrategias para el manejo de la enfermedad; la búsqueda de microorganismos con actividad antagonica contra *H. vastatrix* podría representar una alternativa viable encaminada hacia el control biológico de la roya del café.

3. Pregunta de investigación y Objetivos

3.1. Pregunta de investigación

¿Existen bacterias provenientes de hojas de *Coffea arabica* con síntomas de roya con actividad antagonica contra el agente causal *Hemileia vastatrix*?

3.2. Objetivo general

Identificar bacterias provenientes de hojas de *Coffea arabica* con síntomas de roya con actividad antagonica contra el agente causal *Hemileia vastatrix*.

3.4. Objetivos específicos

1. Seleccionar material foliar de *Coffea arabica* con síntomas de roya.
2. Preservar esporas de *Hemileia vastatrix*, agente causal de la roya del cafeto.
3. Aislar y caracterizar morfológicamente bacterias provenientes de áreas foliares con y sin daño evidente de roya en plantas de café que presentan síntomas de la enfermedad.
4. Identificar molecularmente los aislados bacterianos asociados con las regiones foliares con y sin daño evidente de roya
5. Evaluar la efectividad de las bacterias como antagonistas de *Hemileia vastatrix*

3.5. Hipótesis

En las hojas de café existen bacterias que, al interactuar con el hongo biótrofo *Hemileia vastatrix*, tienen la capacidad de antagonizar su crecimiento y desarrollo.

4. Material y Métodos

4.1. Obtención de esporas de *H. vastatrix*

La colecta para la extracción de uredosporas en hojas de café se realizó en el sitio Experimental Teocelo del INIFAP, en Veracruz. Las muestras se obtuvieron a partir de veinte plantas de la variedad Typica con síntomas visibles de roya, seleccionadas al azar, respetando una separación de al menos tres plantas entre ellas. De cada planta seleccionada se colectaron 10 hojas, las cuales fueron cortadas del segundo y tercer par de hojas de la parte apical hacia la base, debido a que éstas reflejan el estado nutricional de la planta. Fueron cortadas con tijeras y guantes (esterilizados por cada colecta de hojas), colectadas en bolsas de papel y de plástico, finalmente fueron transportadas en hielera con bolsas refrigerantes de gel. El aislamiento de esporas se realizó en laboratorio con ayuda de un microscopio estereoscópico para visualizar de manera más detallada las áreas con uredosporas. Con palillos estériles, se recolectaron las esporas de *H. vastatrix*, de las cuales 10 mg fueron colocadas en tubos para centrifuga de 15 ml y almacenadas a -20°C (Brooks y Athinuwat, 2018).

4.2. Aislamiento de bacterias provenientes del área foliar con y sin daño evidente de roya en plantas de café

4.2.1. Preparación de diluciones

La colecta de material biológico se realizó en diferentes cafetales ubicados en la comunidad de San Miguel Reyes, Putla Villa de Guerrero, Oaxaca (Figura 2), y en cafetales de la zona de Huatusco, Veracruz (Figura 3). Se obtuvieron muestras de cada una de las zonas de estudio, a partir de 20 plantas diferentes de la variedad Typica. De cada planta, se tomaron 10 hojas con síntomas de roya, las cuales fueron colectadas y transportadas de acuerdo a la metodología antes descrita.

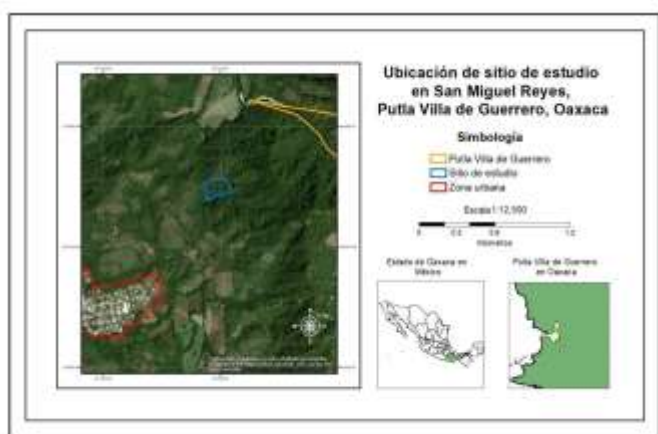


Figura 2. Zona de muestreo en la comunidad de San Miguel Reyes, Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.



Figura 3. Mapa del municipio de Huatusco, Veracruz. Extraído de Méndez-Bravo *et al.*, 2018; Fig. 1a

Las hojas que fueron colectadas en cada una de las zonas de estudio fueron mezcladas, para así obtener dos tipos de muestras homogéneas, una de la zona de estudio en San Miguel Reyes, Putla Villa de Guerrero, Oaxaca y otra de los cafetales de la zona de Huatusco, Veracruz. Se realizaron diez cortes circulares con un diámetro de 0.5 cm en cada una de las hojas recolectadas, cinco cortes se realizaron en áreas con daño evidente y cinco en áreas sin daño evidente. Al finalizar los cortes, se conformaron cuatro muestras compuestas. Dos muestras correspondientes a la zona de estudio en Oaxaca, una muestra compuesta de áreas con daño evidente, las cuales fueron nombradas BEOx y otra de áreas sin daño evidente con las siglas BSOx; y las otras dos muestras para la zona de estudio en Huatusco, Veracruz, la primera de áreas con daño evidente y registradas con BE y la segunda de áreas sin daño evidente con las letras BS (Figura 4). De cada muestra compuesta se pesó 1 g, el cual se colocó en 25 ml de solución salina estéril al 0.9%. Las soluciones con muestra se agitaron con vórtex durante 15 min.

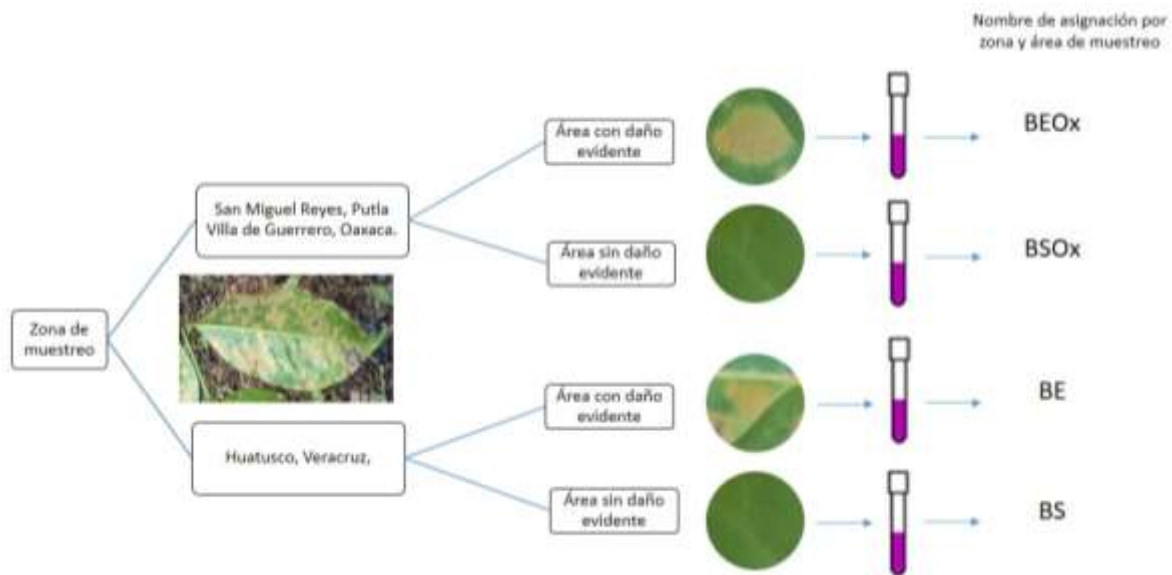


Figura 4. Aislamiento de bacterias provenientes del área foliar con daño evidente y sin daño evidente de roya en plantas de la variedad Typica, de las zonas de muestreo en San Miguel Reyes, Putla Villa de Guerrero, Oaxaca y en la zona de Huatusco, Veracruz. Los aislados provenientes de la zona de muestreo en Oaxaca y del área con daño evidente fueron nombradas BEOx y de las áreas sin daño evidente con BSOx; para el caso de la zona de muestreo en Veracruz y de las áreas con daño evidente se nombraron BE y de las áreas sin daño evidente con BS.

Para poder realizar un conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) que represente la abundancia de bacterias de las dos diferentes soluciones, fue necesario realizar diluciones seriales de la solución inicial. Se prepararon diluciones seriales de ambas muestras. Para ello, se tomó 1 ml de la solución inicial, diluyéndolo con 9 ml de solución salina en tubos para centrífuga de 15 ml, agitando con ayuda del vórtex durante 1 min. De la primera dilución obtenida, se tomó nuevamente 1 ml y se colocó en 9 ml de agua destilada estéril. Se repitió

este procedimiento hasta obtener tres diluciones (1, 1:10 y 1:100) (Figura 5), para cada una de las muestras (BEOx, BSOx, BE y BS).

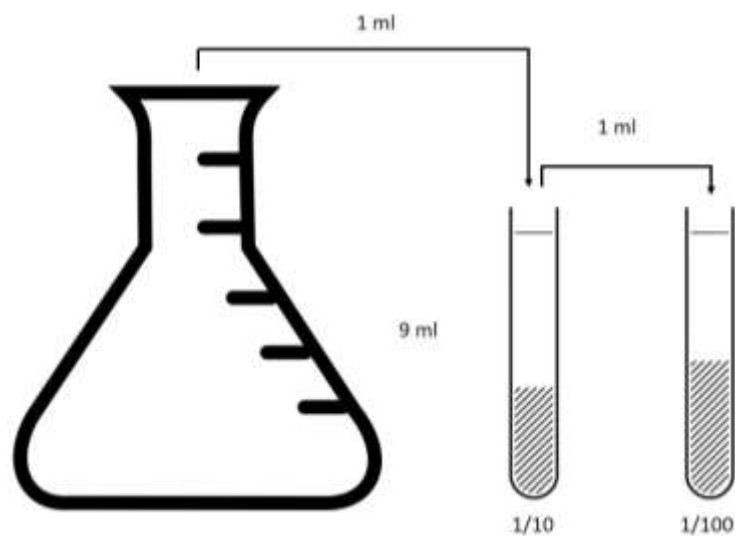


Figura 5. Diluciones seriales (Galicia-Sosa *et al.*, 2017)

4.2.2. Medio de cultivo

Para el aislamiento bacteriano a partir de soluciones de hojas con y sin daño evidente de roya, se hizo uso de medio de cultivo LB (Luria Bertani) debido a que es un medio generalista que permite el crecimiento de la mayoría de las bacterias. En cada caja Petri con medio LB, se colocaron 100 μ l de cada una de las diluciones (1, 1:10, 1:100), para cada una de las muestras (BEOx, BSOx, BE y BS). Cada una de las diluciones se sembró por triplicado. Las cajas se incubaron a 24 °C en una estufa de cultivo (Riossa Serie E-33). Se realizó un monitoreo del crecimiento de UFC por 24 h y 48 h (Figura 5), este proceso se realizó dentro de una campana de flujo laminar, para mantener la esterilidad de los medios.

4.2.3. Aislamiento y Preservación.

El aislamiento consiste en cultivar una sola colonia bacteriana para obtener cultivos puros; este procedimiento se realizó en una campana de flujo laminar para garantizar condiciones estériles. Se resembró cada aislado bacteriano en una nueva caja Petri con la técnica de agotamiento por estrías, con ayuda de un asa bacteriológica (estéril).

Se preservaron las colonias bacterianas obtenidas por el método de conservación en glicerol al 30% en medio LB líquido. En micro-tubos de 1.5 ml, se colocó 1 ml de esta solución de preservación y con ayuda de palillos estériles, se tomó una asada de biomasa de cada colonia para ser colocada en micro-tubos con el medio de preservación. Los tubos se incubaron a una temperatura de 27 °C con una agitación de 700 rpm (revoluciones por minuto) durante 25

min, pasado ese tiempo se colocaron a una temperatura de 4 °C durante 20 min, y finalmente fueron llevadas a -20 °C para su crio-preservación.

4.2.4. Pruebas de viabilidad

Para determinar la viabilidad de los aislados que fueron conservados con glicerol, se reactivaron las muestras. Se tomó una alícuota de 10 µl del aislado conservado en medio LB con glicerol al 30 % y se inoculó en una caja Petri con medio LB sólido. Las cajas inoculadas se incubaron a 25 °C por 24 h para corroborar el crecimiento activo del aislado bacteriano sembrado.

4.3. Identificación molecular de aislados bacterianos de la zona de Huatusco, Veracruz.

La identificación molecular de los aislados bacterianos obtenidos de las muestras BE y BS se realizó únicamente para aquellos aislados obtenidos de los cafetales de la zona de Huatusco, Veracruz, debido a que éstas fueran las primeras muestras en ser procesadas. Al inicio del proyecto, no se tenía contemplado hacer una caracterización morfológica de los aislados bacterianos, por lo que se inició con la identificación molecular de los primeros aislados obtenidos. Sin embargo, conforme se avanzó en el proyecto, la cantidad de aislados obtenidos requirió una caracterización morfológica previa para las muestras BEOx y BSOx, con el fin de agrupar los aislados bacterianos en morfotipos. Adicionalmente, algunos de los primeros aislados obtenidos no se pudieron identificar molecularmente debido a la imposibilidad de amplificar su ADN, por lo que su caracterización morfológica resultó indispensable.

4.3.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo tomando como referencia el método desarrollado por Molina *et al.* (2006), el cual consistió en tres etapas principales: lisis celular, extracción del ADN y precipitación del ADN. Los aislados bacterianos fueron crecidos en medio líquido LB en micro-tubos de 1.5 ml, con 1 ml de medio, durante 24 h a 27 °C. Posterior a este tiempo de crecimiento, se centrifugaron los micro-tubos por 5 min a 8,000 rpm, para eliminar el medio de cultivo y conservar el tejido celular de cada aislado.

En el proceso de lisis celular, se usaron detergentes iónicos que son capaces de romper el tejido, pared celular y las membranas celulares sin degradar los ácidos nucleicos. Se realizaron dos lavados con solución TEN (10 mM (mili Molar) Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl), el primer lavado con 1 ml de TEN y un periodo de centrifugación de 5 min a 8,000 rpm y el segundo, después de tirar el sobrenadante, con 200 µl de TEN y 2 min de centrifugado a 8,000 rpm. Posteriormente, sin haber tirado el sobrenadante, se añadieron 250 µl de solución amortiguadora (40 mM Tris-HCl pH 8; 20 mM acetato de sodio; 1 mM EDTA; 1% de SDS), junto con 66 µl de NaCl 5M y se mezcló por inversión. Se calentó cada tubo por 10 min a 65 °C para una mejor lisis celular y se centrifugaron por 10 minutos a 12,000 rpm. Se transfirió el sobrenadante obtenido a un micro-tubo nuevo de 1.5 ml, sin llevarse el precipitado celular que se precipitó en el fondo.

Para la extracción del ADN, se agregó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico 24/1 (v/v) y se mezcló durante 30 segundos con ayuda de un vortex con el fin de remover la mayor cantidad de proteínas. Se centrifugaron las muestras por 10 min a 12,000 rpm para separar el cloroformo de la fase acuosa que contiene el ADN, la cual se transfirió un tubo nuevo. Se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol para iniciar con la etapa de precipitación, luego se mezcló por inversión (20 veces) y centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min.

Se tiró el sobrenadante obtenido con mucho cuidado de no llevarse la pastilla del ADN de color blanco transparentoso, que se precipita en el fondo después de centrifugar. Se agregaron 400 µl de etanol al 70%, frío y recién preparado, se agitó la muestra con ayuda de un vortex y se levantó la pastilla de ADN sin disolver. Se centrifugaron las muestras por 10 min a 12,000 rpm, se descartó el sobrenadante sin llevarse la pastilla resultante y se dejó secar. Finalmente, la pastilla se disolvió en 50 µl de agua DDE (destilada, desionizada y estéril). La calidad del ADN obtenido de cada aislado se confirmó con el uso de electroforesis en gel de agarosa al 1%.

4.3.2. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir del ADN extraído de los aislados bacterianos, se amplificó el gen 16S rRNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron los oligonucleótidos universales 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') y 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') obtenidos de Sigma-Aldrich®. La reacción de PCR estuvo conformada por: 1.5 µl de ADN, 6.5 µl de agua ultrapura (DDE), 1 µl de cada primer (10 µM) y 10 µl de la mezcla Multiplex (Marca QIAGEN, PCR Master Mix 2x), formando una solución compuesta de 20 µl. Esta reacción se llevó a cabo en un termociclador (Eppendorf® Nexus gradient) con la siguiente programación: desnaturalización inicial a 94° C durante 15 min, después 30 ciclos a 95° C, 65° C por 1 min y 72° C por 1 min 30 s, y un paso de extensión final a 72° C por 10 min. Los productos de amplificación del gen 16S rRNA se visualizaron mediante electroforesis en gel agarosa al 1.5%.

4.3.3. Obtención y análisis de secuencias

Para la preparación de las reacciones de secuenciación se siguió el método proporcionado por Valdelamar *et al.* (2014). En columnas Centrisep, se colocaron sephadex, de forma que éste quede por debajo de la marca que se encuentra en la parte inferior de la columna. Se agregaron 0.8 ml de agua bidestilada esterilizada y se mezcló perfectamente con ayuda de un vortex. Las columnas se dejaron en una gradilla a temperatura ambiente por al menos dos horas, hasta que el gel se hidrato.

Pasado este tiempo, las muestras fueron purificadas con 10 µl de agua bidestilada esterilizada. Cada columna se colocó inmediatamente en un tubo colector, se esperó un tiempo hasta que el agua excedente decantó por gravedad y posteriormente se desechó el agua que se acumuló en el tubo colector. Se centrifugó con ayuda de una microcentrifuga a 3,000 rpm por 3 minutos.

Se colocaron las columnas (sin el tubo colector) en tubos nuevos de 1.5 ml con el nombre de la muestra que se purificó en esa columna. Con una micropipeta se tomaron 20 µl de la muestra y se colocaron con cuidado en el centro de la columna con sephadex sin tocarla. Se colocaron la columna junto con el tubo de 1.5 ml en una microcentrífuga a 3,000 rpm por 3 minutos y finalmente se desechó la columna. Una vez obtenidas las muestras fueron secadas en un concentrador de vacío, ya que las muestras están completamente secas se le agregaron a cada microtubo, 15 µl de formamida, posteriormente se centrifugaron por 5 minutos a 13 000 rpm. Las muestras se cargaron en una placa de 96 pozos, y se colocaron en la charola dentro del secuenciador con cuidado. En la computadora con ayuda del programa 3500 Data Collection (3500 Series Instrument data Collection Software Version 4.0 and GeneMpper™ *ID-X* software v1.6, Thermo Fisher) y se capturaron los datos de las muestras y se dio inicio con la electroforesis de secuenciación.

Por medio de una comparación manual con secuencias registradas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) por medio del algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, se analizaron las secuencias obtenidas y de esta manera con un porcentaje de similitud de más del 93% se pudieron identificar los aislados obtenidos a nivel de género (Bou *et al.*, 2011).

4.4. Caracterización morfológica de aislados bacterianos

Los aislados bacterianos que no fueron identificados molecularmente se agruparon en morfotipos de acuerdo con las características macroscópicas de las colonias. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico, se observaron las características propias de cada colonia, considerando criterios de forma, borde, elevación, superficie, consistencia y color.

De igual manera, se realizó la caracterización microscópica de los aislados bacterianos, esto por medio de la tinción de Gram. Este proceso tiene la finalidad de determinar si una bacteria es Gram positiva o Gram negativa, de acuerdo con el color que logre fijarse en la pared celular. Esta tinción también permite apreciar la forma de las células bacterianas, con ayuda de un microscopio óptico y con un objetivo de 100X.

Los pasos para realizar la tinción son los siguientes: 1) Se realizó un frotis fijado con calor, en donde se tomó una pequeña muestra de la cepa bacteriana, se colocó sobre un portaobjeto y se le agregó una pequeña gota de agua destilada esterilizada. Para fijar muestra se pasó sobre la flama de un mechero, 2) se tiñó durante un minuto con cristal violeta, pasado este tiempo se enjuagó abundantemente con agua destilada, 3) nuevamente se cubrió la muestra con solución iodada durante un minuto y nuevamente se lavó con agua, 4) se decoloró con una solución de acetona/isopropanol (250/750 ml) por 30 segundos y se lavó con agua destilada, 5) finalmente se cubrió la muestra con safranina durante un minuto, se lavó nuevamente con agua destilada y se dejó secar para poder ser observada con ayuda de un microscopio óptico. Este proceso se realizó con cada uno de los aislados bacterianos que fueron seleccionados por la caracterización macroscópica.

4.5. Evaluación de bacterias con actividad antagónica ante *H. vastatrix*

4.5.1. Preparación de solución de esporas

La preparación de solución de esporas se realizó siguiendo el protocolo establecido por Deepak *et al.* (2012) con algunas modificaciones. Las muestras de esporas almacenadas a -20 °C se sometieron a baño de agua a 40 °C durante 10 min. Las alícuotas de esporas (10 mg) se suspendieron en 5 ml de agua destilada estéril, se les agregó una gota de Tween 20 al (0.05) y se agitaron con vórtex durante 10 s (Haddad *et al.*, 2009). El monitoreo de germinación se realizó a las 6, 12, 24 y 36 h, con ayuda de un microscopio óptico con un aumento de 40X, con el objetivo de determinar el porcentaje de germinación de esporas. El porcentaje de germinación se calculó con la siguiente ecuación:

$$\frac{(\text{número de esporas germinadas})}{(\text{número total de esporas})} \times 100$$

El porcentaje de germinación de las esporas se calculó a las 6, 12, 24 y 36 h.

4.5.2. Preparación de solución de aislados bacterianos

En micro-tubos de 1.5 ml se colocó 1 ml de medio de cultivo LB líquido estéril y con ayuda de palillos estériles, se tomó una asada de biomasa de cada aislado bacteriano para ser colocado en el micro-tubo con el medio. Se dejó crecer por 24 h en un termociclador a 27 °C (Eppendorf® nexus gradient®).

Pasado este tiempo, se realizaron suspensiones de cada uno de los aislados bacterianos con una concentración de 10⁸ UFC/ml, teniendo como punto estándar el 0.5 de la escala de McFarland. La concentración bacteriana fue medida con ayuda de espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm. La absorbancia obtenida se multiplicó por la concentración bacteriana conocida de acuerdo con el estándar de la escala de McFarland (1.5 x 10⁸ UFC/ml) y se dividió por la absorbancia teórica correspondiente (0.125). La concentración se ajustó agregando LB líquido estéril o con la solución de bacterias, todos los aislados fueron llevados a la concentración de 10⁸ UFC/ml.

4.5.3. Prueba de antagonismo directo

Se colocaron 20 µl de solución de bacteria con concentración calibrada en el centro de una caja de Petri con medio agar/agua al 2%. Se dejaron crecer las bacterias por dos días para obtener un crecimiento adecuado del aislado bacteriano. Pasado este tiempo, se colocaron 500 µl de solución de esporas distribuidos alrededor del aislado bacteriano con una distancia de 2 cm, con la finalidad de observar si existía inhibición en el proceso de germinación de las esporas de *H. vastatrix* en presencia de los diferentes aislados bacterianos (Figura 6).

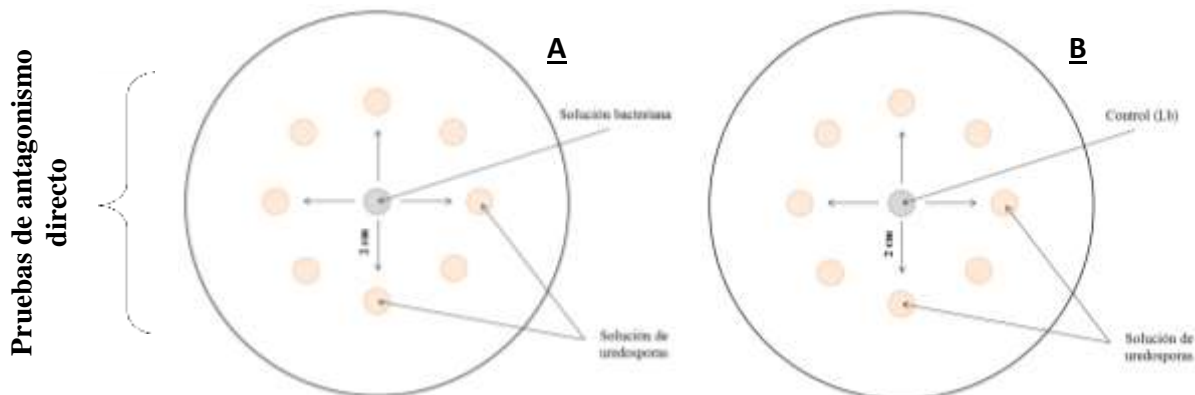


Figura 5. Esquema de las pruebas para la evaluación de antagonismo directo. A) Caja con medio agar/agua al 2%, en el centro se colocaron 20 µl de solución de bacteria en LB líquido y a 2 cm de distancia se colocaron 500 µl de solución de esporas. B) Caja control con medio agar/agua al 2%, en el centro se colocaron 20 µl de medio de cultivo LB líquido y a 2 cm de distancia se colocaron 500 µl de solución de esporas (Tomado y modificado de Escudero-Osorio, 2018).

Se emplearon tres réplicas por cada aislado bacteriano (tratamiento) y un control, en el cual se colocó en el centro LB líquido y con solución de esporas. Se incubaron los ensayos a 23 °C por 36 h en condiciones de oscuridad, para evaluar a las 6, 12, 24 y 36 h el porcentaje de germinación con respecto al control, y de esta manera determinar si existe actividad antagonista.

El índice de inhibición se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de inhibición \%} = \frac{(G - g)}{(G)}$$

Donde:

G= porcentaje de germinación de esporas en frente del control

g= porcentaje de germinación de esporas en frente de la bacteria

4.6. Análisis estadístico





Se utilizó el programa R versión 3.6.3 para evaluar las diferencias en el índice de inhibición entre tratamientos. Para ello, se realizó una prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) para cada uno de los tratamientos, con el objetivo de verificar la distribución de los datos. Posteriormente se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía, para determinar las diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos. Se realizó, además, una prueba *a posteriori* de Dunnett, la cual se utilizó para comparar las medias de todos los tratamientos contra el control. Las diferencias entre los tratamientos y el control se consideraron significativas a un valor de $P < 0.05$.








5. Resultados

5.1. Características morfológicas de aislados bacterianos de área foliar con y sin daño evidente de roya en hojas de café, de la zona de muestreo en la comunidad de San Miguel Reyes, Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.

Se obtuvieron y caracterizaron 31 aislados bacterianos correspondientes a las áreas foliares sin daño evidente de roya, los cuales fueron clasificados en 11 morfotipos con base en los criterios microscópicos y macroscópicos mencionados; los aislados representantes de los morfotipos fueron seleccionados al azar. De estos 11 morfotipos, 50 % corresponden a bacterias Gram negativas y el otro 50 % a bacterias Gram positivas (Cuadro 2).







Cuadro 2. Descripción de morfotipos bacterianos obtenidos de áreas foliares sin daño evidente de roya, de la zona de muestreo en la comunidad de San Miguel Reyes, Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.









Morfotipo	Descripción (Forma de la colonia, borde, elevación, superficie, consistencia, color, forma celular y tinción de Gram)	Foto (100X)
BSOx1	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, membranosa, color amarillo. Coco, Gram negativa.	
BSOx2	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, cremosa, color amarillo. Coco, Gram positiva.	
BSOx3	Colonia con forma circular, borde entero, plana/convexa, lisa, cremosa/ membranosa, color amarillo. Bacilo, Gram positiva.	
BSOx9	Colonia con forma circular, borde entero, elevada, rugosa, membranosa, color blanco transparente. Diplococo, Gram negativa.	

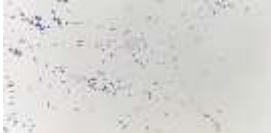







BSOx10	Colonia con forma irregular, borde ondulado, elevada, rugosa, costrosa, color amarillo. Coco, Gram negativa.	
BSOx18	Colonia con forma circular, borde entero, plana/convexa, lisa, cremosa/membranosa, color amarillo claro. Coco, Gram positiva.	
BSOx19	Colonia con forma circular, borde entero, elevada, lisa, membranosa, color blanco transparente. Coco, Gram positiva.	
BSOx24	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, cremosa, color amarillo claro. Bacilo, Gram positiva.	
BSOx25	Colonia con forma circular, borde entero, elevada, rugosa, membranosa, color blanco transparente. Diplococo, Gram negativa.	
BSOx26	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, rugosa, cremosa/membranosa, color amarillo claro. Coco, Gram negativa.	
BSOx27	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, membranosa, color amarillo. Diplococo, Gram negativa.	









Además, se obtuvieron y caracterizaron 266 aislados, clasificados en 52 morfotipos, obtenidos a partir de tejidos foliares con daño evidente de roya. Dentro de las 52 morfotipos presentes en áreas foliares con daño evidente, los aislados representantes de los morfotipos fueron seleccionados al azar. Se encontró un porcentaje de 73 % de bacterias Gram negativas y 27 % de bacterias Gram positivas (Cuadro 3).









Cuadro 3. Descripción de morfotipos bacterianos de áreas foliares con daño evidente de roya, de la zona de muestreo en la comunidad de San Miguel Reyes, Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.









Morfotipo	Descripción (Forma de la colonia, borde, elevación, superficie, consistencia, color, forma celular y tinción de Gram)	Foto (100X)
BEOx24	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, cremosa, color amarillo. Diplococo, Gram positiva.	
BEOx2	Colonia con forma circular, con borde entero, convexa, lisa, cremosa, color amarillo claro. Coco, Gram Positiva.	
BEOx3	Colonia con forma circular, borde entero, elevada, lisa, cremosa, color blanco. Diplococo, Gram Negativa.	
BEOx5	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, cremosa, color amarillo. Coco, Gram negativa.	
BEOx6	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, cremosa, color blanco, Diplococo, Gram positiva.	
BEOx14	Colonia con forma irregular, borde entero, convexa, lisa, cremosa, color amarillo. Diplococo, Gram positiva.	





BEOx32	Colonia con forma irregular, borde entero, elevada, rugosa, membranosa, color amarillo claro. Diplococo, Gram negativa.	
BEOx33	Colonia con forma irregular, con borde ondulado, elevada, rugosa, costrosa, color amarillo. Coco, Gram negativa.	
BEOx58	Colonia con forma circular, borde ondulado, convexa, lisa, cremosa/membranosa, color amarillo. Diplococo, Gram positiva.	
BEOx75	Colonia con forma circular, borde entero, plana, lisa, cremosa, color amarillo claro. Coco, Gram negativo.	
BEOx79	Colonia con forma irregular, borde lobulado, convexa, rugosa, membranosa, color naranja claro. Diplococo, Gram negativa.	
BEOx81	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, membranosa, color amarillo. Coco, Gram negativa.	
BEOx84	Colonia con forma circular, borde entero, elevada, lisa, cremosa, color blanco /amarillo. Diplococo, Gram positiva.	
BEOx91	Colonia con forma circular, entero, convexa, lisa, cremosa/membranosa, color amarillo claro. Diplococo, Gram negativa.	

BEOx100	Colonia con forma circular, entero, elevada, rugosa, cremosa, color blanco transparente. Diplococo, Gram positiva.	
BEOx102	Colonia con forma circular, borde entero, elevada, lisa, cremosa, color amarillo. Coco, Gram negativa.	
BEOx103	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, rugosa, cremosa/membranosa, color amarillo. Coco, Gram negativa.	
BEOx105	Colonia con forma circular, borde entero, elevada, lisa, cremosa, color amarillo claro. Coco, Gram negativa.	
BEOx119	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, rugosa, cremosa/membranosa, color amarillo, Diplococo, Gram negativa.	
BEOx121	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, cremosa/membranosa, color amarillo claro. Coco, Gram negativa.	
BEOx122	Colonia con forma circular, borde entero, plana, rugosa, membranosa, color amarillo claro. Coco, Gram negativa.	
BEOx124	Colonia con forma irregular, borde entero, convexa, lisa, cremosa, color blanco. Diplococo, Gram positiva.	

BEOx126	Colonia con forma circular, borde entero, elevada, rugosa, cremosa, color blanco transparente. Diplococo, Gram positiva.	
BEOx131	Colonia con forma irregular, borde ondulado, elevada, rugosa, cremosa, color amarillo transparente. Coco, Gram negativa	
BEOx134	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, rugosa, membranosa, color naranja claro. Coco, Gram negativa.	
BEOx142	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, cremosa, color naranja. Diplococo, Gram negativa.	
BEOx146	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, rugosa, membranosa, color amarillo. Diplococo, Gram positiva.	
BEOx147	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, cremosa/membranosa, color amarillo. Diplococo, Gram negativa.	
BEOx153	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, rugosa, membranosa, color amarillo. Coco, Gram positiva.	
BEOx156	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, rugosa, cremosa, color amarillo. Coco, Gram negativa.	

BEOx164	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, rugosa, membranosa, color amarillo claro. Coco, Gram negativa.	
BEOx178	Colonia con forma irregular, borde entero, convexa, rugosa, membranosa, color amarillo. Diplococo, Gram negativa.	
BEOx181	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, rugosa, membranosa, color amarillo. Coco, Gram negativa.	
BEOx186	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, membranosa, amarillo. Coco, Gram negativa.	
BEOx191	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, rugosa, membranosa, amarillo. Coco, Gram negativa.	
BEOx193	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, cremosa, colonia naranja. Vibriones, Gram positiva.	
BEOx196	Colonia con forma irregular, borde entero, elevada, rugosa, membranosa, color blanco transparente. Cocobacilo, Gram negativa.	
BEOx201	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, membranosa, color amarillo. Diplococo, Gram negativa.	

BEOx203	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, membranosa, color amarillo. Coco, Gram positiva.	
BEOx209	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, plegada, membranosa, color amarillo. Diplococo, Gram negativa.	
BEOx219	Colonia con forma circular, borde ondulado, plana, rugosa, membranosa, color amarillo. Diplococo, Gram negativa.	
BEOx227	Colonia con forma circular, borde entero, plana, lisa, membranosa, color amarillo. Diplococo, Gram negativa.	
BEOx239	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, membranosa, color amarillo claro. Coco, Gram negativa.	
BEOx242	Colonia con forma circular, borde ondulado, convexa, plegada, membranosa, color amarillo. Coco, Gram negativa.	
BEOx259	Colonia con forma circular, borde entero, elevada, lisa, membranosa, color blanco. Diplococo, Gram negativa.	
BEOx248	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, cremosa, naranja claro. Diplococo, Gram negativa.	

BEOx261	Colonia con forma circular, borde entero, plana, lisa, membranosa, color amarillo claro. Cocobacilo, Gram negativa.	
BEOx263	Colonia con forma circular, borde ondulado, plana, rugosa, membranosa, color amarillo. Coco, Gram negativa.	
BEOx264	Colonia con forma circular, borde entero, plana, lisa, membranosa, color amarillo. Coco, Gram negativa.	
BEOx277	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, cremosa/membranosa, color amarillo. Diplococo, Gram negativa.	

5.2. Identificación molecular de aislados bacterianos de áreas foliares con y sin daño evidente de roya, de la zona de muestreo en Huatusco, Veracruz

Se obtuvieron 61 aislados bacterianos, 30 aislados provenientes de área sin daño evidente y 31 aislados de área con daño evidente. Como primera parte, se obtuvieron las secuencias de 30 aislados bacterianos de la zona de muestreo de Huatusco, Veracruz, 11 provenientes de área foliar sin daño evidente de roya (Cuadro 4) y 19 de área con daño evidente de roya (Cuadro 5). Las asignaciones taxonómicas a nivel de género se realizaron utilizando un porcentaje de similitud mayor o igual al 93% con secuencias de la base de datos NCBI.

De los aislados provenientes de área foliar con daño evidente de roya, los géneros más abundantes fueron *Pseudomonas* (58%), *Frigoribacterium* (21%) y *Curtobacterium* (11%); además, los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* (5%) y *Xanthomonas* (5%) se aislaron exclusivamente a partir de estas muestras. Por otro lado, en área foliar sin daño evidente, *Curtobacterium* fue el género más abundante (69%), seguido de *Frigoribacterium* (27%) y de *Microbacterium* (18%), este último género siendo exclusivo de muestras sin daño evidente de roya.

Cuadro 4. Aislados bacterianos obtenidos de área foliar sin daño evidente de roya y sus secuencias con mayor similitud, extraídas de la base de datos NCBI “Secuencias de ARN ribosómico 16S (Bacteria y Archaea)”

Aislado	Secuencia con mayor porcentaje de similitud	Número de acceso	Porcentaje de similitud (%)
BS6	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	NR_025467.1	93.73%
BS13	<i>Curtobacterium herbarum</i>	NR_025461.1	94.76%
BS14	<i>Microbacterium testaceum</i>	NR_026163.1	94.49%
BS15	<i>Frigoribacterium faeni</i>	NR_026511.1	96.52%
BS17	<i>Frigoribacterium faeni</i>	NR_026511.1	98.71%
BS19	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	NR_116064.1	99.62%
BS20	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	NR_025467.1	93.73%
BS22	<i>Frigoribacterium faeni</i>	NR_026511.1	97.16%
BS23	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	NR_116064.1	97.19%
BS25	<i>Microbacterium testaceum</i>	NR_026163.1	95.51%
BS26	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	NR_116064.1	93.73%

Cuadro 5. Aislados bacterianos obtenidos de área foliar con daño evidente de roya y sus secuencias con mayor similitud, extraídas de la base de datos NCBI “Secuencias de ARN ribosómico 16S (Bacteria y Archaea)”

Aislado	Secuencia con mayor porcentaje de similitud	Número de acceso	Porcentaje de similitud (%)
BE1	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	NR_117285.1	97.06%
BE5	<i>Frigoribacterium endophyticum</i>	NR_134732.1	97.95%
BE8	<i>Frigoribacterium faeni</i>	NR_026511.1	99.1%
BE9	<i>Xanthomonas campestris</i>	NR_074936.1	97.7%
BE10	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	NR_025467.1	100%
BE11	<i>Frigoribacterium faeni</i>	NR_026511.1	98.71%
BE13	<i>Pseudomonas bohemica</i>	NR_159101.1	98.58%
BE19	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i>	NR_040860.1	98.98%








BE20	<i>Frigoribacterium faeni</i>	NR_026511.1	99.1%
BE22	<i>Pseudomonas parafulva</i>	NR_040859.1	98.98%
BE23	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	NR_025467.1	100%
BE24	<i>Pseudomonas paralactis</i>	NR_156987.1	99.87%
BE25	<i>Pseudomonas paralactis</i>	NR_156987.1	99.87%
BE26	<i>Pseudomonas parafulva</i>	NR_040859.1	98.97%
BE27	<i>Pseudomonas paralactis</i>	NR_156987.1	99.87%
BE28	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i>	NR_040860.1	98.85%
BE29	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i>	NR_040860.1	98.98%
BE30	<i>Pseudomonas paralactis</i>	NR_156987.1	100%
BE31	<i>Pseudomonas abietaniphila</i>	NR_041952.1	98.47%

5.3. Características morfológicas de aislados bacterianos que no fueron identificados molecularmente de área foliar con y sin daño evidente de roya, de la zona de muestreo de Huatusco, Veracruz.

Se aislaron 30 bacterias correspondientes a las áreas sin daño evidente de roya, de las cuales 11 fueron identificadas molecularmente y las 19 restantes se caracterizaron morfológicamente. Estos 19 aislados bacterianos se clasificaron en 7 morfotipos con base en los criterios microscópicos y macroscópicos anteriormente mencionados, los aislados representantes de los morfotipos fueron seleccionados al azar (Cuadro 6).






Cuadro 6. Descripción de morfotipos bacterianos de áreas sin daño evidente de roya, de la zona de muestreo en Huatusco, Veracruz.



Morfotipo	Descripción (Forma de la colonia, borde, elevación, superficie, consistencia, color, forma celular y tinción de Gram)	Foto (100X)
------------------	---	--------------------

BS3	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, rugosa, membranosa, color blanco. Diplococo, Gram positiva.	
BS4	Colonia con forma circular, borde ondulado, convexa, rugosa, cremosa, color amarillo. Coco, Gram positiva.	
BS5	Colonia con forma circular, borde entero, pulvinada, lisa, membranosa, color blanco transparente. Diplococo, Gram negativa.	
BS9	Colonia con forma circular, borde entero, pulvinada, lisa, membranosa, color blanco. Diplococo, Gram negativa.	
BS12	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, membranosa, transparente. Cocobacilo, Gram negativa.	
BS21	Colonia con forma circular, borde ondulado, convexa, rugosa, cremosa, color amarillo claro. Coco, Gram negativa.	
BS31	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, cremosa, color blanco. Coco, Gram Negativa.	

Para las muestras en áreas con daño evidente de roya se aislaron 31 bacterias, de las cuales 19 fueron identificadas molecularmente. Las 12 bacterias restantes se caracterizaron morfológicamente y se agruparon en 7 morfotipos, los aislados representativos de los morfotipos fueron seleccionados al azar (Cuadro 7).

Cuadro 7. Descripción de morfotipos bacterianos de áreas con daño evidente de roya, de la zona de muestreo en Huatusco, Veracruz.

Morfotipo	Descripción (Forma de la colonia, borde, elevación, superficie, consistencia, color, forma celular y tinción de Gram)	Foto (100X)
BE2	Colonia con forma irregular, borde ondulado, convexa, rugosa, cremosa, color amarillo. Coco, Gram negativa.	
BE3	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, cremosa, color rosa claro. Coco, Gram positiva.	
BE4	Colonia con forma circular, borde ondulado, convexa, lisa, cremosa, color blanco. Coco, Gram positiva.	
BE14	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, cremosa, color amarillo. Cocobacilo, Gram negativa.	
BE15	Colonia con forma circular, borde entero, convexa, lisa, cremosa, color blanco. Bacilo, Gram negativa.	

BE16	Colonia con forma irregular, borde entero, pulvinada, lisa, membranosa, color blanco. Coco, Gram negativa.	
BE18	Colonia con forma irregular, borde ondulado, elevada, lisa, cremosa, color amarillo. Coco, Gram negativa.	

5.4. Evaluación *in vitro* de la actividad antagónica de los aislados bacterianos contra *H. vastatrix*, de la zona de muestreo en la comunidad de San Miguel Reyes, Putla Villa de Guerrero, Oaxaca

Se evaluaron 11 aislados bacterianos (representantes de los morfotipos identificados) de área foliar sin daño evidente de roya por su capacidad para inhibir la germinación *in vitro* de uredosporas de *H. vastatrix*. Se realizaron conteos de germinación de uredosporas a las 6, 12, 24 y 36 h después de la inoculación (Anexo 1).

En la Figura 7 se observa el índice de inhibición en la germinación de uredosporas causados por los 11 aislados bacterianos a las 6 h. Diez aislados bacterianos causaron de manera significativa la inhibición de germinación ($P \leq 0.05$), en comparación con el control. Únicamente los aislados BSOx2, BSOx27, BSOx24, BSOx1, BSOx18, BSOx25 inhibieron más del 50%. El aislado bacteriano BSOx25 provocó el mayor valor de inhibición a las 6 h (87.05%) seguido del aislado BSOx18 (85.53%).

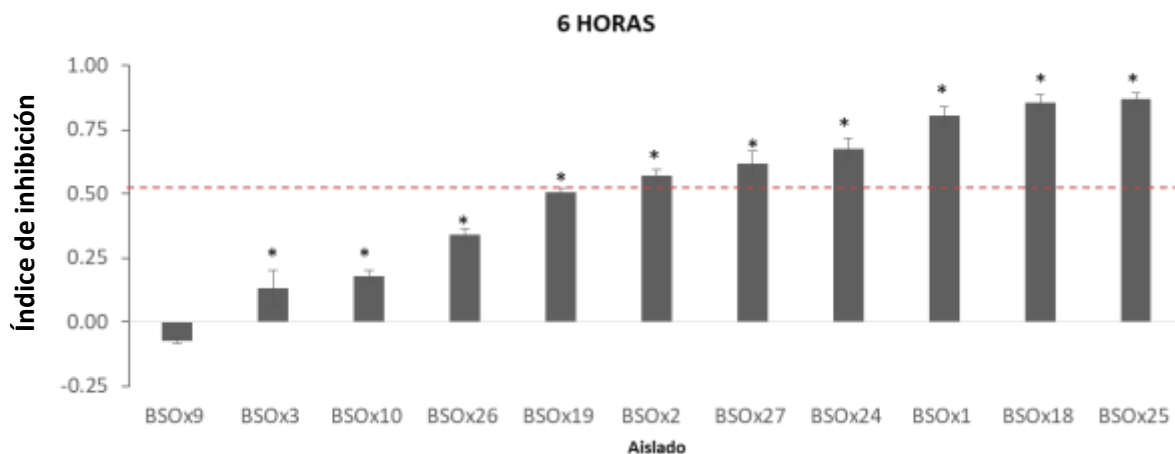


Figura 7. Índice de inhibición de la germinación de esporas de *H. vastatrix* en contacto con los aislados bacterianos, provenientes de áreas sin daño evidente de roya, a las 6 horas. Los valores representan el promedio de los índices de inhibición de 3 réplicas \pm el error estándar. * Diferencias significativas ($P \leq 0.05$), con prueba de ANOVA y una prueba *a posteriori* de Dunnett.

En la Figura 8 se observa el índice de inhibición en la germinación de uredosporas causados por los 11 aislados bacterianos a las 12 horas. Diez aislados bacterianos inhibieron significativamente la germinación ($P \leq 0.05$), en comparación con el control. Sin embargo, solo BSOx1 y BSOx18 inhibieron la germinación de uredosporas por arriba del 50%. El aislado con mayor porcentaje de inhibición en este tiempo fue BSOx1 (85.66%) seguido de BSOx18 (84.57%).

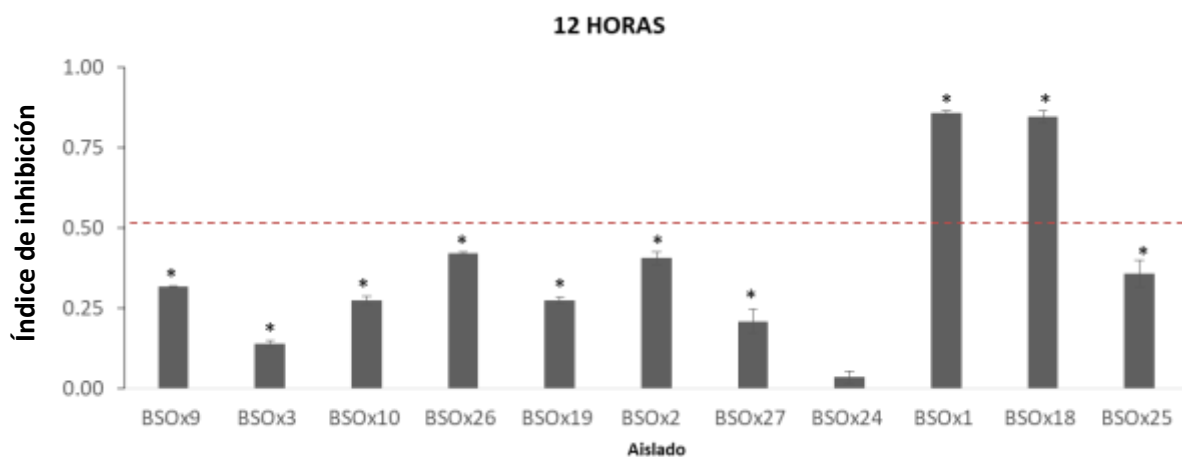


Figura 8. Índice de inhibición de la germinación de esporas de *H. vastatrix* en contacto con los aislados bacterianos, provenientes de áreas sin daño evidente de roya, a las 12 horas. Los valores representan el promedio de los índices de inhibición de 3 réplicas \pm el error estándar.

* Diferencias significativas ($P \leq 0.05$), con prueba de ANOVA y una prueba *a posteriori* de Dunnett.

En la Figura 8 se observa el índice de inhibición en la germinación de uredosporas causados por los 11 aislados bacterianos a las 24 horas. Diez aislados bacterianos inhibieron de manera significativa la germinación de las uredosporas ($P \leq 0.05$), en comparación con el control. Nuevamente los aislados BSOx1 (90.75%) y BSOx18 (84.02%) inhibieron la germinación de uredosporas por arriba del 50%. Dos aislados, BSOx19 y BSOx24, promovieron la germinación de las uredosporas hasta en un 20.55% y 31.54%, respectivamente.

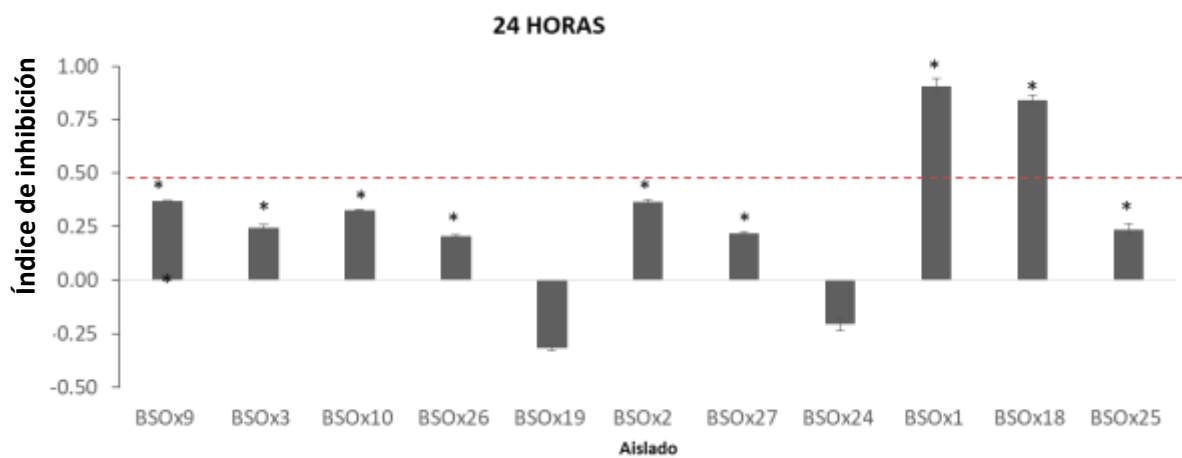


Figura 9. Índice de inhibición de la germinación de esporas de *H. vastatrix* en contacto con los aislados bacterianos, provenientes de áreas sin daño evidente de roya, a las 24 horas. Los valores representan el promedio de los índices de inhibición de 3 réplicas \pm el error estándar. * Diferencias significativas ($P \leq 0.05$), con prueba de ANOVA y una prueba *a posteriori* de Dunnett.

En la Figura 10 se observa el índice de inhibición en la germinación de uredosporas causados por los 11 aislados bacterianos a las 36 horas. Solo 2 aislados bacterianos inhibieron de manera significativa la germinación ($P \leq 0.05$). Los demás aislados perdieron la capacidad antagonista presentada en los tiempos previos, algunos de ellos incluso promovieron la germinación con respecto al control. Los aislados BSOx1 y BSOx18 inhibieron la germinación de uredosporas por arriba del 50%. El aislado con mayor porcentaje de inhibición fue BSOx1 (87.28%), seguido de BSOx18 (65.67%), ambos aislados inhibieron más del 50% de germinación de uredosporas en los cuatro tiempos de medición.

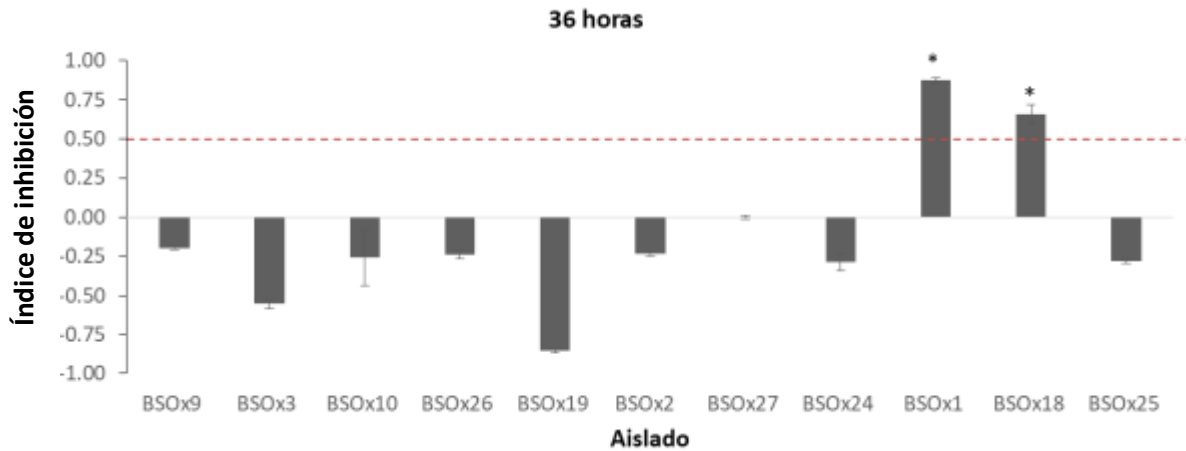


Figura 10. Índice de inhibición de los aislados bacterianos, de áreas sin daño evidente de roya, con actividad antagonista contra *H. vastatrix* a las 36 horas. Los valores representan el promedio de porcentajes de inhibición de 3 réplicas \pm el error estándar. * Diferencias significativas ($P \leq 0.05$), con prueba de ANOVA y una prueba *a posteriori* de Dunnett.

En el caso de los aislados provenientes de área foliar con daño evidente de roya, se evaluaron 51 aislados (representantes de los morfotipos formados), se realizaron mediciones de germinación de uredosporas a las 6, 12, 24 y 36 horas después de la inoculación (Anexo 2). Únicamente 27 aislados inhibieron de manera significativa ($P \leq 0.05$), en comparación con el control, el índice de germinación por lo menos en alguna de las mediciones.

En la figura 11 se muestra el índice de inhibición en la germinación de uredosporas causados por los 27 aislados bacterianos a las 6 horas. Del total de aislados bacterianos, 19 aislados inhibieron de manera significativa la germinación ($P < 0.05$). Los aislados BEOx259, BEOx264, BEOx191, BEOx24, BEOx33, BEOx131, BEOx209, BEOx81, BEOx4, BEOx181, BEOx58, inhibieron por arriba del 50% la germinación. El aislado BEOx58 obtuvo el mayor índice de inhibición con un 98.88%, seguido de BEOx181 (97.82 %) y BEOx4 (93.92%).

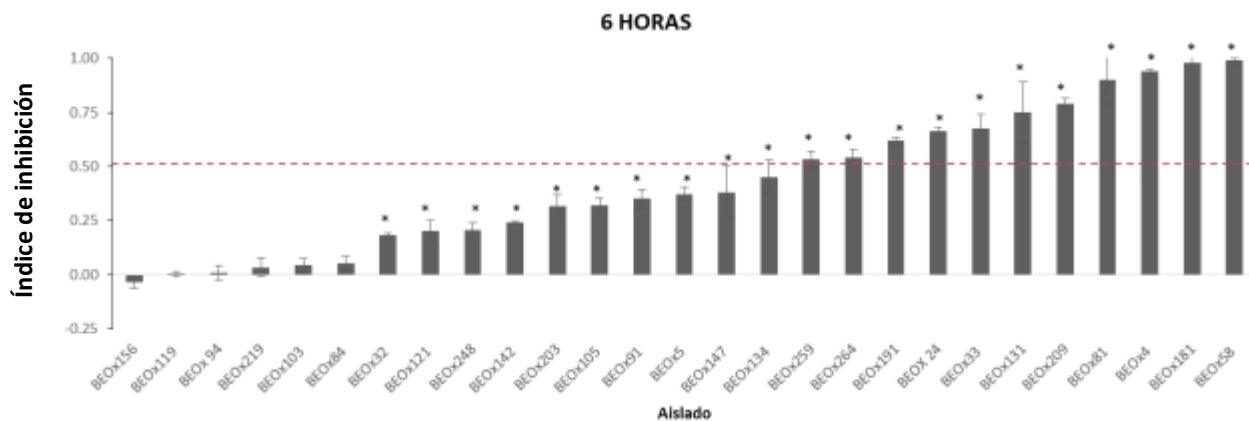


Figura 11. Índice de inhibición de la germinación de esporas de *H. vastatrix* en contacto con los aislados bacterianos, provenientes de áreas con daño evidente de roya, a las 6 horas. Los valores representan el promedio de los índices de inhibición de 3 réplicas \pm el error estándar. * Diferencias significativas ($P \leq 0.05$), con prueba de ANOVA y una prueba *a posteriori* de Dunnett.

En la figura 12 se muestra el índice de inhibición en la germinación de uredosporas causados por los 25 aislados bacterianos a las 12 horas, 19 aislados inhibieron de manera significativa la germinación de uredosporas. Los aislados BEOx264, BEOx191, BEOx24, BEOx131, BEOx209, BEOx81, BEOx181 y BEOx58 inhibieron por arriba del 50% de germinación de uredosporas. El aislado con mayor índice de inhibición fue BEOx58 con 88.22%, seguido de BEOx209 y BEOx81 con 86.92% y 80.46% respectivamente.

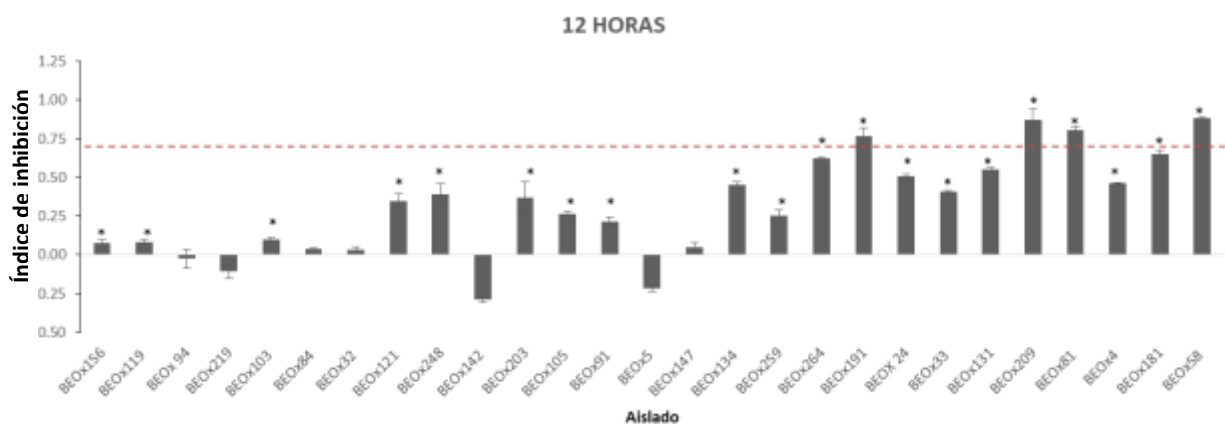


Figura 12. Índice de inhibición de la germinación de esporas de *H. vastatrix* en contacto con los aislados bacterianos, provenientes de áreas con daño evidente de roya, a las 12 horas. Los valores representan el promedio de los índices de inhibición de 3 réplicas \pm el error estándar. * Diferencias significativas ($P \leq 0.05$), con prueba de ANOVA y una prueba *a posteriori* de Dunnett.

En la figura 13 se muestra el índice de inhibición en la germinación de uredosporas causados por los 25 aislados bacterianos a las 24 horas. Nuevamente 19 aislados inhibieron de manera significativa la germinación. Sin embargo, para este tiempo solamente los aislados BEOx264, BEOx191, BEOx209, BEOx81 y BEOx58 inhibieron por arriba del 50%. El aislado BEOx58 inhibió el 95.59% de la germinación, seguido de BEOx191, BEOx209 y BEOx81 con un 77.43%, 73.03% y 72.71% respectivamente.



Figura 13. Índice de inhibición de la germinación de esporas de *H. vastatrix* en contacto con los aislados bacterianos, provenientes de áreas con daño evidente de roya, a las 24 horas. Los valores representan el promedio de los índices de inhibición de 3 réplicas \pm el error estándar. * Diferencias significativas ($P \leq 0.05$), con prueba de ANOVA y una prueba *a posteriori* de Dunnett.

En la figura 14 se muestra el índice de inhibición en la germinación de uredosporas causados por los 25 aislados bacterianos a las 36 horas. 14 aislados inhibieron de manera significativa ($P < 0.05$), con respecto al control. Nuevamente los aislados BEOx264, BEOx191, BEOx209, BEOx81 y BEOx58 inhibieron por arriba del 50%. El aislado con mayor índice de inhibición fue BEOx58 (94.24%), seguido de BEOx191 (76.26%), BEOx81 (75.72%) y BEOx209 (71.98%).

Los aislados BEOx191, BEOx81, BEOx209 y BEOx58, inhibieron la germinación de uredosporas por arriba del 50% en los cuatro tiempos de medición. BEOx58 obtuvo los valores más altos en los diferentes tiempos de medición.

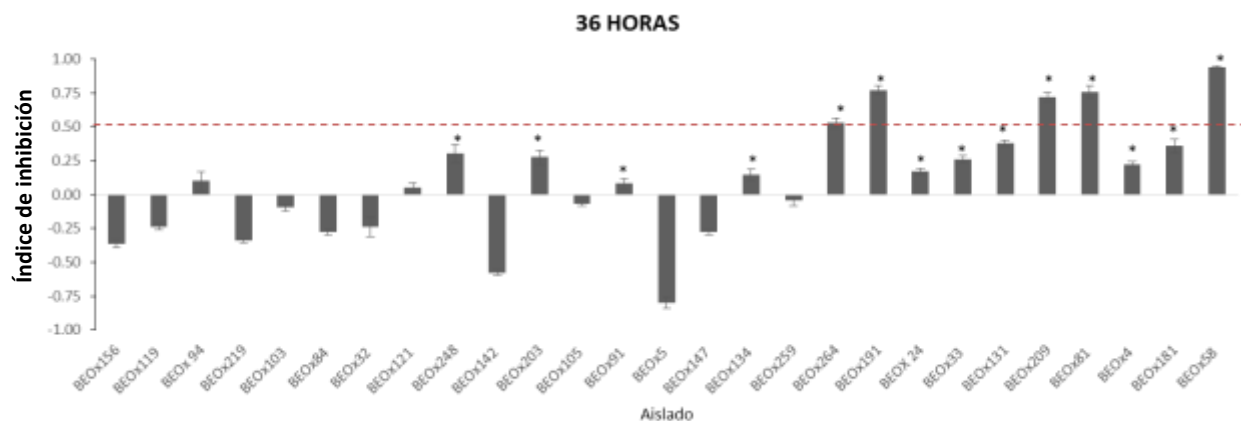


Figura 14. Índice de inhibición de la germinación de esporas de *H. vastatrix* en contacto con los aislados bacterianos, provenientes de áreas con daño evidente de roya, a las 36 horas. Los valores representan el promedio de los índices de inhibición de 3 réplicas \pm el error estándar. * Diferencias significativas ($P \leq 0.05$), con prueba de ANOVA y una prueba *a posteriori* de Dunnett.

5.5. Evaluación *in vitro* de la actividad antagónica de los aislados bacterianos contra *H. vastatrix*, de la zona de muestreo de Huatusco, Veracruz.

Se probaron 12 aislados bacterianos de áreas sin daño evidente de roya, 5 aislados representantes de aquellos que fueron identificados molecularmente de las áreas sin daño evidente, esta selección se hizo tomando de referencia el mayor porcentaje de similitud entre los aislados que coincidieron con el mismo porcentaje de similitud con las secuencias del GenBank (BS17 con 98.71% de similitud con *F. faeni*), y 7 aislados representantes de los morfotipos formados. Se realizaron mediciones de germinación de uredosporas a las 6, 12, 24 y 36 horas después de la inoculación (Anexo 3). Solamente siete aislados inhibieron la germinación de manera significativa ($P \leq 0.05$) con respecto al control, en alguna de las mediciones. BS4, BS21, BS3, BS31, BS9 y BS12 son aislados correspondientes a los morfotipos formados y BS17 identificado como perteneciente al género *Frigoribacterium*.

En la Figura 15 se muestra el índice de inhibición en la germinación de uredosporas causados por los siete aislados bacterianos a las 6 horas. Todos los aislados inhibieron la germinación de manera significativa ($P < 0.05$), con respecto al control. Los aislados BS9 y BS12 inhibieron por arriba del 50%, el aislado con mayor índice de inhibición fue BS12 (100%) seguido de BS9 (72.81%).

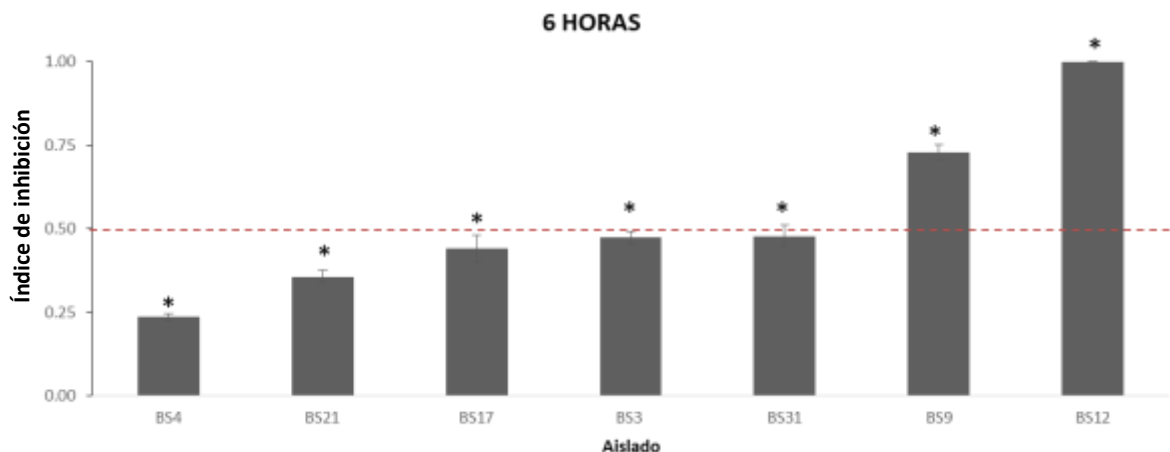


Figura 15. Índice de inhibición de la germinación de esporas de *H. vastatrix* en contacto con los aislados bacterianos, provenientes de áreas sin daño evidente de roya, a las 6 horas. Los valores representan el promedio de los índices de inhibición de 3 réplicas \pm el error estándar. * Diferencias significativas ($P \leq 0.05$), con prueba de ANOVA y una prueba *a posteriori* de Dunnett.

En la Figura 16 se muestra el índice de inhibición en la germinación de uredosporas, causados por los siete aislados bacterianos a las 12 horas. Todos los aislados inhibieron la germinación de esporas de manera significativa ($P < 0.05$), con respecto al control. Los aislados BS9 y BS12 inhibieron por arriba del 50%. BS12 fue el aislado con mayor índice de inhibición (89.66%) seguido de BS9 (59.48%).

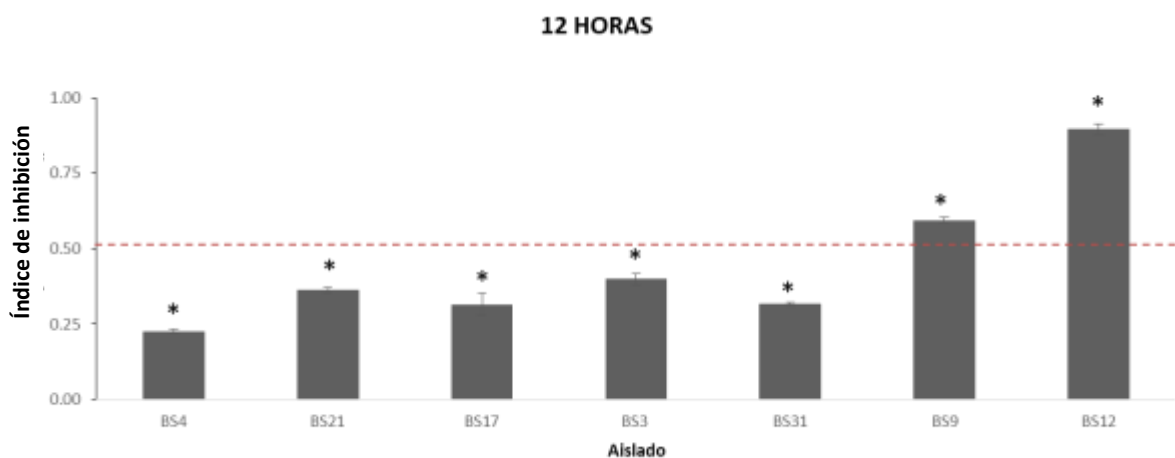


Figura 16. Índice de inhibición de la germinación de esporas de *H. vastatrix* en contacto con los aislados bacterianos, provenientes de áreas sin daño evidente de roya, a las 12 horas. Los valores representan el promedio de los índices de inhibición de 3 réplicas \pm el error estándar. * Diferencias significativas ($P \leq 0.05$), con prueba de ANOVA y una prueba *a posteriori* de Dunnett.

En la Figura 17 se muestra el índice de inhibición en la germinación de uredosporas, causados por los siete aislados bacterianos a las 24 horas. Todos los aislados inhibieron la germinación de manera significativa ($P < 0.05$), con respecto al control. El aislado BS12 presentó el mayor porcentaje de inhibición con un 87.57%, seguido del aislado BS9 con un 47.15%.

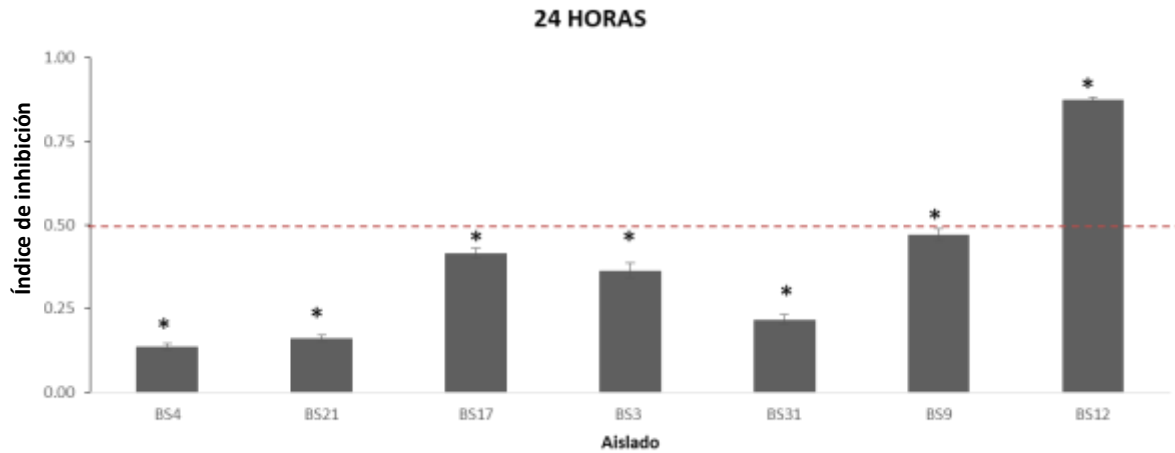


Figura 17. Índice de inhibición de la germinación de esporas de *H. vastatrix* en contacto con los aislados bacterianos, provenientes de áreas sin daño evidente de roya, a las 24 horas. Los valores representan el promedio de los índices de inhibición de 3 réplicas \pm el error estándar. * Diferencias significativas ($P \leq 0.05$), con prueba de ANOVA y una prueba *a posteriori* de Dunnett.

En la Figura 18 se muestra el porcentaje de inhibición en la germinación de uredosporas, causados por los siete aislados bacterianos a las 24 horas. Solo seis aislados inhibieron de manera significativa ($P \leq 0.05$), con respecto al control. El aislado BS12 inhibió la germinación de uredosporas con un 89.71%, seguido de *Frigoribacterium* sp. BS17 con 40.90%. El aislado BS12 inhibió por arriba del 50% en los diferentes tiempos de medición, seguido de BS9 que solo obtuvo valores por arriba del 50% a las 6 y 12 horas.

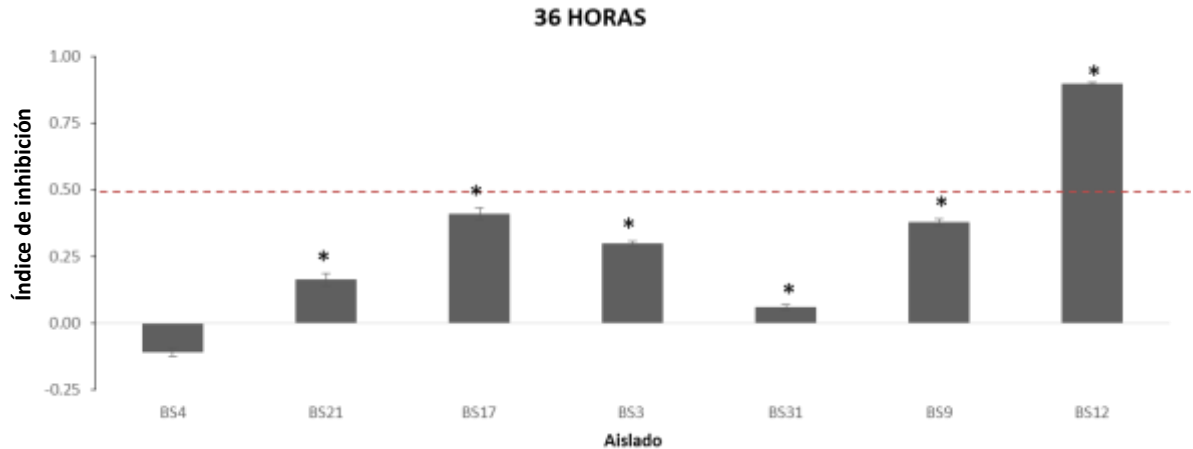


Figura 18. Índice de inhibición de la germinación de esporas de *H. vastatrix* en contacto con los aislados bacterianos, provenientes de áreas sin daño evidente de roya, a las 36 horas. Los valores representan el promedio de los índices de inhibición de 3 réplicas \pm el error estándar. * Diferencias significativas ($P \leq 0.05$), con prueba de ANOVA y una prueba *a posteriori* de Dunnett.

En el caso de los aislados de áreas con daño evidente de roya se probaron 17 aislados, 10 aislados representantes de aquellos que fueron identificados molecularmente de las áreas con daño evidente, tomando de criterio de selección el mayor porcentaje de similitud entre los aislados que coincidieron con el mismo porcentaje de similitud con las secuencias del GenBank, y 7 aislados representantes de los morfotipos formados. Solamente 14 aislados inhibieron la germinación de uredosporas de manera significativa ($P \leq 0.05$) con respecto al control, en alguna de las mediciones (Anexo 4). Diez de estos aislados fueron identificados molecularmente: BE25, B29, BE22, BE31 y BE13 pertenecientes al género *Pseudomonas*, BE5 y BE11 al género *Frigoribacterium*, BE23 a *Curtobacterium*, BE9 a *Xanthomonas* y BE1 a *Bacillus*. Los aislados BE16, BE14, BE2 y BE15 son representantes de los morfotipos formados.

En la Figura 19 se muestra el índice de inhibición en la germinación de uredosporas causados por 14 aislados bacterianos a las 6 horas. Solo 12 aislados inhibieron la germinación de uredosporas de manera significativa, ($P \leq 0.05$) con respecto al control. Los aislados BE23, BE14, BE2, BE31, BE15, BE5, BE29, BE1, inhibieron por arriba del 50% la germinación. El aislado con mayor índice de inhibición fue *Bacillus* sp. BE1 (91.93%), seguido de *Pseudomonas* sp. BE29 (82.41%), *Frigoribacterium* sp. BE5 (72.72%), BE15 (64.87%) y *Pseudomonas* sp. BE31 (61.75%). El aislado *Pseudomonas* sp. BE25 promovió la germinación de uredosporas a las 6 horas.

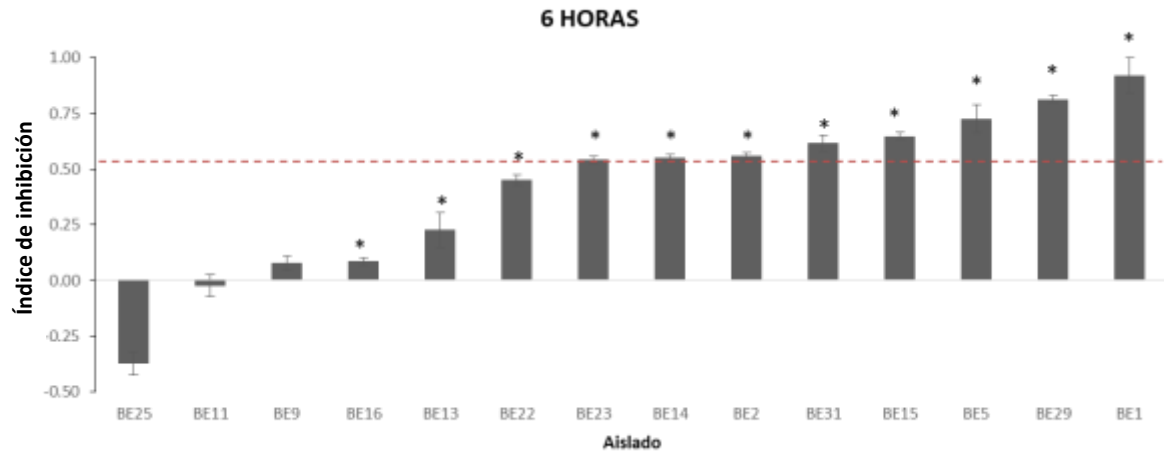


Figura 19. Índice de inhibición de la germinación de esporas de *H. vastatrix* en contacto con los aislados bacterianos, provenientes de áreas con daño evidente de roya, a las 6 horas. Los valores representan el promedio de los índices de inhibición de 3 réplicas \pm el error estándar. * Diferencias significativas ($P \leq 0.05$), con prueba de ANOVA y una prueba *a posteriori* de Dunnett.

En la Figura 19 se muestra el índice de inhibición en la germinación de uredosporas causados por 14 aislados bacterianos a las 12 horas. 13 aislados inhibieron la germinación de uredosporas de manera significativa, ($P < 0.05$) con respecto al control. Los aislados BE22, BE23, BE14, BE2, BE5, BE29, BE1, inhibieron por arriba del 50% la germinación. El aislado con mayor índice de inhibición fue *Bacillus* sp. BE1 (100%), seguido de *Pseudomonas* sp. BE29 (82.78%), *Frigoribacterium* sp. BE5 (60.76%) y *Curtobacterium* sp. BE23 (60.50%).

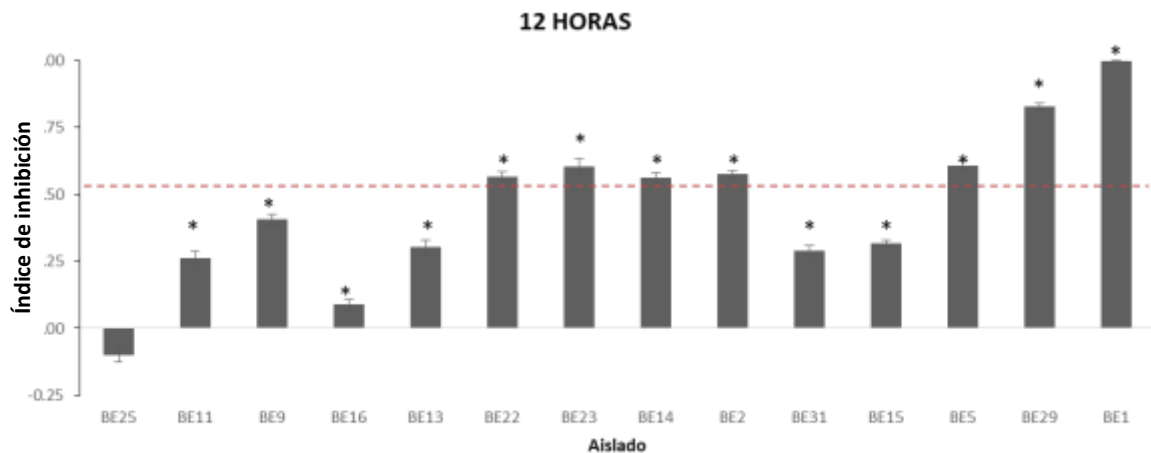


Figura 20. Índice de inhibición de la germinación de esporas de *H. vastatrix* en contacto con los aislados bacterianos, provenientes de áreas con daño evidente de roya, a las 12 horas. Los valores representan el promedio de los índices de inhibición de 3 réplicas \pm el error estándar.

* Diferencias significativas ($P \leq 0.05$), con prueba de ANOVA y una prueba *a posteriori* de Dunnett.

En la Figura 21 se muestra el índice de inhibición en la germinación de uredosporas causados por 14 aislados bacterianos a las 24 horas. Todos los aislados inhibieron de manera significativa ($P \leq 0.05$) con respecto al control, la germinación de uredosporas. Los aislados BE9, BE22, BE5, BE29 y BE1, inhibieron por arriba del 50% la germinación. El aislado con mayor índice de inhibición fue *Pseudomonas* sp. BE29 (93.75%), seguido de *Bacillus* sp. BE1 (86.84%), *Pseudomonas* sp. BE22 (72.90%) y *Xanthomonas* sp. BE9 (63.85%).

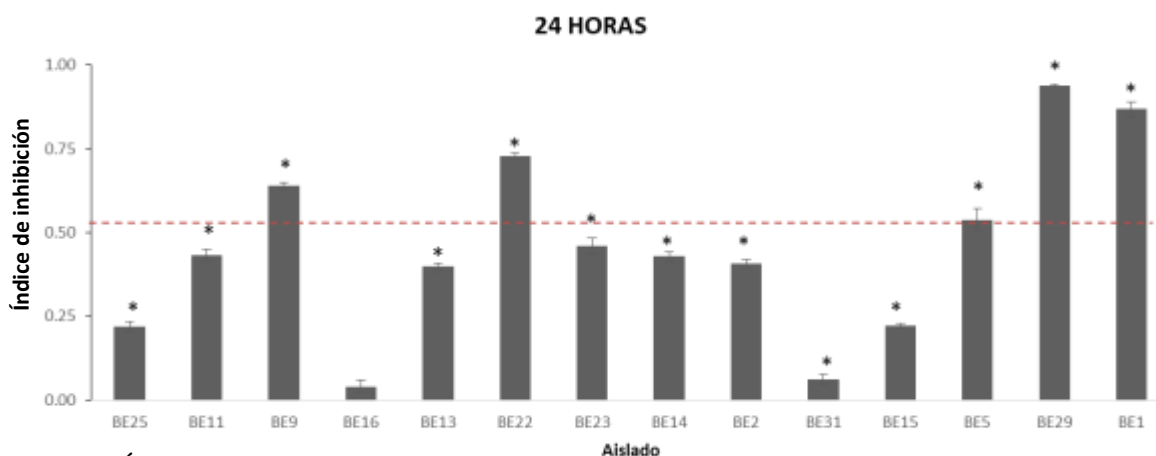


Figura 21. Índice de inhibición de la germinación de esporas de *H. vastatrix* en contacto con los aislados bacterianos, provenientes de áreas con daño evidente de roya, a las 24 horas. Los valores representan el promedio de los índices de inhibición de 3 réplicas \pm el error estándar. * Diferencias significativas ($P \leq 0.05$), con prueba de ANOVA y una prueba *a posteriori* de Dunnett.

En la Figura 22 se muestra el índice de inhibición en la germinación de uredosporas causados por 14 aislados bacterianos a las 36 horas. 13 aislados inhibieron de manera significativa, ($P \leq 0.05$) con respecto al control, la germinación de uredosporas. Los aislados BE9, BE23, BE5, BE29 y BE1, inhibieron por arriba del 50% la germinación. El aislado con mayor índice de inhibición fue *Pseudomonas* sp. BE29 (93.21%), seguido de *Bacillus* sp. BE1 (88.48%), *Frigoribacterium* sp. BE5 (74.94%), *Xanthomonas* sp. BE9 (60.20%) y *Curtobacterium* sp. BE23 (60.16%). Los aislados BE1, BE29 y BE5 inhibieron por arriba del 50% en los cuatro tiempos de medición; *Bacillus* sp. BE1 obtuvo los valores más altos, seguido de *Pseudomonas* sp. BE29 y *Frigoribacterium* sp. BE5.

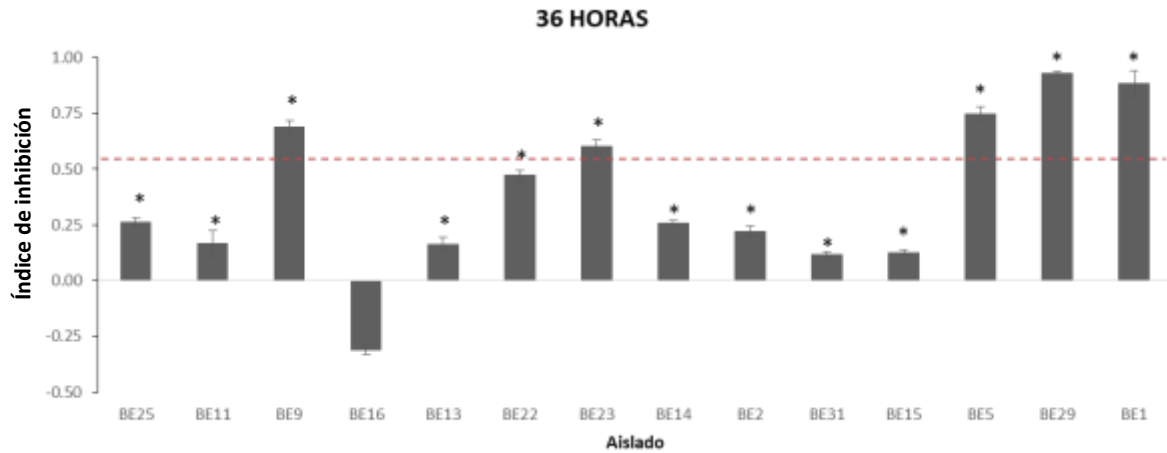


Figura 22. Índice de inhibición de la germinación de esporas de *H. vastatrix* en contacto con los aislados bacterianos, provenientes de áreas con daño evidente de roya, a las 36 horas. Los valores representan el promedio de los índices de inhibición de 3 réplicas \pm el error estándar. * Diferencias significativas ($P \leq 0.05$), con prueba de ANOVA y una prueba *a posteriori* de Dunnett.

6. Discusión

Hemileia vastatrix no sólo afecta la salud de las plantas, se ha convertido en uno de los causantes de enfermedades más destructivas y de mayor importancia económica para el sector cafetalero (SAGARPA, 2016) El control convencional de esta enfermedad se basa principalmente en la aplicación de fórmulas químicas, y recientemente en la sustitución de plantas por variedades resistentes. Se ha reportado la generación de resistencia del patógeno a fungicidas y afectando variedades aparentemente resistentes (Zambolim, 2016). Por lo tanto, la búsqueda de enemigos naturales es una alternativa necesaria para el control de la enfermedad (Yirga, 2020). En este trabajo, se evaluó la actividad antagónica de aislados bacterianos provenientes de hojas de café (*C. arabica*) con síntomas de roya en la germinación de esporas del agente causal *H. vastatrix*. Para cumplir con el objetivo, se realizaron experimentos *in vitro* con aislados bacterianos provenientes de hojas de café de áreas sin y con daño evidente de roya. La colecta de material biológico se realizó en dos sitios, ubicados en la comunidad de San Miguel Reyes, Oaxaca y en el municipio de Huatusco, Veracruz.

Para identificar un nuevo agente de control biológico con la capacidad de reducir la incidencia de enfermedades en plantas, es importante realizar escrutinios con la mayor cantidad posible de aislados bacterianos, entre otras razones, debido a la redundancia que puede existir al distinguir los morfotipos (Haddad *et al.*, 2009; 2013). En el caso de los cafetales en Oaxaca, se obtuvieron 297 aislados bacterianos y en los cafetales de Huatusco un total de 61 aislados. Se han reportado numerosos aislados de bacterias asociados a la filósfera de plantas en dos diferentes fincas de café, una con manejo orgánico y otra con manejo convencional, siendo más abundantes las colonias bacterianas provenientes de cultivos orgánicos (Carcache, 2002; Vidal-Martínez *et al.*, 2019). El patrón de comportamiento de las comunidades microbianas de la filósfera se ve alterado por efectos locales como las prácticas de cultivo, el grado de infestación por enfermedades y su manejo, o por eventos climáticos, entre otros (Carcache, 2002). Se han identificado bacterias provenientes de la filósfera de plantas de café que pueden actuar como agentes de control biológico con actividad antifúngica y nematicida (Benoit *et al.*, 2021)

En este estudio se identificaron los géneros *Pseudomonas*, *Frigoribacterium*, *Curtobacterium*, *Bacillus*, *Xanthomonas* y *Microbacterium* como presentes en las áreas foliares con y sin síntomas de roya en muestras de Huatusco, Veracruz (Cuadros 4 y 5). Se han reportado distintos géneros de bacterias que se desarrollan en el plano filosférico de diferentes plantas, los resultados de este estudio coinciden con la dominancia de los géneros *Bacillus*, *Curtobacterium* y *Pseudomonas* reportados en este trabajo (Knief *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2013; Báez-Vallejo *et al.*, 2020). En el caso del café, se reportan los géneros *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* como habitantes de los distintos tejidos (Vega *et al.*, 2005), además también se reportan los géneros bacterianos endófitos de raíces y semillas de plantas de *C. canephora* y *C. liberica*, los géneros dominantes fueron *Nocardia*, *Bacillus* y *Burkholderia* y *Streptomyces* (Benoit *et al.*, 2021). Estos géneros bacterianos comúnmente encontrados en la filósfera de distintas plantas han desarrollado

diversas estrategias para poder colonizar exitosamente estas superficies, por ejemplo, la formación de endosporas (*Bacillus*), la producción de biopelículas o de toxinas que permiten la liberación de metabolitos secundarios por la planta sin causar la necrosis del tejido vegetal (Lindow y Brandl, 2003).

Los principales resultados de la evaluación de la actividad antagónica de los aislados bacterianos seleccionados contra *H. vastatrix*, mostraron diferente actividad biológica sobre la germinación de uredosporas en los distintos tiempos de medición (6, 12, 24 y 36 horas). La eficiencia fue mayor con los aislados BSOx1, BSOx18, BEOx191, BEOx81, BEOx209, BEOx58, BS12, BE1, BE29 y BE5, que inhibieron la germinación de uredosporas en más de un 50% en los diferentes tiempos (Figuras 6-21). El aislado BE1 fue identificado como perteneciente al género *Bacillus*, BE29 como *Pseudomonas* y BE5 como *Frigoribacterium*. Los aislados BSOx1, BSOx81, BSOx191, BEOx209 y BS12 presentaron características microscópicas similares, siendo Gram negativas en forma de cocos. Los aislados BSOx18 y BEOx58 con características microscópicas Gram positiva en forma de coco y diplococo respectivamente (Cuadros 2, 3, 6 y 7).

El aislado BE1 fue identificado como *Bacillus* y redujo en un 88% la germinación de uredosporas. El género *Bacillus* y otras bacterias Gram positivas ofrecen grandes expectativas para ser aprovechadas, se han demostrado sus potencialidades para promover el crecimiento de las plantas y el control biológico de patógenos (Tejera-Hernández *et al.*, 2011; Méndez-Bravo *et al.*, 2018; Báez-Vallejo *et al.*, 2020). Se considera que algunas especies de este género son buenas candidatas para el desarrollo de formulaciones bioplaguicidas debido a su capacidad para producir antibióticos y compuestos antifúngicos (Ji *et al.*, 2013; Guevara-Avenidaño *et al.*, 2020). En estudios similares, se reporta el uso de bacterias asociadas a distintos tejidos vegetales de plantas de café con un efecto sobre *H. vastatrix*; por ejemplo, Shiomi *et al.*, (2006) reportaron que el uso de aislados identificados como *B. lentimorbus* y *B. cereus* inhiben más del 50% la germinación de uredosporas, y sugieren que al aplicar los aislados, éstos pueden actuar por antibiosis, lisis de estructuras patógenas, competencia o inducción de resistencia sistémica en el hospedante. Costa *et al.*, (2007) realizaron un experimento en invernadero y evaluaron la aplicación de *B. subtilis* en plantas de café (*C. arabica*), los resultados indican que redujo en un 77% la infección causada por *H. vastatrix*. Por otro lado, Silva *et al.*, (2012) señalan que el uso de *B. megaterium* en discos de hoja de café, tuvo un efecto cuando se aplicaba 72 o 24 horas antes de estar en contacto con *H. vastatrix*, reduciendo en un 60% la gravedad de la enfermedad en la planta; además señalan que el uso de *Brevibacillus choshinensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Cedacea davisae* y *Microbacterium testaceum*, disminuyen significativamente la severidad de la roya. Haddad *et al.*, (2009, 2013, 2014) identificaron ocho posibles aislados bacterianos, siete aislados fueron reportados como *Bacillus* spp., y uno como *Pseudomonas* sp. Estos aislados redujeron en más del 70 % la frecuencia de infección y el número de uredosporas por hoja, además, sugieren que estos aislados producen compuestos antifúngicos o desarrollan una resistencia sistémica inducida (ISR) a la roya del café.

Los aislados BE29, BE25, BE22 y BE13 fueron identificados como *Pseudomonas* spp., inhibieron en un 94, 22, 73 y 40% la germinación de uredosporas a las 24 horas. Sin embargo,

los aislados BE25, BE22 y BE13, aislados de la filósfera de café, de áreas con daño evidente, redujeron su efectividad a las 36 horas. *Pseudomonas* es un género de bacterias Gram negativas, está compuesto por más de 100 especies (Mulet *et al.*, 2010). Este género se caracteriza por su capacidad de producir metabolitos secundarios con actividad antagonica contra hongos u oomicetes fitopatógenos, por ejemplo, *P. cinnamomi*, *F. oxysporum*, *F. solani* (Ligon *et al.*, 2000; Martínez y Osorio, 2007; Méndez-Bravo *et al.*, 2018; Báez-Vallejo *et al.*, 2020; Benoit *et al.*, 2021). Posee una combinación de múltiples mecanismos a través de los cuales puede ejercer un control biológico efectivo, incluyendo el antagonismo directo, la emisión de compuestos volátiles antimicrobianos y la inducción de resistencia en la planta (Mulet *et al.*, 2010; Santoyo *et al.*, 2012; Báez-Vallejo *et al.*, 2020). Costa *et al.* (2007) reportaron que el uso de *P. putida* redujo la gravedad de infección ocasionada por la roya de café en un 90% en plantas de *C. arabica* en específico de la variedad de *Catuaí Vermelho*).

El género *Microbacterium* está conformado por bacterias Gram positivas, generalmente en forma de bacilos (Thorel *et al.*, 1990). Pertenece a las actinobacterias, las cuales se conocen por su amplia gama de compuestos antimicrobianos (Reverchon *et al.*, 2019). Los aislados B14 y BS25 fueron identificados como pertenecientes a este género, sin embargo, en este estudio no se obtuvo un efecto de *Microbacterium* en la germinación de uredosporas. Estos resultados contrastan con los reportados por Silva *et al.*, (2012), quienes indican que el uso de *Microbacterium testaceum* redujo en un 63% la germinación de uredosporas. *Microbacterium* sp., también ha sido reportado por su actividad inhibidora del hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, aislado del interior de las raíces de *Panax ginseng* C.A. Meyer (Cho *et al.*, 2007). Este género también se ha aislado de la rizósfera de *Platanus mexicana* y se reporta con actividad antifúngica ante el fitopatógeno *Fusarium solani* (Escudero-Osorio, 2018; Reverchon *et al.*, 2020).

Frigobacterium también pertenece al filo Actinobacteria. Es un género de bacteria Gram positiva, no formadora de esporas, que se caracteriza por tener un desarrollo óptimo a temperaturas que oscilan entre 4 y 10°C (Kämpfer, 2015). Este género ha sido asociado principalmente a la rizósfera, al haber sido aislado a partir de la rizósfera de plantas medicinales como *Echinacea purpurea* L. y *Echinacea angustifolia* (L.) Moench (Chiellin *et al.*, 2014). Recientemente se aisló *Frigobacterium* de la rizósfera de árboles de *Liquidambar styraciflua* y se ha reportado con actividad antifúngica contra *Fusarium solani* (Escudero-Osorio, 2018; Reverchon *et al.*, 2020). De manera interesante, los aislados BS17, BE11, BE25 y BE5 fueron identificados como pertenecientes a este género y aislados de la filósfera de café. Los aislados BS17 y BE11, obtenidos de las áreas foliares sin daño evidente y con daño evidente, respectivamente, de la zona de muestreo en Huatusco, Veracruz, inhibieron la germinación de uredosporas en un 41.56 y 43% respectivamente (Figuras 16 y 20, Cuadros 4 y 5), en las primeras 24 horas en estar en contacto contra *H. vastatrix*, mientras que el aislado BE5, proveniente de la zona de muestreo de Huatusco, Veracruz y del área con daño evidente, inhibió la germinación en un 75% a las 36 horas (Figura 21; Cuadro 5).

Curtobacterium es un género de bacterias Gram positivas, también pertenece al filo Actinobacteria (Yamada y Komagata, 1972). Este género está asociado a distintos tejidos vegetales, y se ha reportado como promotor de crecimiento vegetal y con actividad

antimicrobiana (Bulgari *et al.*, 2014). El aislado BE23, obtenido de tejidos foliares de área con daño evidente, fue identificado como *Curtobacterium* sp. e inhibió en un 60% la germinación de uredosporas a las 36 horas (Figura 21), este género aún no ha sido reportado por su actividad antagónica contra *H. vastatrix*. Sin embargo, *Curtobacterium flaccumfaciens* (en combinación con otras cepas de rizobacterias) induce la resistencia sistémica del pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum orbiculare*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* y *Erwinia tracheiphila* (Raupach y Kloepper, 1998). Aunado a esto, recientemente se aislaron varios *Curtobacterium* de la filósfera de *Nectandra salicifolia* y de *Platanus mexicana*, especies características del bosque de niebla veracruzano, y se reportó su actividad antifúngica contra *Fusarium solani* (Báez-Vallejo *et al.*, 2020; Reverchon *et al.*, 2020).

El género *Xanthomonas* comprende un grupo de bacterias Gram negativas, que son de típicamente de morfología bacilo y crecen a una temperatura óptima de 28°C (Saddler y Bradbury, 2005). EL aislado BE9, obtenido de tejidos foliares de áreas con daño evidente de las muestras de Huatusco, Veracruz, inhibió la germinación en un 69% a las 36 horas de estar en contacto con *H. vastatrix* (Figura 21), sin embargo, hasta el momento no se ha reportado su actividad antifúngica contra *H. vastatrix*. Es importante resaltar que este género se asocia principalmente a bacterias fitopatógenas, afecta a un amplio rango de hospedantes; la especie de *X. axonopodis* ocasiona la enfermedad del tizón común bacteriano en el frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Francisco-Francisco *et al.*, 2013); *X. campestris* pv. *vesicatoria* ocasiona la mancha bacteriana en el chile (*Capsicum annuum* L) (Robles-Hernández *et al.*, 2017); y *X. citri* causa el cancro de los cítricos, produciendo la defoliación, la caída prematura y manchado de frutos (Behlau *et al.*, 2011). Debido a que este género se asocia a enfermedades, existe muy poca investigación sobre los efectos positivos que el género *Xanthomonas* pudiera tener, en especial como atenuante de otros fitopatógenos. Se ha reportado a *Xanthomonas maltophilia* como agente de control biológico ante la enfermedad del parche de verano del césped ocasionada por el hongo *Magnaporthe poae*, inhibiendo en un 70% la enfermedad en estudios *in vitro* (Kobayashi *et al.*, 1995).

Es interesante observar como este género al interactuar únicamente con las uredosporas de *H. vastatrix* funge como posible agente de control biológico, sin embargo, es necesario complementar con otros estudios, posiblemente en consorcios bacterianos, para observar su comportamiento con otros microorganismos de la misma planta. Adicionalmente, la posible patogenicidad de este aislado se debe descartar.

Los resultados demuestran que las bacterias asociadas a plantas con síntomas de roya y en específico de áreas con daño evidente, redujeron significativamente la germinación de *H. vastatrix*. Esto puede ser posible porque al haber una alteración en las comunidades bacterianas, que naturalmente se encuentran en la planta, estas empiezan a competir por recursos y a producir compuestos antifúngicos, inhibiendo así el desarrollo de la enfermedad. Comúnmente los estudios se han enfocado en la búsqueda de agentes de control biológico en plantas sanas, sin embargo, recientemente se ha probado el éxito en el control biológico de enfermedades a partir de microorganismos asociados a plantas enfermas (Ellis, 2017; Guevara-Avenidaño *et al.*, 2018; Bejarano-Bolívar *et al.*, 2021). Esto último se refuerza con lo encontrado en este estudio, en el caso de las bacterias aisladas de la zona de muestreo en

Oaxaca y de áreas con daño evidente (BEOx), se obtuvo que el 27.45% tuvo efectividad a las 36 horas de estar en contacto con la roya, en el caso de las áreas sin daño evidente (BSOx) el 18.19% tuvo efectividad en el mismo tiempo. Por otro lado, las bacterias aisladas de la zona de muestreo en Veracruz y de áreas con daño evidente (BE), el 76.47% tuvieron efectividad a las 36 horas de estar en contacto con la roya, y del área sin daño evidente (BS) el 50% demostró ser efectivo en el mismo tiempo. Aunado a esto, los resultados confirman la hipótesis planteada al inicio del proyecto, la cual postulaba que “en las hojas de café existen bacterias, que al interactuar con el hongo biótrofo *Hemileia vastatrix* tienen la capacidad de antagonizar su crecimiento y desarrollo”, específicamente en la fase de germinación.

El manejo de la roya del café representa uno de los retos actuales más relevantes en la caficultura, las investigaciones actuales sugieren que es necesario implementar estrategias integradas en su tratamiento y prevención. En nuestro país se han desarrollado variedades de café resistentes a la enfermedad, la variedad Oro Azteca ha demostrado alta resistencia en estudios controlados (Couttolenc-Brenis *et al.*, 2020), sin embargo, su éxito en campo requiere combinar diferentes herramientas, entre ellas el uso de enemigos microbianos naturales de *H. vastatrix*.

7. Conclusión

En este estudio, se evaluó *in vitro* la actividad antagonista de bacterias asociadas a la filósfera de café (*Coffea arabica*) con síntomas de roya. De acuerdo con nuestros resultados, 35 aislados inhibieron de manera significativa la germinación de la roya a las 36 horas de estar en contacto con el fitopatógeno (8 aislados bacterianos provenientes de la zona de muestreo en San Miguel Reyes, Oaxaca y 27 aislados bacterianos en el municipio de Huatusco, Veracruz). Adicionalmente, se determinó que los aislados bacterianos BSOx1, BSOx18, BEOx191, BEOx81, BEOx209, BEOx58, BS12, BE1, BE29 y BE5 son prometedores como agentes de control biológico de la roya del café al inhibir en más del 50% la germinación de uredosporas en los diferentes tiempos de medición. Los aislados que fueron identificados y que tuvieron un efecto significativo se clasificaron en géneros bacterianos como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Frigobacterium* y *Xanthomonas*. Es necesario realizar un mayor número de estudios para analizar los mecanismos que utilizan estos antagonistas para controlar la enfermedad y cómo estos podrían interactuar cuando se aplican en consorcios, así como descartar su potencial patógeno. En especial, la caracterización más profunda de la actividad antifúngica de los aislados pertenecientes a los géneros *Curtobacterium*, *Frigobacterium* y *Xanthomonas* permitiría generar información valiosa, ya que, hasta el momento, no existen reportes de su actividad contra *H. vastatrix*. Adicionalmente, se demuestra que las bacterias asociadas a plantas con síntomas de roya y en específico de áreas con daño evidente, redujeron significativamente la germinación de *H. vastatrix*.

8. Recomendaciones

- Identificar molecularmente los aislados que tuvieron un efecto significativo en la inhibición de la germinación de uredosporas.
- Investigar cuáles son los mecanismos y compuestos antifúngicos de los géneros bacterianos ya reportados contra *H. vastatrix*.
- Identificar el mecanismo de acción de cada aislado bacteriano que tuvo efecto significativo en la inhibición de la germinación de uredosporas.
- Mediante microscopía confocal, evaluar si existe un daño en la estructura de las uredosporas expuestas a los aislados bacterianos.
- Realizar pruebas *in planta* para verificar la efectividad antifúngica de los aislados obtenidos en este estudio y descartar un posible efecto fitopatógeno.
- Evaluar los aislados en condiciones de campo en los dos diferentes manejos de cafetales, manejo convencional y manejo orgánico.

9. Referencias

- Ab Rahman, S. F. S., Singh, E., Pieterse, C. M., y Schenk, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*, 267, 102-111.
- Acuña, R.S., Zambolim, L., Venegas, V. H., y Chaves, G. M. (1992) Relação entre produção de grãos, o teor foliar de macro nutrientes e da severidade da ferrugem do cafeeiro. *Ceres*, 39(224): 365-377.
- Agrios, G. (2005). Plant diseases caused by fungi. En *Plant Pathology* 4ª Ed., Academic Press pp. 576-578.
- Aguilar R. (1990) La roya del café amenaza de nuevo, in: *La Nación*: San José. p. 2C.
- Anacafé. (2013). La Roya del Café es una enfermedad temible pero puede controlarse. Octubre 23, 2018, de Asociación nacional de café Sitio web: https://www.anacafe.org/glifos/index.php/Recomendaciones_Control_Roya
- Anacafé. (2018). Guía de Variedades de café. Agosto 31, 2020, de Asociación nacional de café Sitio web: <https://www.anacafe.org/uploads/file/9a4f9434577a433aad6c123d321e25f9/Gu%C3%ADa-de-variedades-Anacaf%C3%A9.pdf>
- Andrews, J. H. (1992). Biological control in the phyllosphere. En: *Annual Review of Phytopathology*. Vol. 30; p.603-635.
- Anzuetto, R. (1985). Variedades de café resistentes a la roya. *Revista Cafetalera (Guatemala)*(no. 257) p. 21, 23, 25, 27-29.
- AMECAFE. (2012). Plan Integral de Promoción del Café de México. Julio 13, 2019, de Asociación Mexicana del café Sitio web: <http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2016/04/pcm2012.pdf>
- Avelino, J., Cristancho, M., Georgiou, S., Imbach, P., Aguilar, L., Bornemann, G., Läderac, P., Anzuetto, F., Hruska, A. J., y Morales, C. (2015). The coffee rust crisis in Colombia and Central America (2008-2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security*, 7, 303-321.
- Avelino, J. y Rivas, G. (2013). La roya anaranjada del cafeto. Julio 13, 2019, de hal-01071036 Sitio web: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01071036/document>
- Báez-Vallejo, N., Camarena-Pozos, D. A., Monribot-Villanueva, J. L., Ramírez-Vázquez, M., Carrión-Villanueva, G. L., Guerrero-Analco, J. A., ... y Reverchon, F. (2020). Forest tree associated bacteria for potential biological control of *Fusarium solani* and of *Fusarium kuroshium*, causal agent of Fusarium dieback. *Microbiological Research*, 235, 126440.
- Barquero-Miranda, M. (2013). Recomendaciones para el combate de la roya del café. 3 ed. San José, Costa Rica, Icafé. P. 63.

- Becker-Raterink, S., Moraes, W., y Quijano-Rico, M. (1991). La roya del cafeto, conocimiento y control (No. 633.7342 B396r). GTZ, Eschborn (Alemania).
- Behlau, F., Canteros, B. I., Minsavage, G. V., Jones, J. B., y Graham, J. H. (2011). Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(12), 4089-4096.
- Bejarano-Bolívar, A. A., Lamelas, A., Aguirre von Wobeser, E., Sánchez-Rangel, D., Méndez-Bravo, A., Eskalen, A., y Reverchon, F. (2021). Shifts in the structure of rhizosphere bacterial communities of avocado after *Fusarium dieback*. *Rhizosphere*, 18, 100333.
- Belayneh, T., Druzhinina, I., Kubicek, C., y Atanasova, L. (2013). Novel endophytic *Trichoderma* spp. isolated from healthy *Coffea arabica* roots are capable of controlling coffee tracheomyces. *Diversity*, 5: 750-66.
- Beltrán, E. (2000) La cafecultura como estrategia de conservación y desarrollo en el Rincón de la Sierra Juárez. Aspectos socioeconómicos y organizativos. Grupo Mesófilo. Informe de circulación interna. 31
- Benassy, C. (1977). Lucha Biológica e Integrada en la Protección de plantas. *Bol. Ser. Plagas*, (3), 75-86.
- Benoit, D., Hoa, N. X., Ha, P. V., Stefano, C., Phap, T. Q., Giang, H. T., Tuyet, N. T., Pierre, M., Michel, L., y Duponnois, R. (2021). Identification and characterization of Vietnamese coffee bacterial endophytes displaying in vitro antifungal and nematicidal activities. *Microbiological Research*, 242, 126613.
- Beraldo, P. (2015). Interacción planta-patógeno e identificación de QTL asociados a la resistencia a *Podosphaera xanthii* y a caracteres agronómicos en una población RIL ('TGR-1551' x 'Bola de Oro') de *Cucumis melo*. Tesis DOctoral, Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): Publicaciones y Diculgación Científica, Universidad de Málaga.
- Berlanga, H. (2011). Los productores de café en México: problemática y ejercicio del presupuesto. Woodrow Wilson International Center for Scholars. Mexican Rural Development Research Reports, Washington DC, 14.
- Blakeman, J. P., y Fokkema, N. J. (1982). Potential for biological control of diseases on the phylloplane. En: *Annual Review of Phytopathology*. Vol. 20; p.167-192.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 29(8), 601-608.

- Bulgari, D., Minio, A., Casati, P., Quaglino, F., Delledonne, M., y Bianco, P. A. (2014). *Curtobacterium* sp. genome sequencing underlines plant growth promotion-related traits. *Genome announcements*, 2(4).
- Carcache, M. (2002). Microorganismos no patógenos predominantes en la filosfera y rizósfera del café y su relación sobre la incidencia de enfermedades foliares y población de nematodos fitopatógenos en los sistemas convencional y orgánico. CATIE, Turrialba (Costa Rica).
- Canet, G., Soto, C., Ocampo, P., Rivera, J., Navarro, A., Guatemala, G. y Villanueva, S. (2016). La situación y tendencias de la producción de café en América Latina y el Caribe. Septiembre 13, 2019, de IICA; CIATEJ Sitio web: https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5a43b896c22f1.pdf
- Carvalho, A., Guimarães-Mendes, A., Botelho, C., Baião-Oliveira, A., Costa-Rezende, J., y Machado-Rezende, R. (2012). Desempenho agrônômico de cultivares de café resistentes à ferrugem no Estado de Minas Gerais, Brasil. *Bragantia*, 71(4)
- Cho, K. M., Hong, S. Y., Lee, S. M., Kim, Y. H., Kahng, G. G., Lim, Y. P., ... y Yun, H. D. (2007). Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. *Microbial Ecology*, 54(2), 341-351.
- Cobb, N. A. (1993). Resistance/tolerance and related concepts/terminology in plant nematology. *Plant Disease*, 77(2), 111.
- Comité estatal de sanidad vegetal de Veracruz (CESVVER). (2015). Roya del café (*Hemileia vastatrix*). Junio 13, 2019, de CESAVER Veracruz Sitio web: <http://www.cesvver.org.mx/roya-del-cafe-hemileia-vastatrix/>
- Costa, M. J., Zambolim, L., y Rodrigues, F. A. (2007). Avaliação de produtos alternativos no controle da ferrugem do cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 32(2), 150-155.
- Couttolenc-Brenis, E., Carrión, G. L., Villain, L., Ortega-Escalona, F., Ramírez-Martínez, D., Mata-Rosas, M., y Méndez-Bravo, A. (2020). Prehaustorial local resistance to coffee leaf rust in a Mexican cultivar involves expression of salicylic acid-responsive genes. *PeerJ*, 8, e8345.
- Daglia, M., Papetti, A., Gregotti, C., Berte, F., y Gazzani, G. (2000). In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 48:1449–54.
- Davidson, S., (2004). Shade coffee agro-ecosystems in Mexico: a synopsis of the environmental services and socio-economic considerations. *Journal of Sustainable Forestry*, 21(1), pp.81-95.
- Deepak, K., Hanumantha, B. T., y Sreenath, H. L. (2012). Viability of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) urediniospores stored at different temperatures. *Journal of Biotechnology and Biomaterials*, 2(143), 2.

- Durán, V., de la Cruz Malavassi, E., Ledezma, G., y Muñoz, F. (2013). Uso de plaguicidas en cultivos agrícolas como herramienta para el monitoreo de peligros en salud. *Uniciencia*, 27(1), 351-376.
- Elad, Y., Richard, R., Bélanger, R. y Jürgen, K. (2002) Biological control of diseases in the phyllosphere. En: I Curso – Taller Internacional (2ª ed): Control biológico, componente fundamental del manejo integrado de plagas en una agricultura sostenible. (Bogotá, Colombia). Memorias. Bogotá: Corpoica. 66-78.
- Eenink, A. (1977). Genetics of host-parasite relationship and the stability of resistance. Proceedings of a Symposium. Induced mutant against plant diseases. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, 47-57.
- Ellis, J.G., (2017). Can plant microbiome studies lead to effective biocontrol of plant diseases? *Mol. Plant Microbe Interact.* 30, 190–193.
- Escudero-Osorio, Y. (2018). Evaluación de la actividad antifúngica de aislados bacterianos provenientes de la rizósfera y de la filósfera de árboles del bosque mesófilo de montaña. Tesis para optar por el título de ingeniero agrónomo, INECOL – Universidad Veracruzana. Xalapa-Enríquez, Veracruz.
- Farré-Armengol, G., Filella, I., Llusia, J., y Peñuelas, J. (2016). Bidirectional Interaction between Phyllospheric Microbiotas and Plant Volatile Emissions. *Trends in Plant Science*, 21(10), 854-860.
- Figueroa-Hernández, E., Pérez-Soto, F., y Godínez Montoya, L. (2016). El mercado de café en México. *Handbook TI*, 33.
- Francisco-Francisco, N., Gallegos-Morales, G., Ochoa-Fuentes, Y. M., Hernández-Castillo, F. D., Benavides-Mendoza, A., y Castillo-Reyes, F. (2013). Aspectos fundamentales del tizón común bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): Características, patogenicidad y control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(2), 147-160.
- Galicia-Sosa, A., Díaz, L., Arrieta, J., y Landa-Habana, L. (2017). Desplazamiento De La Práctica De Diluciones Entre La Comunidad De Ingenieros Bioquímicos Y La Escuela. Noviembre 9, 2020, de Acta latinoamericana de matemática educativa Sitio web: <http://funes.uniandes.edu.co/12307/1/Galicia2017Desplazamiento.pdf>
- García, K. (2008). Programa de desarrollo de proveedores para la comercialización del café bajo el sistema de comercio justo: el caso de San Mateo de Piñas y Santa María Coixtepec, Oaxaca. Tesis de Licenciatura. UTM. Huajuapán de León, Oaxaca, 93-100.
- Gichuru, E., Ithiru, J., Silva, M., Pereira, A., y Varzea, V. (2012). Additional physiological races of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) identified in Kenya. *Tropical Plant Pathology*, 37(6), 424-427.

- Gómez-De La Cruz, I., Pérez-Portilla, E., Escamilla-Prado, E., Martínez-Bolaños, M., Carrión-Villarnovo, G. L. L., y Hernández-Leal, T. I. (2018). Selección in vitro de micoparásitos con potencial de control biológico sobre roya del café (*Hemileia vastatrix*). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1), 172-183.
- Gómez, M., y Rodríguez, A. (2012). Mecanismos de defensa y respuestas de las plantas en la interacción micorrícica: una revisión. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 271-284.
- González, G., Caballero, S., Contreras, G., González, F., y Mejia, L. (2013). Caracterización Morfológica y Molecular de Cepas Nativas de Hongos Entomopatógenos en Memorias Del Seminario Científico Internacional Panamá. Memoria 58 Reunión Anual de PCCMCA (Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos y Animales). 139.
- González, R., y Ramírez, M. (2013). Manual técnico para el manejo preventivo de la roya del café. Dirección General de Sanidad Vegetal. SENASICA. 13-15.
- Guedez, C., Castillo, C., Cañizales, L., y Olivar, R. (2008). Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *Academia*, 7(13), 50-74.
- Guevara-Avenidaño, E., Bravo-Castillo, K. R., Monribot-Villanueva, J. L., Kiel-Martínez, A. L., Ramírez-Vázquez, M., Guerrero-Analco, J. A., Reverchon, F. (2020). Diffusible and volatile organic compounds produced by avocado rhizobacteria exhibit antifungal effects against *Fusarium kuroshium*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51, 861-873.
- Guevara-Avenidaño, E., Carrillo, J. D., Ndinga-Muniania, C., Moreno, K., Méndez-Bravo, A., Guerrero-Analco, J. A., Eskalen, A., y Reverchon, F. (2018). Antifungal activity of avocado rhizobacteria against *Fusarium euwallaceae* and *Graphium* spp., associated with *Euwallacea* spp. nr. *forficatus*, and *Phytophthora cinnamomi*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(4), 563-572.
- Haddad, F., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S., y Teixeira, H. (2009). Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. *Biological Control*, 49(2), 114-119.
- Haddad, F., Saraiva, R. M., Mizubuti, E. S., Romeiro, R. S., y Maffia, L. A. (2013). Antifungal compounds as a mechanism to control *Hemileia vastatrix* by antagonistic bacteria. *Tropical Plant Pathology*, 38(5), 398-405.
- Heredia, B. (2013). La Roya del Café. Instituto del Café de Costa Rica; Centro de Investigaciones en Café (CICAFE).
- Hernández-Martínez, G., Manson, R., y Contreras-Hernández, A. (2009). Quantitative classification of coffee agroecosystems spanning a range of production intensities in central Veracruz, Mexico. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 134, 89-98.

- Hernández-Martínez, G. y Velázquez-Premio T. (2016). Análisis integral sobre la roya del café y su control. *Revista internacional del Desarrollo Regional Sustentable*. Vol. 1 (1): 92-99.
- Hernández-Solabac, J. A. M., Nava-Tablada, M. E., Díaz-Cárdenas, S., Pérez-Portilla, E., y Escamilla-Prado, E. (2011). Migración internacional y manejo tecnológico del café en dos comunidades del centro de Veracruz. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(3), 807-818.
- Hutcheson, S. W. (1998). Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology*, 36(1), 59-90.
- ICAFE. (2011). Condiciones agroecológicas de café. En *Guía Técnica para el cultivo del café* (3-7). Costa Rica: Heredia Costa Rica.
- INEGI. (1997). El café en el estado de Oaxaca. Marzo 30, 2020, de INEGI Sitio web: http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/historicos/380/702825118570/702825118570_2.pdf
- Ignacio-Cárdenas, S. (2007). Caracterización morfológica y agronómica de la colección núcleo de café (*Coffea arabica* L.) del CATIE (No. Thesis I24c). CATIE, Turrialba (Costa Rica).
- Jaramillo-Robledo, A. (1976). Condiciones meteorológicas en un cafetal bajo sombrío en Colombia. *Cenicafé (CO)* 27(4): 180-184
- Ji, S. H., Paul, N. C., Deng, J. X., Kim, Y. S., Yun, B. S., y Yu, S. H. (2013). Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. *Mycobiology*, 41(4), 234-242.
- Jiménez-Ávila, E. y Gómez-Pompa, A. (1982). Estudios Ecológicos en el Agrosistema Cafetalero, Instituto Nacional de Investigación sobre los Recursos Bioticos y Compañía. Continental, México, D.F. 127.
- Kämpfer, P. (2015). *Frigoribacterium*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-8.
- Knief, C., Delmotte, N., Chaffron, S., Stark, M., Innerebner, G., Wassmann, R., ... y Vorholt, J. (2012). Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *The ISME Journal*, 6(7), 1378-1390.
- Kobayashi, D. Y., Guglielmoni, M., y Clarke, B. B. (1995). Isolation of the chitinolytic bacteria *Xanthomonas maltophilia* and *Serratia marcescens* as biological control agents for summer patch disease of turfgrass. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(11), 1479-1487.
- Laforest-Lapointe, I., Paquette, A., Messier, C., y Kembel, S. (2017). Leaf bacterial diversity mediates plant diversity and ecosystem function relationships. *Nature*, 546(7656), 145-147.

- Lindow, S., y Brandl, M. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 1875-1883.
- Ligon, J. M., Hill, D. S., Hammer, P. E., Torkewitz, N. R., Hofmann, D., Kempf, H. J., y Pée, K. H. V. (2000). Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 56(8), 688-695.
- Martínez, E. P., y Osorio, J. A. (2007). Estudios preliminares para la producción de un biosurfactante bacteriano activo contra *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 8(2), 5-16.
- Martins, G., Lauga, B., Miot-Sertier, C., Mercier, A., Lonvaud, A., Soulas, M. L., ... y Masneuf-Pomarède, I. (2013). Characterization of epiphytic bacterial communities from grapes, leaves, bark and soil of grapevine plants grown, and their relations. *Plos One*, 8(8), e73013.
- McCook S. (2006). Global rust belt: *Hemileia vastatrix* and the ecological integration of world coffee production since 1850. *Journal of Global History* 1(2): 177.
- McCook S. (2009). La roya del café en Costa Rica: epidemias, innovación y medio ambiente, 1950-1995. *Revista Historia* (59-60): 99-117.
- Mejía, L. (2015). Microbiomas y Control Biológico como alternativa de manejo de la Roya Anaranjada del Cafeto. En memorias del seminario científico internacional: Manejo agroecológico de la roya del café. 47 -57. PANAMÁ: FAO.
- Mendoza, E., y Teresa, M. (2009). Café y cultura productiva en una región de Veracruz. *Nueva antropología*, 22(70), 33-56.
- Méndez-Bravo, A., Cortazar-Murillo, E. M., Guevara-Avenidaño, E., Ceballos-Luna, O., Rodríguez-Haas, B., Kiel-Martínez, A. L., Hernández-Cristóbal, O., Guerrero-Analco, J. A., y Reverchon, F. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria associated with avocado display antagonistic activity against *Phytophthora cinnamomi* through volatile emissions. *PLoS ONE*, 13(3), e0194665
- Moguel, P., y Toledo, V. (1996). El café en México, ecología, cultura indígena y sustentabilidad. *Ciencias*, núm. 43, julio-septiembre, 40-51.
- Moguel, P., y Toledo, V. (1999). Café, luchas indígenas y sostenibilidad; el caso de México. *Ecología Política*, (18), 40-51
- Moguel, P., y Toledo, V. (2004). Conservar produciendo: biodiversidad, café orgánico y jardines productivos. *Biodiversidad* 55, 2-7.
- Molina, N., Polverino, D., Minvielle, M., Apezteguía, M., Aguilar, M., y Basualdo, J. (2006). Comparación de métodos de lisis y extracción de ADN de trofozoítos de *Giardia lamblia*. *Parasitología Latinoamericana*, 61(3-4), 133-137.

- Montesinos, E., Bonaterra, A., Badosa, E., Frances, J., Alemany, J., Llorente, I., y Moragrega, C. (2002). Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *International Microbiology*, 5(4), 169-175.
- Montoya, D, y Toledo, V. (2020). Historia de la caficultura en Chiapas (1880-2010). *Apuntes de una evolución social y ambiental. Sociedad y Ambiente*, 23, 1-25.
- Moreno-Calles, A., Casas, A., Toledo, V., y Vallejo, M. (2016). Etnoagroforestería en México, los proyectos y la idea del libro. Moreno-Calles, AI, Casas, A., Toledo, V., Vallejo, M. (Coordinadores). *Etnoagroforestería en México. Universidad Nacional Autónoma de México*. 10-24.
- Mulet, M., Lalucat, J., y García-Valdés, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1513-1530.
- Ordeñana, K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Revista Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica*, 63, 22-32.
- Parasuraman, P., Pattnaik, S., y Busi, S. (2019). Phyllosphere Microbiome: Functional Importance in Sustainable Agriculture. In: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier. 135-148.
- Pendergrast, M., y Mateo, E. (2002). El Café: historia de la semilla que cambio el mundo.. *Revista Colombiana de Antropología*, 38, 340-343.
- Pérez, M., y Mota, M. (2000). Morfología y estructura bacteriana. *Revista en internet*, 3(2), 23-42.
- Pineda-López, M., Ortiz-Ceballos, G., y Sánchez-Velásquez, L. R. (2005). Los cafetales y su papel en la captura de carbono: un servicio ambiental aún no valorado en Veracruz. *Madera y Bosques*, 11(2), 3-14.
- Posada, F., AIME, C., Peterson, S., Rehner, S., y Vega, F. (2007) Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Mycological Research*, 111, 748-757.
- Promecafé e IICA (2013). La crisis del café en Mesoamérica: causas y repuestas apropiadas. Mayo 15, 2019. Sitio web: <http://biblioteca.catie.ac.cr/royadelcafé/descargas/ROYA-MA.pdf>
- Pulgarín, J. (2007). Crecimiento y desarrollo de la planta de café. *Sistemas de producción de café en Colombia. CENICAFE, Chinchiná, Colombia*, 21-60.
- Rastogi, G., Coaker, G. L., y Leveau, J. H. (2013). New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches. *FEMS Microbiology Letters*, 348(1), 1-10.

- Raupach, G. S., y Kloepper, J. W. (1998). Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*, 88(11), 1158-1164.
- Reverchon, F., Escudero-Osorio, Y. S., Morteo-Zavaleta, J., Guevara-Avenidaño, E., y Ramírez-Vázquez, M. (2020). Inhibición de *Fusarium solani* por bacterias de la filósfera y rizósfera de árboles del bosque mesófilo de montaña. *Biotecnología y Sustentabilidad*, 5(1), 3-18.
- Reverchon, F., García-Quiroz, W., Guevara-Avenidaño, E., Solís-García, I. A., Ferrera-Rodríguez, O., y Lorea-Hernández, F. (2019). Antifungal potential of Lauraceae rhizobacteria from a tropical montane cloud forest against *Fusarium* spp. *Brazilian Journal of Microbiology* 50, 583-592.
- Robles-Hernández, L., Ojeda-Barrios, D. L., González-Franco, A. C., Hernández-Huerta, J., Salas-Salazar, N. A., y Hernández-Rodríguez, O. A. (2017). Susceptibilidad de aislados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* a *Streptomyces* y extractos bioactivos de *Ganoderma*. *Acta universitaria*, 27(6), 30-39.
- Rodríguez, A., Guillén, C., Uva, V., Segura, R., Laprade, S., y Sandoval, J. (2010). Aspectos a considerar sobre el control biológico. Proyecto demostrativo con implementación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en el cultivo de banano.
- Roldán, E., y Yángüez, L. (2016). Evaluación del efecto hiperparásito de tres concentraciones de *Lecanicillium lecanii* sobre la roya del café (*Hemileia vastatrix*). Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana.
- Ruelas-Monjardín, L., Nava-Tablada, M., Cervantes, J., y Barradas, V. (2014). Importancia ambiental de los agroecosistemas cafetaleros bajo sombra en la zona central montañosa del estado de Veracruz, México. *Madera y bosques*, 20(3), 27-40.
- Saddler, G. S., & Bradbury, J. F. (2005). *Xanthomonadales* ord. nov. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (pp. 63-122). Springer, Boston, MA.
- Salas, A. (2010). Aslamiento e identificación de endófitos y epífitos en hojas de café colectadas en dos zonas de costa rica y su posible empleo como biocontroladores de *mycena citricolor*. Tesis para optar por el título de ingeniero en biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 113
- Sánchez, J. (2015). Plan de manejo de café en el ambito del VRAEM. Agosto 22, 2019, de Ministerio de Agricultura y Riego, Perú Sitio web: http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/tematicas/c-educacion_extension/c30/maejo_cafe_vraem.pdf

- Sánchez, M., y Nava-Tablada, M. (2017). Cafecultura en Veracruz: entre crisis y alternativas. En Veracruz, un análisis para el desarrollo (93-122). Veracruz: El Colegio de Veracruz.
- Sánchez de Prager, M., Mosquera, M., Sánchez, D., y Sarria, P. (2009). Indicadores de sostenibilidad con enfoque agroecológico en agroecosistemas tropicales. Vertientes del Pensamiento Agroecológico: Fundamentos y Aplicaciones. Altieri M.(Ed.). SOCLA, Medellín, Colombia, 321-344.
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M. D. C., y Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology*, 22(8), 855-872.
- Sarandón, S., y Sarandón, C. (1993). Un enfoque ecológico para una agricultura sustentable. Bases para una política ambiental de la República Argentina. Buenos Aires: Honorable Cámara de Diputados de la provincia de Buenos Aires.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2016). Planeación Agrícola Nacional 2017-2030; Café Mexicano. Septiembre 12, 2019, de SAGARPA Sitio web: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256426/B_sico-Caf_.pdf
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). (2016). Roya del Cafeto, *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome, ficha Técnica No. 40. Agosto 26, 2019, de SAGARPA, 28 p. Sitio web: <http://www.cesaveson.com/files/docs/campanas/vigilancia/fichas2016/ROYAcafeto.pdf>
- Servicio Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (SINAVEF). (2013, act., 2017). Ficha técnica roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br). Montecillos, México, SINAVEF. p. 28. (Technical Bulletin)
- Shiomi, H. F., Silva, H. S. A., Melo, I. S. D., Nunes, F. V., y Bettiol, W. (2006). Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. *Scientia Agricola*, 63(1), p. 32-39.
- Silva, H. S., Tozzi, J. P., Terrasan, C. R., y Bettiol, W. (2012). Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. *Biological Control*, 63(1), 62-67
- Sivakumar, N., Sathishkumar, R., Selvakumar, G., Shyamkumar, R., y Arjunekumar, K. (2020). Phyllospheric Microbiomes: Diversity, Ecological Significance, and Biotechnological Applications. In *Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture*. Springer, Cham.113-172
- Sotomayor-Herrera, I., y Duicela-Guambi, L. (1995). Control Integrado de las principales enfermedades foliares del cafeto en el Ecuador. Quevedo, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Pichilingue, Programa Nacional de Cacao y Café.

- Spurr, H. W. (1981). Experiments on foliar disease control using bacterial antagonists. In: Blakeman, J. P. Microbial ecology of the phylloplane. London: Academia Press. 369-381.
- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M., y Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 42(3), 131-138.
- Thorel, M. F., Krichevsky, M., y Lévy-Frébault, V. V. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 40(3), 254-260.
- Tronconi, M. (2003). Principales enfermedades del cultivo del cafeto. Junio 13, 2019. Sitio web: <https://www.ihcafe.hn/?mdocs-file=4247>
- Turner, T., James, E., y Poole, P. (2013). The plant microbiome. Genome biology, 14(6), 1-10.
- Vacher, C., Hampe, A., Porté, A. J., Sauer, U., Compant, S., y Morris, C. (2016). The phyllosphere: microbial jungle at the plant–climate interface. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 47, 1-24.
- Valdelamar, L., Serrato, A., y Cerritos, F. (2014). Secuenciación de fragmentos de ADN. En Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos (pp. 237-240). SEMARNAT, INECC; UAM-I, 256.
- Van-Driesche, R., Hoddle, M., y Center, T. (2007). Liberación aumentativa de enemigos naturales en cultivos exteriores. Control de Plagas y Malezas por Enemigos Naturales. Cap, 26, 495-516.
- Vega, F., Pava-Ripoll, M., Posada, F., y J. (2005) Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. Journal of Basic Microbiology, 45(5), 371-380.
- Vega, F., Posada, F., Aime, C., Peterson, S., y Rehner, S. (2008). Fungal endophytes in green coffee seeds. Mycosystema, 27(1), 75-84.
- Verhagen, B. W., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H. S., Van Loon, L. C., y Pieterse, C. M. (2004). The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 17(8), 895-908.
- Vidal-Martínez, N., Argumedo-Delira, R., González-Mendoza, D., Sánchez-Pale, J., Sánchez-Viveros, G., y Contreras, R. (2019). Caracterización Bioquímica De Bacterias Aisladas De La Filósfera De *Coffea Arabica*. Compendio Científico en Ciencias Agrícolas y Biotecnología, 101-104.

- Virginio, E. y Astroga, C. (2015). Prevención y control de la roya del café, manual de buenas prácticas para técnicos y facilitadores. 1ª ed. Turrialba, C.R: CATIE. 96 p.
- Waller, J. M., Bigger, M., y Hillocks, R. J. (2007). Coffee pests, diseases and their management. CABI Publishing. CABI, Wallingford, UK.
- Yamada, K., y Komagata, K. (1972). Taxonomic studies on coryneform bacteria. The Journal of General and Applied Microbiology, 18(6), 417-431.
- Yirga, M. (2020). Potential Effects, Biology and Management Options of Coffee Leaf Rust (*Hemileia Vastatrix*): A Review. International Journal of Forestry and Horticulture (IJFH), 6, 19-31
- Zambolim, L. (2016). Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. Tropical Plant Pathology, 41(1), 1-8.

10. Anexos

Anexo 1. Índice de inhibición \pm el error estándar de morfotipos bacterianos obtenidos de áreas foliares sin daño evidente de roya, de la zona de muestreo en la comunidad de San Miguel Reyes, Putla Villa de Guerrero, Oaxaca. Los valores resaltados en las siguientes tablas corresponden al índice de inhibición de las uredosporas de *H. vastatrix*. Además, corresponde a los resultados que tuvieron una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en prueba de ANOVA y prueba *a posteriori* de Dunnett.

Morfotipo	Índice de Inhibición 6 horas	Índice de Inhibición 12 horas	Índice de Inhibición 24 horas	Índice de Inhibición 36 horas	Error Estándar 6 horas	Error Estándar 12 horas	Error Estándar 24 horas	Error Estándar 36 horas
BSOx9	-7.26%	<u>31.69%</u>	<u>37.06%</u>	-19.99%	± 0.011	± 0.002	± 0.003	± 0.009
BSOx3	<u>13.18%</u>	<u>13.90%</u>	<u>24.54%</u>	-55.46%	± 0.070	± 0.011	± 0.014	± 0.031
BSOx10	<u>17.77%</u>	<u>27.32%</u>	<u>32.58%</u>	-25.53%	± 0.023	± 0.013	± 0.002	± 0.179
BSOx26	<u>34.16%</u>	<u>42.03%</u>	<u>20.64%</u>	-23.79%	± 0.022	± 0.004	± 0.007	± 0.027
BSOx19	<u>50.70%</u>	<u>27.38%</u>	-31.54%	-85.36%	± 0.014	± 0.009	± 0.011	± 0.012
BSOx2	<u>57.19%</u>	<u>40.53%</u>	<u>36.42%</u>	-23.56%	± 0.021	± 0.020	± 0.013	± 0.015
BSOx27	<u>61.63%</u>	<u>20.80%</u>	<u>21.78%</u>	-0.14%	± 0.048	± 0.037	± 0.010	± 0.010
BSOx24	<u>67.49%</u>	3.34%	-20.55%	-28.84%	± 0.042	± 0.021	± 0.029	± 0.053
BSOx1	<u>80.55%</u>	<u>85.66%</u>	<u>90.75%</u>	<u>87.28%</u>	± 0.032	± 0.008	± 0.036	± 0.018
BSOx18	<u>85.53%</u>	<u>84.57%</u>	<u>84.02%</u>	<u>65.67%</u>	± 0.029	± 0.019	± 0.024	± 0.061
BSOx25	<u>87.05%</u>	<u>35.69%</u>	<u>23.77%</u>	-28.29%	± 0.023	± 0.042	± 0.026	± 0.015

Anexo 2. Índice de inhibición \pm el error estándar de morfotipos bacterianos obtenidos de áreas foliares con daño evidente de roya, de la zona de muestreo en la comunidad de San Miguel Reyes, Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.

Morfotipo	Índice de Inhibición 6 horas	Índice de Inhibición 12 horas	Índice de Inhibición 24 horas	Índice de Inhibición 36 horas	Error Estándar 6 horas	Error Estándar 12 horas	Error Estándar 24 horas	Error Estándar 36 horas
BEOx122	-326.30%	-190.70%	-106.17%	-134.97%	± 0.0292	± 0.0043	± 0.0125	± 0.0155
BEOx196	-279.85%	-92.41%	-81.98%	-96.24%	± 0.0249	± 0.0146	± 0.0121	± 0.0179
BEOx186	-240.33%	-146.63%	-92.66%	-95.81%	± 0.0122	± 0.0753	± 0.0247	± 0.0158
BEOx227	-146.50%	-121.22%	-81.34%	-4.44%	± 0.0128	± 0.0128	± 0.0219	± 0.0211
BEOx2	-139.09%	-68.50%	-26.49%	-84.87%	± 0.0336	± 0.0069	± 0.0134	± 0.0254
BEOx239	-116.03%	-74.56%	-30.28%	-101.32%	± 0.0236	± 0.0501	± 0.0146	± 0.0083

BEOx153	-101.74%	-59.84%	-27.49%	-66.89%	± 0.0112	± 0.0137	± 0.0076	± 0.0120
BEOx146	-91.47%	-47.80%	-15.09%	-52.58%	± 0.0143	± 0.0077	± 0.0124	± 0.0313
BEOx14	-73.56%	-19.55%	-30.54%	-81.78%	± 0.0195	± 0.0046	± 0.0235	± 0.0247
BEOx164	-63.42%	-73.09%	-46.44%	-72.77%	± 0.0821	± 0.0508	± 0.0249	± 0.0180
BEOx100	-62.70%	-60.31%	-24.41%	-44.76%	± 0.0193	± 0.0156	± 0.0024	± 0.0067
BEOx263	-58.53%	-39.15%	-2.91%	4.58%	± 0.0158	± 0.0162	± 0.0270	± 0.0233
BEOx201	-55.70%	-32.76%	-15.89%	-6.29%	± 0.0351	± 0.0258	± 0.0155	± 0.0405
BEOx261	-53.92%	-80.19%	-71.64%	-29.50%	± 0.0545	± 0.0230	± 0.0060	± 0.0322
BEOx124	-40.38%	-27.49%	-18.68%	-56.32%	± 0.0554	± 0.0340	± 0.0201	± 0.0283
BEOx79	-39.15%	-15.05%	-21.36%	-84.16%	± 0.0074	± 0.0194	± 0.0138	± 0.0117
BEOx277	-35.10%	-12.13%	-9.25%	-37.25%	± 0.0466	± 0.0498	± 0.0235	± 0.0255
BEOx126	-29.87%	-6.72%	-4.28%	-28.24%	± 0.0351	± 0.0100	± 0.0127	± 0.0229
BEOx242	-23.47%	-28.08%	-4.64%	-41.11%	± 0.0302	± 0.0281	± 0.0186	± 0.0191
BEOx102	-21.68%	-21.60%	0.41%	-4.45%	± 0.0246	± 0.0186	± 0.0120	± 0.0044
BEOx193	-21.61%	5.47%	-2.47%	-9.81%	± 0.0481	± 0.0204	± 0.0275	± 0.0261
BEOx75	-15.43%	-2.73%	-23.25%	-3.88%	± 0.0209	± 0.0210	± 0.0103	± 0.0251
BEOx6	-13.70%	-11.72%	-3.85%	-12.37%	± 0.0423	± 0.0243	± 0.0164	± 0.0468
BEOx178	-5.33%	3.58%	-6.14%	-51.61%	± 0.0624	± 0.0189	± 0.0040	± 0.0349
BEOx156	-3.53%	7.50%	-2.34%	-36.55%	± 0.0280	± 0.0208	± 0.0078	± 0.0258
BEOx119	0.48%	8.22%	7.91%	-23.62%	± 0.0115	± 0.0131	± 0.0122	± 0.0247
BEOx94	0.99%	-2.49%	1.10%	9.88%	± 0.0325	± 0.0622	± 0.0034	± 0.0709
BEOx219	3.46%	-10.43%	-4.71%	-34.23%	± 0.0449	± 0.0490	± 0.0234	± 0.0162
BEOx103	4.26%	10.12%	4.30%	-9.70%	± 0.0307	± 0.0140	± 0.0206	± 0.0263
BEOx84	5.25%	3.88%	-9.17%	-27.68%	± 0.0332	± 0.0075	± 0.0228	± 0.0199
BEOx32	18.18%	3.43%	4.92%	-23.97%	± 0.0103	± 0.0180	± 0.0127	± 0.0749
BEOx121	20.24%	34.83%	27.63%	4.84%	± 0.0476	± 0.0448	± 0.0226	± 0.0377
BEOx248	20.69%	38.99%	44.39%	30.17%	± 0.0343	± 0.0684	± 0.0106	± 0.0659
BEOx142	24.10%	-29.01%	-24.38%	-57.74%	± 0.0074	± 0.0180	± 0.0037	± 0.0177
BEOx203	31.69%	36.90%	44.46%	27.52%	± 0.0511	± 0.1045	± 0.0159	± 0.0499
BEOx105	31.93%	26.71%	3.89%	-6.86%	± 0.0341	± 0.0128	± 0.0195	± 0.0133
BEOx91	35.03%	21.64%	33.39%	8.17%	± 0.0442	± 0.0270	± 0.0318	± 0.0378
BEOx5	37.33%	-21.72%	-76.60%	-79.89%	± 0.0323	± 0.0160	± 0.0506	± 0.0415
BEOx147	38.03%	5.09%	9.47%	-27.98%	± 0.1225	± 0.0288	± 0.0174	± 0.0209
BEOx134	45.22%	45.06%	26.61%	14.46%	± 0.0800	± 0.0215	± 0.0268	± 0.0412
BEOx259	53.24%	25.60%	19.57%	-4.43%	± 0.0371	± 0.0306	± 0.0187	± 0.0388
BEOx264	54.22%	62.41%	66.85%	53.03%	± 0.0361	± 0.0101	± 0.0188	± 0.0327
BEOx191	61.97%	76.44%	77.43%	76.78%	± 0.0134	± 0.0575	± 0.0249	± 0.0340
BEOx24	66.49%	50.52%	39.07%	16.94%	± 0.0145	± 0.0163	± 0.0134	± 0.0264
BEOx33	67.68%	40.58%	41.83%	26.05%	± 0.0619	± 0.0117	± 0.0116	± 0.0272
BEOx131	75.21%	55.31%	43.67%	37.75%	± 0.1379	± 0.0111	± 0.0193	± 0.0207
BEOx209	79.13%	86.92%	73.03%	71.98%	± 0.0238	± 0.0714	± 0.0155	± 0.0372
BEOx81	89.95%	80.46%	72.71%	75.72%	± 0.1084	± 0.0265	± 0.0263	± 0.0498
BEOx4	93.92%	46.05%	39.42%	22.38%	± 0.0105	± 0.0070	± 0.0076	± 0.0209
BEOx181	97.82%	65.00%	48.73%	35.72%	± 0.0270	± 0.0249	± 0.0090	± 0.0516
BEOx58	98.88%	88.22%	94.59%	94.24%	± 0.0107	± 0.0092	± 0.0132	± 0.0064

Anexo 3. Índice de inhibición \pm el error estándar de morfotipos bacterianos obtenidos de áreas foliares sin daño evidente de roya, de la zona de muestreo en Huatusco, Veracruz.

Morfotipo	Índice de Inhibición 6 horas	Índice de Inhibición 12 horas	Índice de Inhibición 24 horas	Índice de Inhibición 36 horas	Error Estándar 6 horas	Error Estándar 12 horas	Error Estándar 24 horas	Error Estándar 36 horas
BS13	-269.52%	-96.33%	-52.60%	-95.24%	± 0.019	± 0.017	± 0.022	± 0.008
BS19	-231.36%	-223.01%	-139.92%	-117.10%	± 0.012	± 0.006	± 0.009	± 0.015
BS25	-191.45%	-174.94%	-134.90%	-98.94%	± 0.019	± 0.008	± 0.007	± 0.012
BS20	-180.64%	-218.93%	-142.64%	-116.10%	± 0.023	± 0.008	± 0.017	± 0.012
BS5	-21.77%	-3.68%	-1.91%	-37.68%	± 0.000	± 0.017	± 0.006	± 0.006
BS4	<u>23.59%</u>	<u>22.62%</u>	<u>13.60%</u>	-10.75%	± 0.137	± 0.021	± 0.016	± 0.030
BS21	<u>35.59%</u>	<u>36.19%</u>	<u>16.11%</u>	<u>16.32%</u>	± 0.041	± 0.036	± 0.016	± 0.022
BS17	<u>44.06%</u>	<u>31.57%</u>	<u>41.56%</u>	<u>40.90%</u>	± 0.019	± 0.087	± 0.060	± 0.043
BS3	<u>47.32%</u>	<u>39.89%</u>	<u>36.41%</u>	<u>29.83%</u>	± 0.132	± 0.138	± 0.018	± 0.018
BS31	<u>47.84%</u>	<u>31.64%</u>	<u>21.62%</u>	<u>5.94%</u>	± 0.019	± 0.010	± 0.011	± 0.024
BS9	<u>72.81%</u>	<u>59.48%</u>	<u>47.15%</u>	<u>37.88%</u>	± 0.109	± 0.080	± 0.074	± 0.058
BS12	<u>100.00%</u>	<u>89.66%</u>	<u>87.57%</u>	<u>89.71%</u>	± 0.033	± 0.006	± 0.015	± 0.009

Anexo 4. Índice de inhibición \pm el error estándar de morfotipos bacterianos obtenidos de áreas foliares sin daño evidente de roya, de la zona de muestreo en Huatusco, Veracruz.

Morfotipo	Índice de Inhibición 6 horas	Índice de Inhibición 12 horas	Índice de Inhibición 24 horas	Índice de Inhibición 36 horas	Error Estándar 6 horas	Error Estándar 12 horas	Error Estándar 24 horas	Error Estándar 36 horas
BE25	-37%	-10%	<u>22%</u>	<u>26%</u>	± 0.052	± 0.027	± 0.015	± 0.017
BE18	-27%	-21%	-19%	-82%	± 0.031	± 0.011	± 0.011	± 0.009

BE4	-4%	0%	-3%	-9%	± 0.016	± 0.009	± 0.013	± 0.011
BE11	-2%	<u>26%</u>	<u>43%</u>	<u>17%</u>	± 0.051	± 0.024	± 0.017	± 0.057
BE3	1%	0%	-6%	-19%	± 0.023	± 0.009	± 0.006	± 0.026
BE9	8%	<u>41%</u>	<u>64%</u>	<u>69%</u>	± 0.033	± 0.019	± 0.010	± 0.026
BE16	<u>9%</u>	<u>9%</u>	4%	-31%	± 0.016	± 0.021	± 0.020	± 0.019
BE13	<u>23%</u>	<u>30%</u>	<u>40%</u>	<u>17%</u>	± 0.077	± 0.027	± 0.012	± 0.029
BE22	<u>45%</u>	<u>57%</u>	<u>73%</u>	<u>47%</u>	± 0.024	± 0.017	± 0.009	± 0.017
BE23	<u>54%</u>	<u>60%</u>	<u>46%</u>	<u>60%</u>	± 0.016	± 0.030	± 0.023	± 0.027
BE14	<u>55%</u>	<u>56%</u>	<u>43%</u>	<u>26%</u>	± 0.014	± 0.022	± 0.013	± 0.008
BE2	<u>56%</u>	<u>58%</u>	<u>41%</u>	<u>22%</u>	± 0.015	± 0.011	± 0.012	± 0.021
BE31	<u>62%</u>	<u>29%</u>	<u>6%</u>	<u>12%</u>	± 0.037	± 0.019	± 0.016	± 0.013
BE15	<u>65%</u>	<u>32%</u>	<u>22%</u>	<u>13%</u>	± 0.018	± 0.013	± 0.006	± 0.011
BE5	<u>73%</u>	<u>61%</u>	<u>54%</u>	<u>75%</u>	± 0.063	± 0.018	± 0.034	± 0.032
BE29	<u>81%</u>	<u>83%</u>	<u>94%</u>	<u>93%</u>	± 0.018	± 0.012	± 0.004	± 0.007
BE1	<u>92%</u>	<u>100%</u>	<u>87%</u>	<u>88%</u>	± 0.081	± 0.000	± 0.022	± 0.058