



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA- ALIMENTOS



**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE *Metarhizium anisopliae* COMO CONTROL
BIOLÓGICO SOBRE *Hemileia vastatrix* AGENTE CAUSAL DE LA ROYA DEL
CAFÉ
TESIS**

Para obtener el grado de:

Licenciatura en Químico Farmacobiólogo.

PRESENTA

p. Q.F.B. MARÍA JOSÉ HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS

D.C. SANDRA LUZ CABRERA HILERIO

ASESOR DE TESIS

D. C. JUDITH CASTELLANOS MOGUEL

Marzo, 2019.



BUAP

Puebla, Pue. a 24 de Abril de 2018

**C. HERNANDEZ HERNANDEZ MARÍA JOSÉ
PRESENTE**

Toda vez que se cuenta con la aprobación del Coordinador del Área de Bioquímica y Alimentos,

DC. SANDRA LUZ CABRERA HILERIO, Director de Tesis,

DC. JUDITH CASTELLANOS MOGUEL, Asesor,

se le comunica la autorización de su anteproyecto de tesis denominado:

**EVALUACIÓN IN VITRO DE *Metarhizium anisopliae* COMO CONTROL
BIOLÓGICO SOBRE *Hemileia vastatrix* AGENTE CAUSAL DE LA ROYA DEL
CAFÉ.**

Y con esta fecha se registra en los archivos de la Dirección de esta Facultad,
para los fines legales a los que haya lugar

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ

DIRECTOR





BUAP Puebla, Pue. a 8 de Febrero de 2019

DC. LAURA MORALES LARA
MC. GONZALO A. FLORES MENDOZA
MC. ARMANDO MENA CONTLA

Con toda atención comunico a Uds. que se les propone como integrantes de la Comisión Revisora de Tesis que presenta el (la) Pasante de la Carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO

HERNANDEZ HERNANDEZ MARÍA JOSÉ

cuyo título es :

EVALUACIÓN IN VITRO DE *Metarhizium anisopliae* COMO CONTROL BIOLÓGICO SOBRE *Hemileia vastatrix* AGENTE CAUSAL DE LA ROYA DEL CAFÉ.

Realizada en el Area de Bioquímica y Alimentos;
asimismo, les ruego que a la brevedad posible emitan el dictamen correspondiente.

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ

DIRECTOR



C.c.p. Archivo



BUAP

DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
P R E S E N T E

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de la Tesis del alumno de la carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO
HERNANDEZ HERNANDEZ MARÍA JOSÉ

realizada en el area de Bioquímica y Alimentos, comunican a Ud. la aprobación de la misma con la siguiente redacción:

EVALUACIÓN IN VITRO DE *Metarhizium anisopliae* COMO CONTROL BIOLÓGICO SOBRE *Hemileia vastatrix* AGENTE CAUSAL DE LA ROYA DEL CAFÉ.

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan, a los 26 días del mes de Febrero de 2019

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

DC. LAURA MORALES LARA

MC. GONZALO A. FLORES MENDOZA

MC. ARMANDO MÉNA CONTLA

C.c.p. Archivo

ÍNDICE GENERAL

	ÍNDICE DE TABLAS.....	III
	ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
1.	RESUMEN.....	1
2.	INTRODUCCIÓN.....	2
3.	ANTECEDENTES.....	4
3.1	Café.....	4
3.1.1	El mercado del café en México.....	6
3.2	Roya del café.....	7
3.2.1	Aspectos biológicos de <i>Hemileia vastatrix</i>	9
3.2.2	Ciclo de vida y proceso de infección.....	9
3.2.3	Medidas de control de la Roya.....	10
3.3	Características de <i>Metarhizium anisopliae</i>	12
3.3.1	Ciclo de vida de <i>Metarhizium anisopliae</i>	14
3.4	Investigaciones sobre el uso de <i>M. anisopliae</i> y hongos entomopatógenos sobre plagas de plantas.....	15
4.	JUSTIFICACIÓN.....	17
5.	OBJETIVOS.....	18
5.1	Objetivo general.....	18
5.2	Objetivos específicos.....	18
6.	DIAGRAMA DE TRABAJO.....	19
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
7.1	Material de vidrio y reactivos.....	20
7.2	Material biológico.....	20
8.	METODOLOGÍA.....	22
8.1	Obtención Material biológico.....	22
8.2	Identificación genética de <i>Metarhizium anisopliae</i>	22
8.2.1	Condiciones generales para la identificación genética de <i>M. anisopliae</i>	22
8.2.2	Purificación de ADN.....	23
8.2.3	Electroforesis.....	23
8.2.4	PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	24
8.3	Evaluación de <i>Metarhizium anisopliae</i> bajo factores abióticos.....	25
8.3.1	Condiciones de cultivo para Termotolerancia.....	25
8.3.2	Condiciones de cultivo para pH.....	25
8.3.3	Condiciones de cultivo para fotoperiodo.....	25

8.4	Suspensiones de uredosporas de <i>Hemileia vastatrix</i> y conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i>	26
8.4.1	Suspensión de conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> con uredosporas de <i>Hemileia vastatrix</i>	26
9.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	28
9.1	Características morfológicas de <i>M. anisopliae</i> , <i>H. vastatrix</i> e <i>I. fumosorosea</i>	28
9.2	Identificación genética.....	30
9.3	Evaluación de la cepa de <i>M. anisopliae</i> bajo factores abióticos.....	32
9.3.1	Termotolerancia.....	33
9.3.2	pH.....	34
9.3.3	Fotoperiodo.....	35
9.4	Evaluación del porcentaje de germinación de conidios y uredosporas.....	37
10.	CONCLUSIONES.....	41
11.	SUGERENCIAS.....	42
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	43
13.	ANEXOS.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
Tabla 1	Fungicidas validados por el Centro de Investigaciones en Café de Anacafé (CEDICAFE) para el control de la roya.....	11
Tabla 2	Determinaciones y métodos a utilizar.....	20
Tabla 3	Equipo a utilizar.....	21
Tabla 4	Preparación de medio de cultivo líquido YPG.....	23
Tabla 5	Condiciones del termociclador.....	24
Tabla 6	Promedio de crecimiento micelial de la cepa <i>M. anisopliae</i> a 15, 25, 30 y 35 °C.....	33
Tabla 7	Promedio de crecimiento micelial de <i>M. anisopliae</i> a pH 4, 5, 6 y 7.....	34
Tabla 8	Promedio de crecimiento micelial de <i>M. anisopliae</i> a fotoperiodo 12:12 y oscuridad total.....	35
Tabla 9	ANOVA de los resultados de crecimiento micelial a 15, 25, 30 y 35°C.....	51
Tabla 10	ANOVA de los resultados de crecimiento micelial de <i>M. anisopliae</i> a pH 4, 5, 6, y 7.....	51
Tabla 11	ANOVA de los resultados del crecimiento de las cepas a fotoperiodo 12:12 h y 24 h oscuridad.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
Figura 1	Distribución a nivel mundial de países productores de café.....	4
Figura 2	Producción de los estados cafetaleros en el periodo 1980-2013.....	6
Figura 3	Promedio del porcentaje de severidad daño a hoja.....	8
Figura 4	Uredosporas de <i>Hemileia vastatrix</i> vistas en microscopio óptico.....	9
Figura 5	Proceso de infección y ciclo de vida de <i>Hemileia vastatrix</i>	10
Figura 6	Microfotografía de <i>Metarhizium anisopliae</i>	13
Figura 7	Morfología de <i>Metarhizium anisopliae</i>	28
Figura 8	Recolección de uredosporas de <i>Hemileia vastatrix</i>	29
Figura 9	Morfología de las uredosporas de <i>Hemileia vastatrix</i> observadas a 40x.....	29
Figura 10	Cepa de <i>Isaria fumosorosea</i>	30
Figura 11	Amplificación de las regiones ITS.....	30
Figura 12	Productos de PCR.....	31
Figura 13	Análisis en Chromas de la secuencia obtenida.....	31
Figura 14	Comparación de la secuencia obtenida con la base de datos de BLAST-NCBI.....	32
Figura 15	Cultivos de <i>M. anisopliae</i> a diferentes valores de pH.....	35
Figura 16	<i>M. anisopliae</i> sometido a 12:12 h.....	36
Figura 17	Interacción entre <i>M. anisopliae</i> y <i>H. vastatrix</i>	37
Figura 18	Porcentaje de germinación de uredosporas.....	38
Figura 19	Porcentaje de germinación de conidios.....	39

1. RESUMEN

La roya del café es una enfermedad ampliamente distribuida a nivel mundial, el agente causal es el hongo *Hemileia vastatrix*. Los cultivos de café infectados disminuyen su productividad severamente. Actualmente se busca desarrollar estrategias para el manejo de la roya que disminuyan los efectos secundarios a la salud humana y ambiental, una de estas estrategias es el control biológico, en el que se emplean microorganismos antagonistas para el control de un patógeno. Diferentes microorganismos parasitan de forma natural a *Hemileia vastatrix*, tales como los hongos entomopatógenos, por ejemplo, *Metarhizium anisopliae*. En el presente trabajo, se evaluó la capacidad de adaptación de una cepa de *Metarhizium anisopliae* bajo factores abióticos: pH, temperatura y fotoperiodo, así como la capacidad parasítica del hongo entomopatógeno sobre *H. vastatrix*. Se realizó la identificación macroscópica, microscópica y genética de *M. anisopliae*. Posteriormente se evaluó el crecimiento de este hongo a diferentes valores de pH, temperatura y exponiéndolo a 12 horas luz/12 horas oscuridad. Se sembró el hongo en medio PDA y se midió diariamente el crecimiento durante 13 días. Se obtuvieron suspensiones de conidios de *M. anisopliae* en concentración de 1×10^6 conidios/mL, se agregaron 10 mg de uredosporas de *H. vastatrix*, se realizó un conteo de germinación de uredosporas a las 6, 24 y 48 horas. Los resultados mostraron que el microorganismo creció en diferentes valores de pH (4, 5, 6 y 7), crece expuesta a la luz, sin embargo, no crece a altas temperaturas (superiores a 35°C). Los resultados de la capacidad parasítica in vitro de *M. anisopliae* sobre *H. vastatrix* mostraron que la germinación de uredosporas se redujo hasta un 81 % en presencia de conidios de *M. anisopliae* con respecto al control. La interacción *H. vastatrix*-*M. anisopliae* fue evidenciada mediante microscopía, en donde se logró identificar que los conidios de *M. anisopliae* desarrollaron tubos germinales durante el proceso de invasión de las uredosporas, esta evidencia sugiere que la reducción en el porcentaje de germinación de uredosporas está relacionada con la presencia de conidios de *M. anisopliae*, a su vez este hongo entomopatógeno

es capaz de adaptarse a diferentes factores del ambiente donde se encuentran los cafetales.

2. INTRODUCCIÓN

El cultivo del café es uno de los más importantes en el mercado internacional y representa para los países centroamericanos una fuente importante de divisas y trabajo (Jiménez, 1997 y Castellón, 1999). En México, el cultivo de café es considerado como el producto agrícola más importante en el comercio internacional, teniendo una superficie sembrada de 760,974.05 hectáreas. El café en México se produce en doce estados que son: Colima, Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Veracruz, de los cuales Chiapas, Veracruz y Puebla aportan el 82% de la producción de café cereza (SIAP, 2013). México, como todos los países productores del aromático, sufrió los efectos negativos de la crisis ocasionada en las últimas décadas. La crisis de precios redujo sustancialmente el ingreso por venta de café a los productores, lo que generó a su vez amplios y diversos efectos negativos como el abandono total o parcial de algunas labores culturales, aunado a esto, en los últimos años debido al cambio climático, se ha favorecido la aparición de plagas y severas enfermedades como ojo de gallo (*Mycena citricolor*), mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*), mal de hilachas (*Corticillium koleroga*), antracnosis (*Colletotricum coffeanum*), mal rosado (*Phanerochaete salmonicolor*) y la roya anaranjada (*Hemileia vastatrix*) entre otras (SAGARPA, 2011). La roya del café es considerada la plaga más severa y destructiva del cafeto y la de mayor importancia económica a nivel mundial, debido a que provoca la caída prematura de las hojas, propiciando la reducción de la capacidad fotosintética, así como el debilitamiento de los árboles y en infecciones severas puede ocasionar incluso la muerte de la planta (APS, 2011). Uno de los principales problemas que genera la presencia de roya es la rápida dispersión de sus uredosporas, las cuales son producidas en grandes cantidades y corresponden al polvo amarillo o naranja que se observa en el envés de las hojas.

Entre los factores abióticos que favorecen la dispersión del hongo se encuentran el viento y la lluvia. Mientras que el viento dispersa las uredosporas a grandes distancias, provocando la presencia de la enfermedad en otras regiones productoras de café, la lluvia influye en la persistencia local de la roya, al provocar la dispersión local de hoja a hoja o entre plantas (Rivillas et al., 2011). Actualmente para el control de la roya, se han considerado una serie de estrategias, como el control químico, la resistencia genética, el control cultural y el manejo integrado de plagas. Lamentablemente algunas de estas medidas resultan inadecuadas, ya sea por su poca efectividad, sus altos costos y su efecto contaminante en el medio ambiente. Es por ello que surge la necesidad de buscar alternativas que sean eficientes, naturales, compatibles con el ambiente y evitar con ello los altos costos por el uso de productos químicos, además de la contaminación. Para disminuir el uso de químicos y el efecto nocivo que generan, se ha empleado el control biológico que consiste en la utilización intencionada de organismos vivos nativos o introducidos, para mitigar el efecto adverso de plagas al suprimir su actividad y disminuir la población de uno o más patógenos, de esta manera se reduce su número por debajo del nivel que causaría un daño económico (Stoner, 2004). Estos organismos se conocen como Agente de Control Biológico (ACB). Dentro de ellos, se encuentra al hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Zimmermann,). Sin embargo, para la utilización de un hongo micoparásito en la supresión de este tipo de enfermedades, se debe considerar el clima ya que una vez aplicadas las esporas en la zona afectada, se ve perjudicada su abundancia y sobrevivencia por la radiación solar, lluvia, temperatura, humedad, química en la superficie de la hoja y la microbiota del filoplano (Jaronski, 2010 y Reich et al. 2003).

Por todo lo anterior en este trabajo se planteó la evaluación *in vitro* de *Metarhizium anisopliae* como control biológico sobre *Hemileia vastatrix* agente causal de la roya del café.

3. ANTECEDENTES

3.1 Café

El café es uno de los principales productos que se comercializan en el mercado mundial, su producción se realiza por lo regular en las zonas tropicales. Actualmente más de 80 países lo cultivan en sus diferentes variedades, de los cuales, poco más de 50 países lo exportan (CEFP, 2001). El cultivo de café es uno de los más importantes en el mercado internacional y representa para los países centroamericanos una fuente importante de trabajo (AMECAFÉ, 2012).

El café se cultiva principalmente en los países tropicales ubicados en América Latina, Asia y África. Las dos variedades principales de café producido comercialmente son arábica y robusta. Actualmente, el café es el segundo producto más comercializado en el mundo, sólo superado por el petróleo (Anacafé, 2013)

El café pertenece a la familia de las Rubiáceas, en la que se incluyen cientos de géneros y especies. El género *Coffea* consta de 25 a 40 especies, sin embargo, sólo se cultivan aproximadamente diez y dos de ellas corresponden a más del 95% de la producción mundial de café, las cuales son *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (Figura 1).

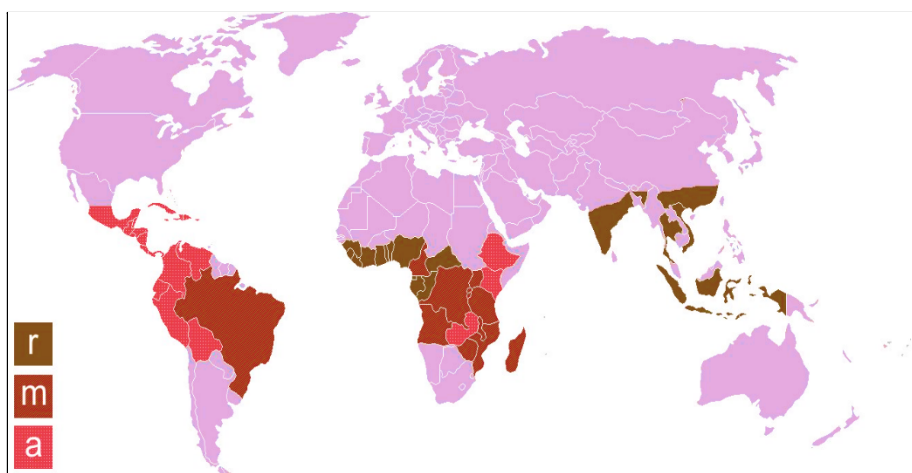


Figura 1. Distribución a nivel mundial de países productores de café. (r): especie Robusta (*C. canephora*), (m): mixto, (a), especie arábica (*C. arabica*)

La especie arábica posee dos variedades botánicas que son: *Coffea arabica* variedad Arabica y variedad Bourbon. De estas dos variedades se han producido numerosos híbridos y existen además un gran número de cultivares. Entre las variedades más conocidas de café arábica destaca la variedad Typica, considerada como la base a partir de la cual muchas variedades de café se han desarrollado. Aunque tiene una producción muy baja es de excelente calidad, por ello el 75% de la producción mundial del café pertenece a esta variedad, la variedad Bourbon produce de 20 a 30% más café que la variedad Typica, el fruto es relativamente pequeño y denso, madura rápidamente y tienen mayor riesgo de caerse durante vientos fuertes o lluvias, una buena producción se realiza entre 1000 y 2000 metros sobre el nivel del mar, la calidad del producto es excelente y similar al de la variedad Typica. La variedad Caturra es una mutación de la variedad Bourbon que presenta una alta producción y buena calidad, pero requiere de una amplia atención y fertilización, a pesar de esto se adapta a casi cualquier ambiente, favoreciéndose más entre los 500 y 1700 metros con precipitaciones anuales entre 2500-3500 mm, se ha observado que a mayor altitud aumenta la calidad, pero disminuye la producción.

La variedad Catuai es una planta de café de alto rendimiento resultante de un cruce entre Mundo Novo y Caturra, su fruto no cae de la rama con facilidad, lo cual es favorable en zonas de fuertes vientos o lluvia.

Es muy importante señalar que esta variedad también requiere de fertilización y ciertos cuidados. La variedad Catimor es un cruce entre Timor (híbrido de robusta y arábica) y Caturra, su producto es de maduración temprana y la producción es muy alta, por lo que deben ser monitoreados, se adapta bien a regiones más bajas, pero a una altura mayor tiene una mejor calidad de taza. La variedad Mundo Novo es un híbrido natural de Typica y Bourbon, es la variedad más fuerte y resistente a las enfermedades, tiene una alta producción, pero madura un poco más tarde que otros tipos de café, se da en altitudes de entre 1000 y 1700 metros

sobre el nivel del mar con precipitaciones anuales de 1200-1800 mm (Anacafé, 2013).

3.1.1 El mercado del café en México

El cultivo del café, es una de las actividades más importantes dentro de la agricultura mexicana, tanto por el número de productores que intervienen, como por su importancia económica en los ingresos que se generan como producto de su exportación. No obstante, el nivel de ingresos que genera este cultivo, sus productores, principalmente los pequeños, enfrentan una serie de problemas que tienen que ver con sus condiciones de vida y producción. Aunado a lo anterior, el minifundio es una condición que caracteriza la cafecultura en México. Con base en datos del padrón cafetalero del año 2013 publicado por la SAGARPA (Figura 2), el tamaño promedio de los terrenos dedicados al cultivo del café es de 1.5 hectáreas. La producción de café en México puede considerarse fuertemente amenazada, debido a la crisis recurrente en las últimas décadas, así como plagas entre otros factores. Por otra parte, México es el principal productor mundial de café orgánico y uno de los primeros en cafés “Gourmet” (CEFP, 2001; OIC, 2013).

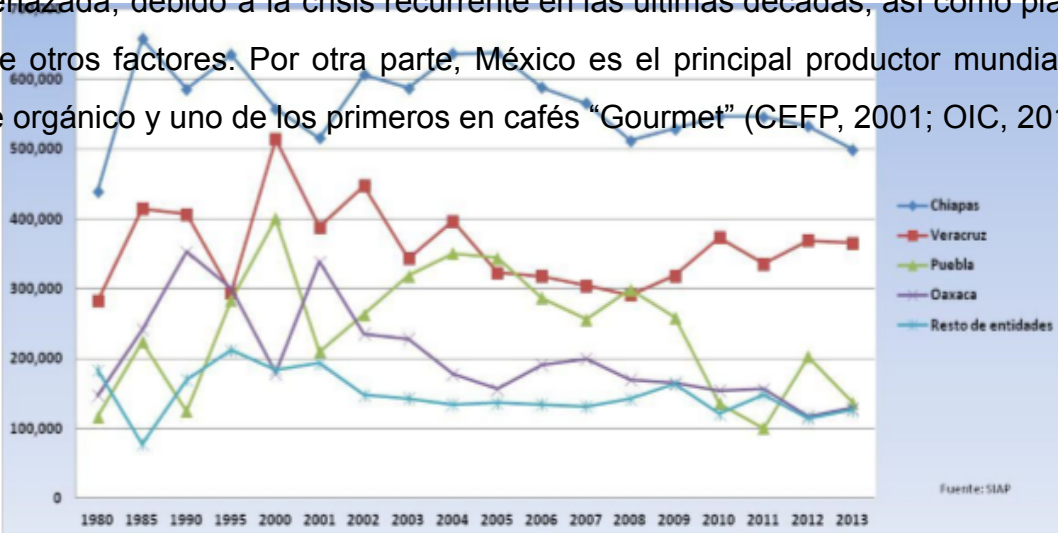


Figura 2. Producción en toneladas de los estados cafetaleros en el periodo 1980-2013. SIAP 2013.

El café se produce en México en cuatro zonas cafetaleras: las vertientes del Golfo de México y del Océano Pacífico, la zona Centro-Norte y la del Soconusco en Chiapas, en conjunto abarcan 398 municipios de doce estados del país que son: Colima, Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Veracruz, de los cuales destaca Chiapas como el primer productor de café con una participación del 34.8%, Veracruz con 25.2%, Oaxaca y Puebla con un 28%, por lo que estos cuatro estados aportan el 88% del total nacional. Cabe destacar que la producción de café involucra a más de 282 mil productores entre los cuales se encuentran en una mayoría minifundistas e indígenas (CEFP, 2001).

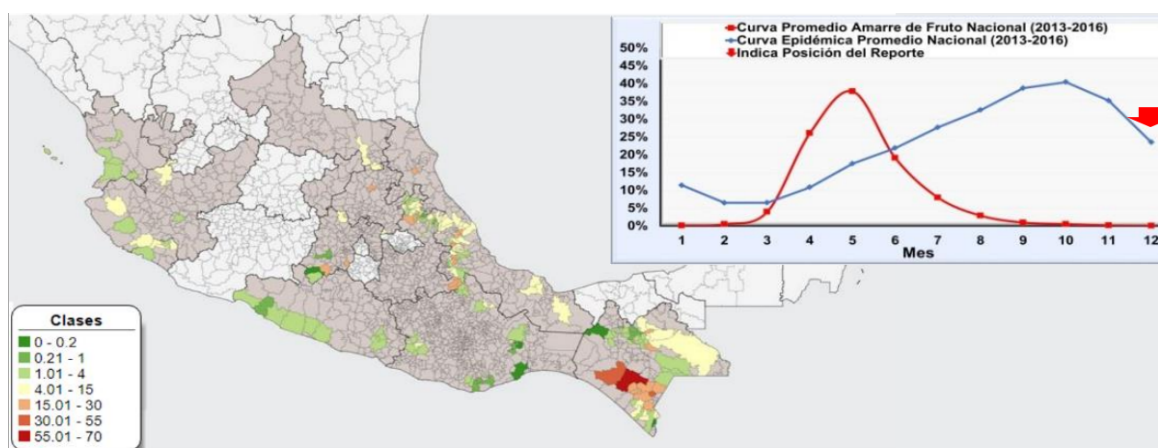
En Puebla, el café se produce particularmente en 625 comunidades de 55 municipios de acuerdo con el padrón cafetalero, el área destinada a éste cultivo abarca 67,136 hectáreas (SAGARPA, 2011) y es el segundo estado que más café por hectárea produce, registrando en el 2013 2.939 ton/ha, seguido por Veracruz con un promedio de 2.575 ton/ha (SIAP, 2013).

3.2 Roya del café

La roya, *Hemileia vastatrix*, está considerada en el ámbito mundial entre las siete enfermedades más peligrosas que atacan a las plantas tropicales, y es sin duda la enfermedad más dañina del café (Subero, 2005). El agente causal es el hongo *Hemileia vastatrix* (Berk. & Br.), los cultivos de café infectados con este hongo disminuyen su productividad severamente. Esta enfermedad se ve favorecida por las temperaturas cálidas y ambientes húmedos y lluviosos; su importancia es mayor en zonas cafetaleras de altura media y baja (Barquero, 2013). El principal daño causado por este hongo es la caída de gran cantidad de hojas (especialmente en ataques severos) lo que causa un debilitamiento general de la planta, una maduración muy irregular de la cosecha y una reducción de la producción para el siguiente año, alrededor de un 20% (Avelino y Rivas, 2013). En México, la roya del café representa un riesgo potencial para la actividad cafeticultora nacional (SIAP, 2013), está presente en nuestro país desde 1981 y

existen las condiciones favorables para su desarrollo y establecimiento en las principales regiones cafetícolas (SENASICA, 2013).

El Ciclo Epidémico 2017- 2018, de acuerdo a 3412 evaluaciones mensuales en parcelas fijas y móviles del Programa de vigilancia epidemiológica fitosanitaria (PVEF–Cafeto) (Figura 3), reportó decrementos variables entre 1.0 y 27.4% de severidad foliar, atribuidos a la fase avanzada de recolección o cosecha de fruto y por ende defoliación moderada-alta. En general, la severidad promedio foliar durante este periodo fue 21.1% en Hidalgo, 14.2% en San Luis Potosí, 13.8% en Querétaro, 13.5% en Veracruz, 11.1% en Estado de México, 8.7% en Nayarit, 8.5% en Oaxaca, 8.0% en Puebla, 6.6% en Chiapas, 5.9% en Jalisco y 4.6% en Guerrero (Figura 3). Debido al estatus actual del ciclo epidémico-productivo y las



condiciones climáticas, el 52.7% de los municipios en vigilancia reportan niveles de daño foliar entre 5.0–57.9%, el restante 47.3% reporta niveles inferiores a 5% (SAGARPA 2018).

Figura 3. Promedio del porcentaje de severidad daño a hoja. SAGARPA, 2018

Los reportes de esta plaga en países fronterizos como Guatemala y Belice, significan una fuente potencial de inóculo, específicamente por la cercanía a las zonas cafetaleras de Chiapas (AMECAFE, 2012). Aunado a esto, se ha observado que la variación de las condiciones climáticas y un manejo no adecuado de la roya pueden tener como consecuencia el aumento en incidencia y

severidad (Cristancho *et al.*, 2012). Se han realizado numerosos esfuerzos por encontrar alternativas al control químico de la roya. Algunos estudios como el de Jaramillo González en 2012, menciona que *Metarhizium anisopliae* es un microorganismo efectivo contra la broca del café, otra plaga que afecta a la cafeticultura. Al ser este un hongo entomopatógeno, produciendo quitinasas (Barranco *et al.*, 2002) siendo estas enzimas las responsables de la ruptura de la quitina presente en la pared celular de hongos como *Hemileia vastatrix*.

3.2.1 Aspectos biológicos de *Hemileia vastatrix*

Existen 45 razas fisiológicas de *Hemileia vastatrix* conocidas hasta ahora, de las cuales la raza II es la más frecuente, le sigue la raza I y las otras razas son de menor distribución (Castillo, 2013; Zambolim *et al.*, 2005). El poder infectivo de *H. vastatrix* se atribuye a las esporas, denominadas uredosporas, las cuales infectan a la planta. Estas uredosporas presentan un tamaño microscópico de 30 μ de largo por 20 μ de ancho, son reniformes, lisas en la cara interna, rugosas en la externa (Figura 4).

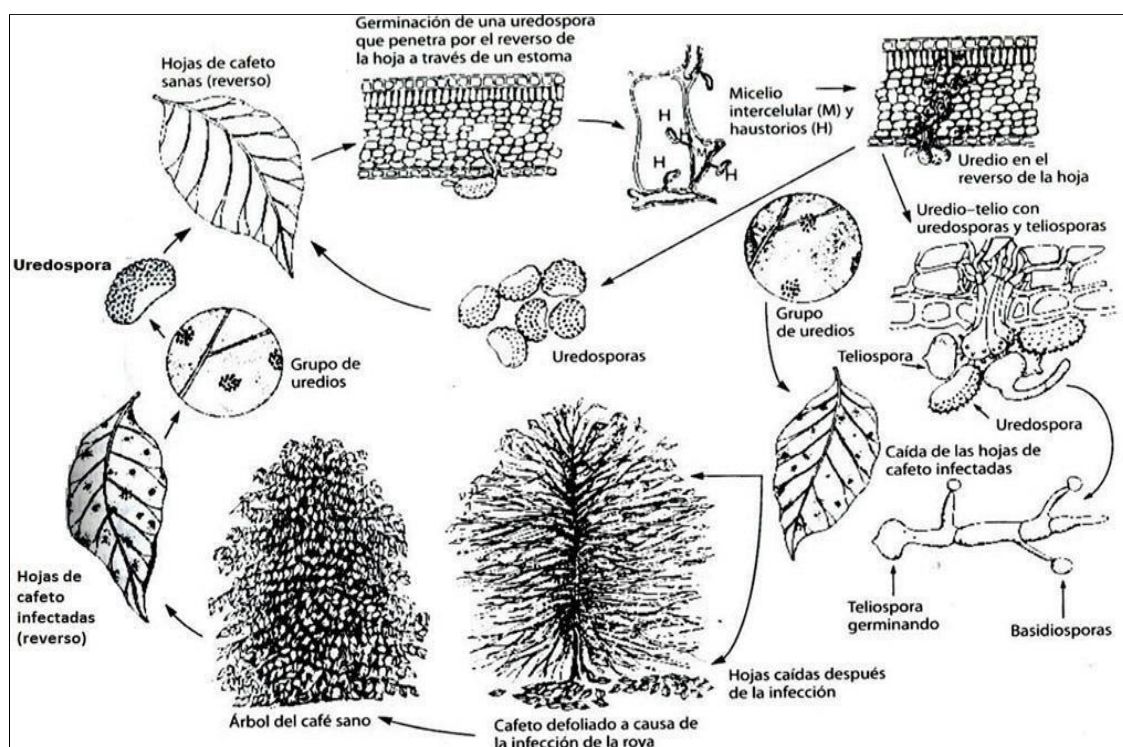


Figura 4. Uredosporas de *Hemileia vastatrix* vistas en microscopio óptico 100x.

El ciclo de vida de *H. vastatrix* es asexual, por la vía cíclica de germinación de uredosporas (Ramiro *et al.*, 2009). La temperatura óptima para su germinación es entre los 21 a 28 °C, y puede estar en periodo de latencia entre 25 y 30 días (Haddar *et al.* 2014 y SAGARPA, 2013).

3.2.2 Ciclo de vida y proceso de infección

El proceso infectivo (Figura 6), inicia con la deposición de las uredosporas en el envés de la hoja de café. Para la formación del tubo germinal, las esporas requieren de la presencia de agua libre por un tiempo mínimo de 6 horas, temperatura entre 21 a 25 °C y condiciones de oscuridad, la formación del apresorio requiere un periodo de 5.3 a 8.5 horas. Una vez que el hongo ha germinado, penetra las hojas por las estomas, posteriormente desarrolla haustorios que entran en contacto con las células de la planta y con estos extraen



los nutrientes para su crecimiento. Al paso de 30 días de la colonización, el hongo madura para formar soros, que son los encargados de producir nuevas uredosporas (Haddar *et al.* 2014; SAGARPA, 2013 y Barva, 2013). El tiempo transcurrido desde la infección hasta la producción de esporas se denomina periodo de latencia (Rivillas *et al.*, 2011).

Figura 5. Proceso de infección y ciclo de vida de *Hemileia vastatrix*. Modificado de Agrios 1978, en Atlas y Bartha, 2002.

Los daños severos mayores al 60%, pueden causar defoliación, reducción en el rendimiento o reducción en el nivel de amarre de fruto del siguiente ciclo de

cultivo, reducción de la capacidad fotosintética y en infecciones severas puede ocasionar la muerte de ramas e incluso la muerte de los árboles (APS, 2011).

3.2.3 Medidas de control de la Roya

El manejo de la roya implica una serie de estrategias como el control químico y el manejo integrado de plagas, este último incluye las prácticas culturales, la resistencia genética y también el control biológico. El control químico ha sido eficaz para el manejo de la roya, el oxiclورو de cobre es uno de los fungicidas más utilizado actualmente (Tabla 1); sin embargo, la contaminación del ambiente, así como el alto costo de su aplicación y el riesgo de desarrollo de resistencia, han provocado que esta estrategia no se considere como la solución ideal al problema (Javed, 1987, López *et al.*, 1990 y Becker, 1991).

Nombre comercial	Ingrediente activo	Dosis por manzana
Fungicidas de contacto		
Caldo bordelés	Sulfato de cobre + Hidróxido de calcio	4 – 5 libras
Hidróxido de cobre	Cobre	4 libras
Óxido de cobre	Cobre	4 libras
Oxicloruro de cobre	Cobre	5 libras
Timorex Gold	<i>Melaleuca alternifolia</i>	1000 cc
Vigilante	Azufre + Cobre	1000 cc
Fungicidas sistémicos con un ingrediente activo		
Opus 12.5 SC	Epoxiconazole	350 cc
Alto 10 SL	Cyproconazole	280 cc
Caporal 25 DC	Triadimenol	350 – 500 cc
Atlas 25 EW	Tebuconazole	400 – 560 cc
Fungicidas sistémicos en mezclas de dos ingredientes activos		
Silvacur Combi 30 EC	Tebuconazole + Triadimenol	350 – 500 cc
Duett 25 SC	Epoxiconazole + Carbendazim	350
Amistar Xtra 28 SC	Azoxystrobin + Cyproconazole	350 – 400 cc

Tabla 1. Fungicidas validados por el Centro de Investigaciones en Café de Anacafé (CEDICAFE) para el control de la roya.

Otra medida de control ha sido la utilización de variedades con resistencia genética a las razas fisiológicas de *H. vastatrix*, lo cual se ha considerado eficaz a largo plazo. Sin embargo, esta medida de control a pesar de dar buenos resultados, no es del todo aceptada por los cafecultores debido a que puede cambiar las características propias del café de la región (Rubio y Fereres, 2005). El llamado control biológico clásico consiste en la potenciación o utilización de los enemigos naturales de una plaga para reducir su población. En un sentido restringido el control biológico es la introducción artificial de microorganismos antagonistas en un ecosistema determinado para controlar a un patógeno o una plaga (Rubio y Fereres, 2005).

Por otro lado, existen diversas prácticas culturales para el control de la roya que ayudan a mantener las plantaciones en buen estado como la regulación de sombra, podas de cafetos, control de maleza y fertilización. Para realizar estas prácticas es indispensable conocer cómo se desarrolla el cultivo, cuáles son las etapas más susceptibles al ataque de la plaga y qué hacer después de la cosecha para prevenir un brote que afecte el ciclo productivo siguiente (Castillo, 2013), sin embargo, estas prácticas no son suficientes para enfrentar a una enfermedad tan agresiva como la roya del café.

Los microorganismos que parasitan de forma natural a *H. vastatrix* pueden tener efectos significativos para reducir o hasta eliminar los impactos negativos de la enfermedad. Dentro de estos microorganismos existen varios que han demostrado tener un efecto negativo sobre *H. vastatrix*. Los hongos entomopatógenos son efectivos para el control de este tipo de enfermedades, por ejemplo, *Metarhizium anisopliae* (Rolz et al., 2013; González y Surís, 2007). Estos son hongos Ascomycotas del orden Hypocreales y pueden parasitar otros hongos (Guerrero et al. 1999). Este género agrupa especies micoparásitas y entomopatógenas, tiene alta capacidad para infectar insectos patógenos de

plantas y además es uno de los hiperparásitos más comunes de la roya del café, se presenta en los cafetales en forma natural y ejerce un efecto antagónico sobre *H. vastatrix*, por ello ha sido utilizado como una alternativa de biocontrol en agricultura y horticultura (Canjura et al., 2002; Vandermeer et al., 2009; Mahfud et al., 2006; Jackson et al., 2012; González y Surís, 2007).

3.3 Características de *Metarhizium anisopliae*

M. anisopliae pertenece al Phylum→ Ascomycota; clase→ Sordariomycetes; Orden→ Hypocreales; Género→ *Metarhizium* y Especie→ *M. anisopliae* (Tanada y Kaya 1993). Estos hongos se caracterizan por presentar hifas lisas, septadas conidias predominantemente cilíndricas, agrupadas, hialinas, verde oliva, uninucleados de extremos redondeados, el tamaño promedio es de 6,0 mm de largo (Rango 5,2 - 7,1 mm) y de 2,2 mm de ancho (rango 2,0 - 2,6 mm) (Guerrero et al. 1999).

Bacterias, virus y hongos se han usado para establecer controles biológicos en cultivos, tal es el caso del hongo *Metarhizium anisopliae*, el cual ha demostrado ser efectivo en el control de plagas de insectos como palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*) y gallina ciega (*Phyllophaga* spp.) Cuando entra en contacto con una de las 300 especies de insectos hospederos, *Metarhizium anisopliae*, que en los campos de cultivo se suministra en forma de spora, genera una hifa infectiva, un tubo que por presión mecánica y degradación enzimática rompe la cutícula del insecto y penetra hasta llegar a la hemolinfa, equivalente al torrente sanguíneo en humanos. En la hemolinfa, el hongo encuentra los nutrientes necesarios para continuar desarrollándose y emerge nuevamente por la cutícula del insecto, hasta envolverlo por completo por medio del micelio, similar a una estola blanca, para después generar esporas color verde olivo.

Figura 6. Microfotografía de *Metarhizium anisopliae* (40X). (NARO 2011)



3.3.1 Ciclo de vida de *Metarhizium anisopliae*

En general los hongos entomopatógenos desarrollan las siguientes fases sobre su hospedante: germinación, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, colonización y reproducción.

El proceso se inicia cuando la espora o conidia se adhiere a la cutícula del insecto, luego desarrolla un tubo germinativo y un apresorio, con éste se fija en la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio (hifa de penetración) se da la penetración al interior del cuerpo del insecto. La germinación ocurre aproximadamente a las 12 horas post-inoculación y la formación de apresorios se presenta de 12 a 18 horas post-inoculación (Vicentini y Magalhaes, 1996). En la penetración participa un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan descomposición del tejido en la zona de penetración, lo que facilita el ingreso del hongo. Después de la penetración, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, colonizando completamente la cavidad del cuerpo del insecto, esto sucede en 3 ó 4 días después de la inoculación. A partir de la colonización se forman pequeñas colonias y estructuras del hongo, lo que corresponde a la fase final de la enfermedad del insecto, ocurre 4 o 5 días después de la inoculación (Hajek y Leger, 1994). Otra forma mediante la cual el hongo puede causar la muerte del insecto, es mediante la producción de toxinas. Los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de sintetizar toxinas que son utilizadas en el ciclo de la relación patógeno-hospedante. Entre estas toxinas se han encontrado dextruxinas, demetildextruxina y protodextruxina, las cuales son sustancias de baja toxicidad, pero de mucha actividad tóxica sobre insectos, ácaros y nematodos (Sandino, 2003). Las destruxinas afectan varios organelos tales como mitocondria, retículo endoplásmico y membrana nuclear, paralizando las células y causando disfunción del intestino, túbulos de Malpighi, hemocitos y

tejido muscular. La esporulación ocurre en 2 a 3 días, dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad relativa del ambiente. La infección por el entomopatógeno puede ser afectada principalmente por la baja humedad relativa y por la falta de habilidad para utilizar los nutrientes disponibles sobre la superficie de la cutícula o por la falta de factores necesarios para el reconocimiento de un hospedero susceptible o sitio de infección penetrable. El reconocimiento de un hospedero susceptible involucra signos químicos y topográficos. También puede fracasar la invasión del hongo por la presencia de compuestos inhibitorios tales como fenoles, quinonas y lípidos en la superficie de la cutícula (Hajek y Leger, 1994).

3.4 Investigaciones sobre el uso de *M. anisopliae* y hongos entomopatógenos sobre plagas en plantas.

El empleo de hongos entomopatógenos en el campo comenzó a fines del siglo XIX, sin embargo, en Brasil fue a partir de 1964, después de la aparición epizootica de *Metarhizium anisopliae* sobre Cercópodos de la caña de azúcar es que adquirió importancia su estudio por parte de los investigadores. Se ha aplicado este entomopatógeno hasta en 100.000 ha/año de caña de azúcar para el control de *Mahanarva posticata* (Lecuona, 1996).

Este hongo se encuentra en la naturaleza, en rastrojos de cultivos, estiércol, en el suelo, las plantas, etc., logra buen desarrollo en lugares frescos, húmedos y con poco sol. Los hongos entomopatógenos constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico sobre plagas de insectos, principalmente en los chupadores o succionadores ya que estos no pueden ingerir patógenos que infectan a través del tracto digestivo (Hajek y Leger, 1994). *M. anisopliae* ataca naturalmente más de 300 especies de insectos de diversos órdenes. Entre las plagas afectadas por este hongo se encuentra el salivazo de la caña de azúcar (*Aeneolamia varia*), y plagas por chinches de diversos cultivos. Los insectos muertos por este hongo son cubiertos completamente por micelio, el cual

inicialmente es de color blanco, pero se torna verde cuando el hongo esporula (Sandino, 2003).

Castillo (2006) evaluó tres cepas de *M. anisopliae* contra la “mosca pinta” (*Homoptera: Cercopidae*), una plaga que ataca a pastos naturales utilizando dos formas de aplicación: convencional (200 l agua/ha) y en bajo volumen (60 l agua/ha) en fincas con pasto *Brachiaria decumbens* con una dosis de 2.5×10^{12} conidios/ha.

Se reporta que la aplicación de *Metarhizium anisopliae* sobre el ganado bovino, causa una mortalidad del 100% en garrapatas *Rhipicephalus appendiculatus* y *Amblyomma variegatum*, además, redujo la fecundidad y en 100% la emergencia de larvas (Kaaya et al., 1996).

Miranda (2017) evaluó 12 cepas de *Lecanicillium lecanii* como control biológico sobre *Hemileia vastatrix*, siendo este otro hongo entomopatógeno efectivo contra la roya del café. Las cepas que evaluó de *Lecanicillium lecanii* nativas de México con aislados de la ARSEF para ser consideradas en el control biológico de la roya del cafeto en tres etapas, en la primera cuantificó la producción de quitinasas totales en 19 cepas del micoparásito. La actividad enzimática se indujo utilizando un medio de agua de suministro adicionado con quitina coloidal teñida con azul brillante de Remazol que actuó como sustrato; la actividad quitinolítica se midió por la liberación del colorante, que se expresa en unidades, siendo una unidad la cantidad de enzima que origina un cambio en la absorbencia de 0.01 a 595 nm; y se realizó al analizar el sobrenadante de los cultivos por espectrofotometría cada 24 h durante 13 días. Con respecto al pH, las cepas no presentaron una diferencia sustancial respecto al pH inicial en el crecimiento y esporulación de los aislados después de 20 días en incubación, excepto las cepas en pH 4, donde se redujo significativamente el crecimiento. Para la prueba de fotoperiodo se registró la reducción en el crecimiento micelial observado en la prueba de fotoperiodo 12:12 h, en comparación con los que estuvieron en completa oscuridad. De las

19 cepas de *L. lecanii* evaluadas se seleccionó como posibles ACB Los aislados EH-348 (2) y 459 por su respuesta ante un inductor de la actividad quitinolítica, contar con un comportamiento estable, mayor producción de quitinasas totales, tolerancia y crecimiento bajo los factores abióticos limitantes.

4. JUSTIFICACIÓN

La roya (*Hemileia vastatrix*) es una de las enfermedades que causa mayores pérdidas en el rendimiento del cultivo de café, a pesar de la lucha permanente para combatirla, su impacto parece aumentar antes que disminuir. Para el control del fitopatógeno se han considerado diferentes estrategias, como control químico, resistencia genética, control cultural, control biológico y el manejo integrado. El control químico ha sido eficaz para el manejo de la roya; sin embargo, la contaminación del ambiente, así como el alto costo de su aplicación y el riesgo de desarrollo de resistencia, hacen que no se considere como la solución ideal al problema, principalmente para la producción de café orgánico, que en México es de gran importancia al ser uno de los principales productores. Por lo cual, el control biológico, ha surgido como una medida que puede ser compatible con la producción orgánica del café sin los efectos dañinos que genera el control químico al medio ambiente y a los consumidores. En los últimos años, diversos estudios han destacado el empleo del hongo *Metarhizium anisopliae* como biopesticida en el control biológico de diversas enfermedades que atacan plantas; sin embargo, es importante identificar si la cepa es capaz de alterar la integridad de *H. vastatrix*, lo que puede contribuir a la generación de un biopesticida con mayor efectividad contra la plaga.

5. OBJETIVOS

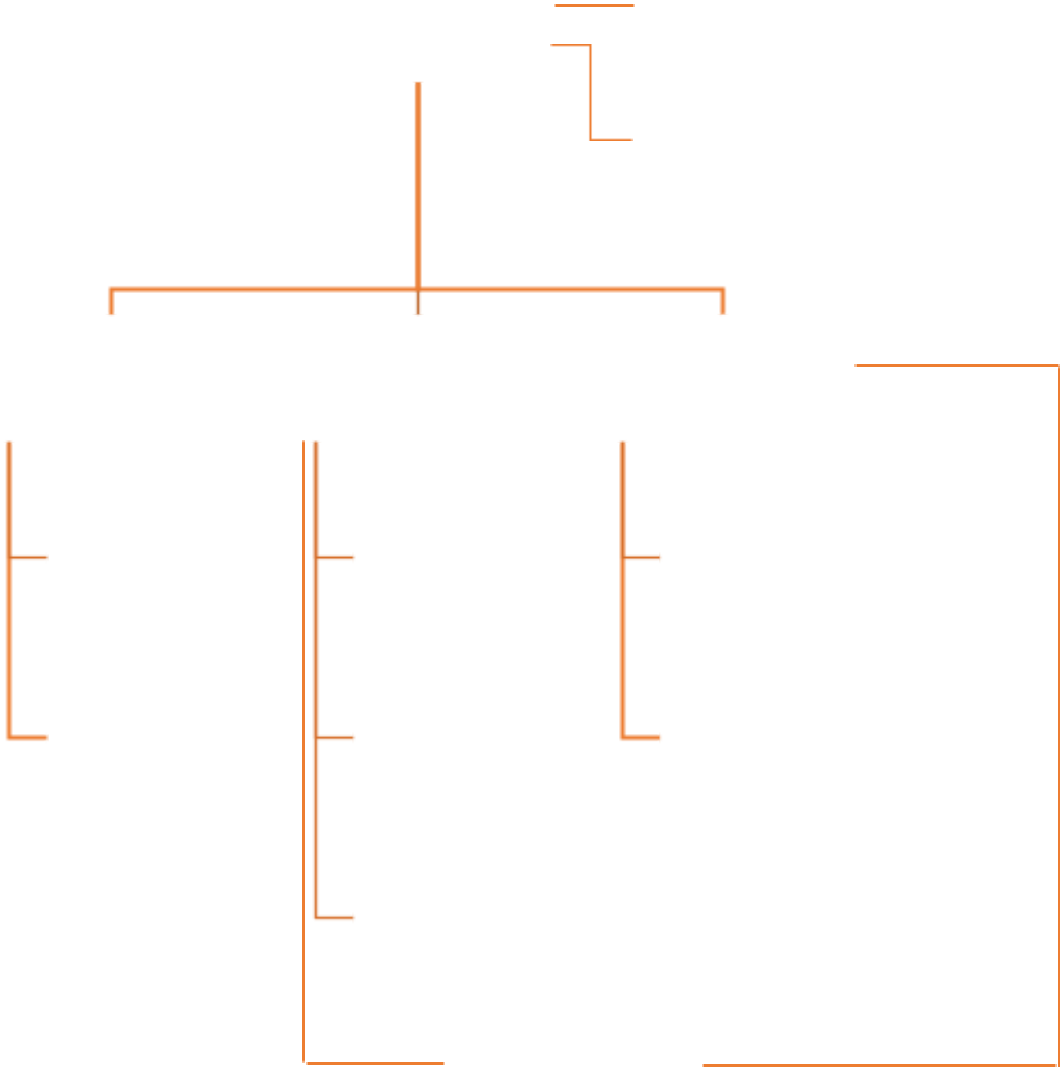
5.1 Objetivo general

- Evaluación *in vitro* de *Metarhizium anisopliae* como control biológico sobre *Hemileia vastatrix* agente causal de la roya del café.

5.2 Objetivos específicos

- I. Aislar e identificar macroscópicamente y microscópicamente a *Metarhizium anisopliae*.
- II. Identificar genéticamente a *Metarhizium anisopliae*.
- III. Evaluar el crecimiento micelial de la cepa bajo factores abióticos limitantes como temperatura, pH y fotoperiodo de *Metarhizium anisopliae*.
- IV. Determinar la capacidad parasitaria *in vitro* de la cepa de *Metarhizium anisopliae* sobre la germinación de las uredosporas de *Hemileia vastatrix*.

6. DIAGRAMA DE TRABAJO



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material de vidrio y reactivos

- Material de vidrio y reactivos de grado analítico necesarios para cada determinación.

7.2 Material biológico

- La cepa de *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea* fue proporcionada por el cepario del laboratorio de Micología del Departamento “El Hombre y su Ambiente” de la UAM Xochimilco, referenciadas del cepario del laboratorio de Micología Básica de la facultad de Medicina de la UNAM.
- Uredosporas de *Hemileia vastatrix* recolectadas en el municipio de Coatepec, Veracruz.
- Los bioensayos se realizaron en el edificio Multilaboratorios (EMA 6) de la BUAP y CIBA-Tlaxcala, IPN.

Determinación	Método	Referencia
Conteo de conidios y esporas	Microscopía óptica	Cañedo y Ames, 2004; Mier <i>et al.</i> , 2013.
Capacidad parasítica	Microscopía óptica	Mahfud, <i>et al.</i> 2006
pH	Potenciómetro	Miranda, 2017
Temperatura	Termotolerancia	Miranda, 2017
Fotoperiodo	Fotoperiodo	Miranda, 2017
Identificación genética	Extracción de ADN y PCR	Suárez, 2016

Tabla 2. Determinaciones y métodos a utilizar

Tabla 3. Equipo a utilizar

Equipo	Marca	Modelo
Autoclave	Witeg	MaXterile60
Incubadora	Witeg	WOF-50/-105/-155
Incubadora con agitador	Witeg	ThermoStable IS-20R
Campana de flujo laminar	Witeg	WLC-VI200
Balanza		WBA-220
Refrigerador	Witeg	ThermoStable-LR600
Campana de extracción	Witeg	DS-DG03-1500
Microscopio	Motic	RED230
Parrilla eléctrica	VELP SCIENTIFICA	F20500011
Potenciómetro	ScienceMED	SM-25CW
Termociclador	Major science	CYCLER-25
Cámara de electroforesis	Frey scientific	1267

8. METODOLOGÍA

8.1 Obtención del material biológico

La cepa de *Metarhizium anisopliae* fue activada a 28°C durante tres días, posteriormente fue resembrada en agar papa dextrosa (PDA) por transferencia de trozos de colonias, se realizó un microcultivo para asegurar que las características del hongo correspondían a la especie *Metarhizium anisopliae*. Las uredosporas de *H. vastatrix* fueron recolectadas de un cafetal en el municipio de Coatepec, Veracruz. Las hojas de las plantas de café se cortaron a la altura del peciolo, se seleccionaron las que presenten mayor cantidad de uredosporas, posteriormente se colocaron entre hojas de papel para evitar la humedad excesiva hasta su traslado al laboratorio. Una vez en el laboratorio las uredosporas fueron retiradas de las hojas de café con ayuda de un pincel y una espátula estériles, se almacenaron en un frasco de vidrio con tapa hermética protegiéndolas de la luz, la morfología de las uredosporas se observó a 40x. Por último, la cepa de *I. fumosorosea* fue activada de 4°C a temperatura ambiente.

8.2 Identificación genética de *Metarhizium anisopliae*

8.2.1 Condiciones generales para la identificación genética de *M. anisopliae*

Las esporas de *Metarhizium anisopliae* fueron cultivadas en medio de cultivo líquido YPG (Tabla 4) a 28°C y a 100 RPM. Las células miceliales se cultivaron durante tres días, se filtraron empleando un embudo Büchner con papel filtro, agregando agua grado biología molecular para eliminar restos del medio de cultivo. El ADN fue extraído y purificado usando un kit de extracción ZYMO RESEARCH®; los productos fueron visualizados y cuantificados mediante electroforesis. Una región del ADN de cepas de *Metarhizium anisopliae* contiene la secuencia ITS1-5.8s-ITS2, la cual fue amplificada por PCR usando los primers LV1 (5'-cctgccagtagtcatatgcttgct'5) y LV2 (5'-cacctacggaaacctgttacgact-3')

(Suárez, 2015). Los protocolos para cada determinación se mencionan a continuación:

Tabla 4. Preparación de medio de cultivo líquido YPG:

Componente	Cantidad
Extracto de levadura	3g
Peptona	10g
Glucosa	20g
Agua desionizada	1000ml
pH ajustar con HCl	Valor de 4.5

8.2.2 Purificación de ADN

De acuerdo al manual del kit de extracción ZYMO RESEARCH® se pesó y adicionó 50-100 mg de células fúngicas (peso mojado) en 200 uL de agua grado biología molecular en un tubo de lisis ZR BashingBead™ (0.1 mm y 0.5 mm), se agregó 750 µL de solución de lisis al tubo, se aseguró el tubo y se mezcló durante 5 min, se centrifugó el tubo de lisis ZR BashingBead™ a 10,000 g por 1 min, se transfirió 400µL del sobrenadante al Zymo-Spin™ IV Spin filter (Orange Top) en un tubo colector y centrifugó a 7,000 g por 1 min, se agregó 1,200 µL de Fungal/Bacterial DNA BindingBuffer a lo filtrado en el tubo de colección, se transfirieron 800 µL de la mezcla a la columna Zymo-Spin™ IIC en un tubo colector y centrifugó a 10,000 g por 1 minuto, se descartó el flujo contenido en el tubo de colección y se centrifugó otra vez, se agregaron 200 µL de DNA Pre-Wash Buffer a la columna Zymo-Spin™ IIC en un nuevo tubo colector y centrifugó a 10,000 g por 1 minuto, se agregaron 500 µL de Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer a la columna Zymo-Spin™ IIC y centrifugó a 10,000 g por 1 minuto, se transfirió la columna Zymo-Spin™ IIC a un microtubo de 1.5 ml y se agregaron 35 µL de DNA Elution Buffer directo a la matriz de la columna, por último se

centrifugó a 10,000 g por 30 segundos para eluir el ADN, obteniendo así el ADN ultrapuro.

8.2.3 Electroforesis

Para la electroforesis se preparó gel de agarosa al 0.8% con TAE 1X, previamente calentada se añadió 1.5 µL de colorante Midori SyberGreen™ sobre el molde de gel con el peine para pozos correspondiente, dentro de la cámara de electroforesis se agregó buffer de corrido: TAE 1X y posteriormente en el molde de gel de electroforesis se agregó el marcador de bases en el primer pozo y las muestras en el resto de los pozos, se programó el corrimiento a 85 v, durante 30 min, se observó el corrimiento de las bandas y se visualizó en un transiluminador, posteriormente a la observación de bandas se realizó la PCR (Suárez, 2016).

8.2.4 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Para la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó un tubo eppendorf en el que se añadió para 1 reacción 8.8 µL de agua grado biología molecular, 15 µL de DreamTaq Green PCR MasterMix, 0.6 µL de primer LV1, 0.6 µL de primer LV2 y 5 µL de ADN. Se programó el termociclador con las siguientes condiciones:

Tabla 5. Condiciones del termociclador

Fases	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	95°C	5 min
Segunda desnaturalización	95°C	1 min
Alineamiento	55°C	1 min
Extensión	72°C	1 min
Segunda extensión	72°C	12 min

Por último, se realizó electroforesis para observar el rendimiento de los productos.

Una vez obtenidos los productos de ADN, se enviaron a un laboratorio especializado para la identificación mediante secuenciación de la especie *Metarhizium anisopliae*.

Los resultados de la secuenciación se compararon con la base de datos de BLAST- NCBI. (Suárez, 2016).

8.3 Evaluación de *Metarhizium anisopliae* bajo factores abióticos

Para la evaluación de termotolerancia, pH y fotoperiodo; se utilizó medio de cultivo PDA y se vertió en cajas de Petri de 60 X 15 mm. La importancia de haber evaluado estos factores reside en que se debe conocer el comportamiento óptimo del aislado frente a las condiciones en las que se desarrolla *H. vastatrix*. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. El análisis estadístico realizado fue ANOVA y una prueba de Tukey con un 95% de confiabilidad para determinar si existió alguna diferencia significativa

8.3.1 Condiciones de cultivo para Termotolerancia

Los cultivos se incubaron a 15, 25, 30 y 35 °C durante 13 días, la cepa fue evaluada por triplicado. El crecimiento de las colonias se midió diariamente y al final del periodo de incubación se calculó la tasa de crecimiento (diámetro promedio final entre 13 días: mm/día) (Ayala-Zermeño *et al.* 2005).

8.3.2 Condiciones de cultivo para pH

Debido a que se ha reportado el suelo de cafetales de Veracruz con pH que va de 4.7 a 5.0 (Escamilla *et al.* 2005), se estudió el crecimiento micelial de las colonias durante 13 días a 4, 5, 6 y 7 en valores de pH a 26 °C, cada cepa fue evaluada por triplicado. El crecimiento de las colonias se midió diariamente y se calculó la tasa de crecimiento (diámetro promedio final entre 13 días: mm/día).

8.3.3 Condiciones de cultivo para fotoperiodo

Para observar el crecimiento de las cepas en luz y oscuridad se colocaron cultivos con fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad durante 13 días a 26 °C, cada cepa fue evaluada por triplicado. El crecimiento de las colonias se midió diariamente y al final del periodo de incubación se calculó la tasa de crecimiento (diámetro promedio final entre 13 días: mm/día), se repitió el mismo proceso en condiciones de oscuridad total.

8.4 Suspensiones de uredosporas de *Hemileia vastatrix* y conidios de *Metarhizium anisopliae*

Como control del porcentaje de germinación de *H. vastatrix* se realizó una suspensión de uredosporas de 1×10^5 uredosporas/mL. El conteo de uredosporas se realizó con ayuda de la cámara de Neubauer (Cañedo y Ames, 2004). La suspensión se realizó en una solución estéril de Tween 80 al 0.05%, con una pipeta Pasteur se llenó la cámara de Neubauer con la suspensión de esporas.

Como control se realizaron suspensiones de las *M. anisopliae* de 1×10^6 conidios/ml (Mahfud *et al.*, 2006). El conteo de conidios se realizó con ayuda de la cámara de Neubauer (Cañedo y Ames, 2004). Para preparar la suspensión de conidios se realizó una mezcla de estos en una solución estéril de Tween 80 al 0.05%, con una pipeta Pasteur se llenó la cámara de Neubauer con la suspensión de conidios. Se contaron las uredosporas y los conidios de las diferentes suspensiones presentes en los cuadrantes elegidos en un microscopio óptico. Se realizó la determinación del número de uredosporas y de conidios por ml utilizando la siguiente fórmula: Uredosporas o conidios/ml = # de uredosporas o conidios contados $\times 5 \times 10^4$ \times factor de dilución.

8.4.1 Suspensión de conidios de *Metarhizium anisopliae* con uredosporas de *Hemileia vastatrix*

Se incorporaron 10 mg de uredosporas en polvo de *H. vastatrix* a la suspensión de conidios (1×10^6 conidios/mL) de *M. anisopliae* se incubó en oscuridad a temperatura ambiente. El porcentaje de germinación de la mezcla de uredosporas de *H. vastatrix* y conidios de *M. anisopliae* se evaluó según el método descrito por Monzón (1997) y Parés *et al.* (2006). La evaluación se realizó a las 6, 24 y 48 horas de incubación y se comparó con el control (uredosporas o conidios en solución estéril de Tween 80 al 0.05% según la determinación). Para evaluar el porcentaje de germinación, con una pipeta Pasteur se tomó una alícuota de la

mezcla a las 6 horas de incubación y se colocó sobre un portaobjeto ubicado dentro de una caja Petri, las uredosporas y los conidios germinados y no germinados se observaron a través del microscopio óptico y los porcentajes de germinación se calcularon contando 100 uredosporas y 100 conidios al azar en un determinado campo óptico y utilizando al menos 5 campos ópticos por muestra. El procedimiento se repitió a las 24 y 48 horas, todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

9. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se desconoce el modo de acción específico de *Metarhizium anisopliae* sobre *Hemileia vastatrix*, aunque se tiene una idea general de como infectan este tipo de hongos a otros hongos e insectos, por lo que es importante conocer mejor la capacidad infectiva que pudieran presentar diferentes aislados de *Metarhizium anisopliae* provenientes de distintos hábitats.

9.1 Características morfológicas de *M. anisopliae*, *H. vastatrix* e *I. fumosorosea*

M. anisopliae presentó las características morfológicas correspondientes a la especie de acuerdo con lo descrito por Tanada y Kaya en 1993, en la Figura 7A se puede observar la morfología microscópica: con fiálides cilíndricos en forma de clava, adelgazados en el ápice, conidios cilíndricos y truncados, formados en cadenas muy largas y hialinas. En la Figura 7B, se puede observar la morfología macroscópica: pegada al medio, amorfa, de colores oliváceo, amarillento, verdoso y marrón oscuro.

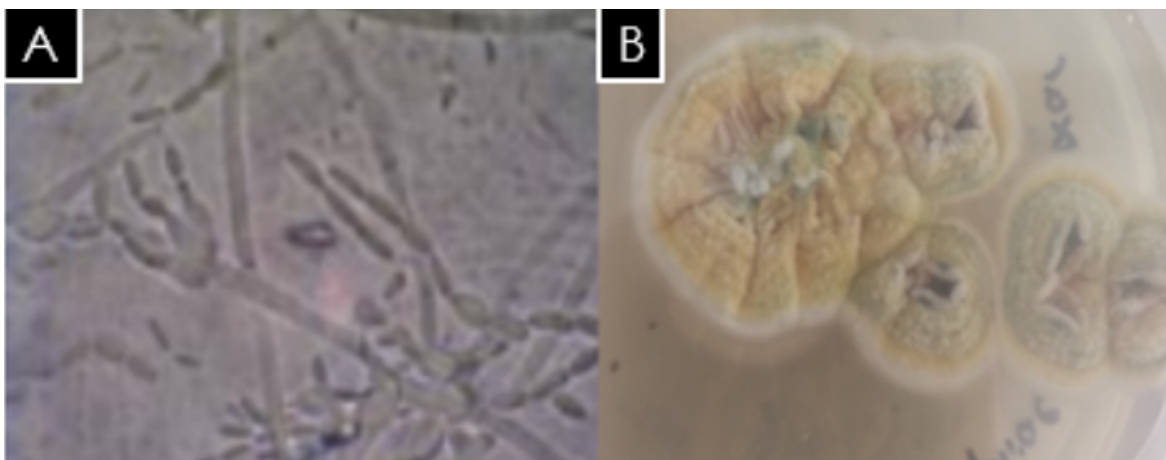


Figura 7. A) Morfología microscópica de *M. anisopliae* a 40x. B) Morfología macroscópica de *M. anisopliae* en PDA.

En relación a la búsqueda y recolección de hojas infectadas con roya, se realizó en un cafetal del municipio de Coatepec, Veracruz, donde se identificaron a las

plantas afectadas y se recolectaron las hojas con las características que se observan en la figura 8 (A), las cuales mostraban crecimiento de *H. vastatrix* en el envés de la hoja con aspecto amarillo-naranja, se excluyeron los árboles con severa defoliación debido a la escasez de hojas (Figura 8B). Se obtuvieron 1.1636 g de uredosporas de *H. vastatrix* de las hojas infectadas de los cafetos que presentaron mayor severidad en sus lesiones (Figura 8C). Una vez seleccionadas las hojas con mayor daño se colectaron las uredosporas (Figura 8D) y se observaron al microscopio (Figura 8E), dichas uredosporas presentaron microscópicamente morfología reniforme, lisas en la cara interna y rugosas en la externa (Figura 9)

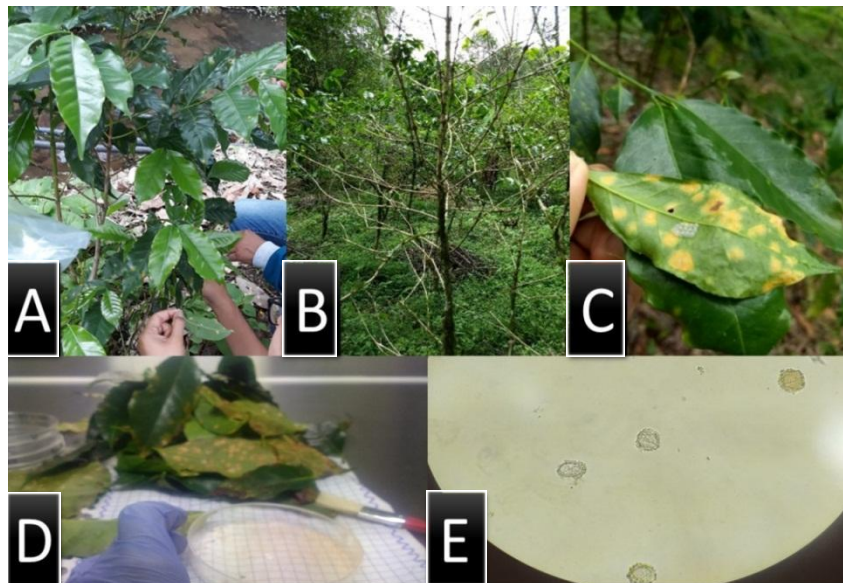


Figura 8. Recolección de uredosporas de *H. vastatrix*. (A) Recolección de hojas con lesiones de *Hemileia vastatrix*; (B) Árbol de cafeto defoliación a causa de la roya del café; (C) Hoja de café cubierta con uredosporas de *H. vastatrix*; (D) Recolección de uredosporas en el laboratorio y (E) Uredosporas de *H. vastatrix* a 40x.





Figura 9. Morfología de las uredosporas de *Hemileia vastatrix* observadas a 40x.

Figura 10. Cepa de *I. fumosorosea*

9.2 Identificación genética

Dado que las características macroscópicas y microscópicas presentan similitud con otros hongos, era necesario realizar la identificación genética de esta especie para su confirmación. En las figuras 11 y 12 se observan los geles obtenidos por electroforesis los cuales muestran bandas de ADN genómico y productos de PCR con aproximadamente 740 pb de acuerdo al marcador de bases. El producto de PCR se mandó a un laboratorio de secuenciación genética y posteriormente los resultados de secuenciación se analizaron con el software Chromas que se muestra en la Figura 13. Las secuencias se compararon con la base de datos BLAST-NCBI el cual muestra un porcentaje de coincidencia del 99% con la cepa *Metarhizium anisopliae* (Figura 14).

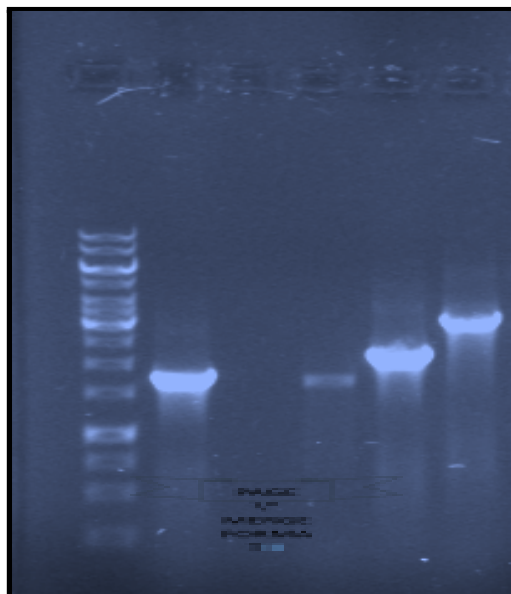


Figura 11. Amplificación de las regiones ITS. Línea 1: Marcador de bases, 2: Control positivo, 3: Control negativo, 4: *Moniliophthora roreri*, 5: *Metarhizium anisopliae*, 6: Hongo rojo (No identificado).

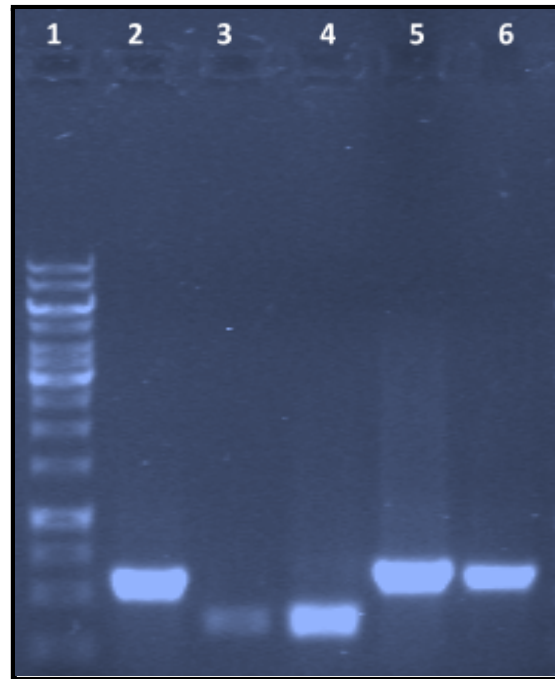


Figura 12. Productos amplificados de PCR empleando los primers LV1 (5'-cctgccagtagtcatatgcttct'5) y LV2 (5'-cacctacggaaacctgttacgact-3') Línea 1: Marcador de bases, 2: Control positivo, 3: *Moniliophthora roreri*, 4: *Moniliophthora roreri*, 5: *Metarhizium anisopliae*, 6: Hongo rojo (No identificado).

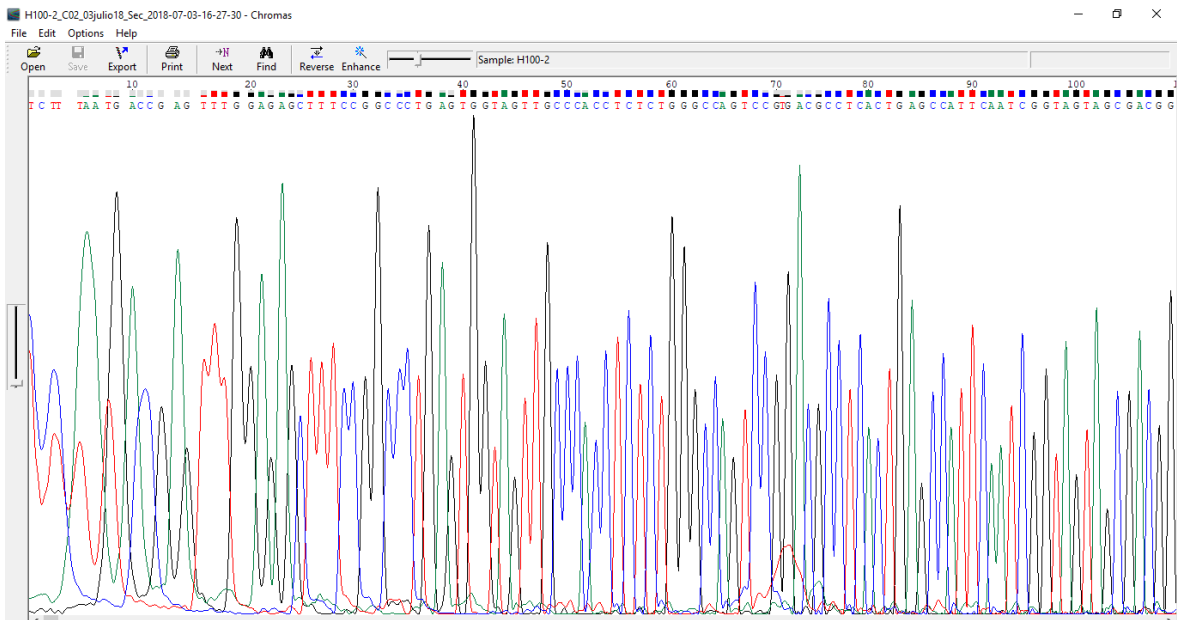


Figura 13. Análisis en Chromas de la secuencia obtenida.

Download v GenBank Graphics Sort by: E value

Metarhizium anisopliae strain 40B1ii 18S

Sequence ID: gij255709244|FJ609314.1 Length: 2291 Number of Matches: 2

Range 1: 1131 to 1703 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1023 bits(1134)	0.0	572/574(99%)	1/574(0%)	Plus/Minus

Query 6 AATGACCGAGTTTGGAGAGCTTTCGGCCCTGAGTGGTAGTTGCCACCTCTCTGGGCCA 65
 Sbjct 1703 AATGACCGAGTTTGGAGAGCTTTCGGCCCTGAGTGGTAGTTGCCACCTCTCTGGGCCA 1644

Query 66 GTCCGTGACGCCCTCACTGAGCCATTCAATCGGTAGTAGCGACGGGCGGTGTGTACAAAGG 125
 Sbjct 1643 GTCCG-GACGCCTCACTGAGCCATTCAATCGGTAGTAGCGACGGGCGGTGTGTACAAAGG 1585

Query 126 GCAGGGACGTAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCCTTACTAGGGATTCCCTCGTTGAAGA 185
 Sbjct 1584 GCAGGGACGTAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCCTTACTAGGAATTCCCTCGTTGAAGA 1525

Query 186 GCAATAATTGCAATGCTCTATCCCCAGCAGCAGGAGTTTAAACAAGATTACCCGGGCCCTT 245
 Sbjct 1524 GCAATAATTGCAATGCTCTATCCCCAGCAGCAGGAGTTTAAACAAGATTACCCGGGCCCTT 1465

Query 246 CCGGCCAAGGGAGTACTCGCTGGCTCCGTCAAGTGTAGCGCGCTGCGGCCAGAACATCT 305
 Sbjct 1464 CCGGCCAAGGGAGTACTCGCTGGCTCCGTCAAGTGTAGCGCGCTGCGGCCAGAACATCT 1405

Query 306 AAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTCAAACCTCCATCGGCTTGAGCCGATAGTCCCTC 365
 Sbjct 1404 AAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTCAAACCTCCATCGGCTTGAGCCGATAGTCCCTC 1345

Query 366 TAAGAAGCCCGCATACTGCCATAGCAATACTGACTATTTAGCAGGTTAAGGTCCTCGTTTCG 425
 Sbjct 1344 TAAGAAGCCCGCATACTGCCATAGCAATACTGACTATTTAGCAGGTTAAGGTCCTCGTTTCG 1285

Query 426 TTATCGCAATTAAGCAGACAAATCACTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACCACCACCC 485
 Sbjct 1284 TTATCGCAATTAAGCAGACAAATCACTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACCACCACCC 1225

Query 486 ACAAAATCAAGAAAGAGCTCTCAATCTGTCAATCCTCATTGTCTGGACCTGGTGAGTT 545
 Sbjct 1224 ACAAAATCAAGAAAGAGCTCTCAATCTGTCAATCCTCATTGTCTGGACCTGGTGAGTT 1165

Query 546 TCCCCGTGTTGAGTCAAATTAAGCCGACGGCTCC 579
 Sbjct 1164 TCCCCGTGTTGAGTCAAATTAAGCCGACGGCTCC 1131

Figura 14. Comparación de la secuencia obtenida con la base de datos de BLAST-NCBI, el círculo rojo señala el 99% de coincidencia.

9.3 Evaluación de la cepa de *M. anisopliae* bajo factores abióticos

Los factores ambientales cumplen una función esencial en la iniciación y desarrollo o en la prevención y supresión de las diferentes plagas y enfermedades que atacan los cultivos. Forman un complejo de factores que interactúan entre sí y entre otros componentes del ambiente, siendo los más estudiados la temperatura, pH y fotoperiodo. El mayor problema es que pocos estudios se refieren al microclima del cultivo que es el que directamente influye sobre los patógenos. A diferencia de las condiciones constantes en el laboratorio, en el agroecosistema se presentan situaciones normalmente fluctuantes del conjunto de factores ambientales. Esto explica la complejidad del tema y las múltiples interacciones

posibles como para poder cuantificar, con más precisión, el efecto del microclima natural sobre los entomopatógenos (Lecuona, 1996). El uso de hongos como agentes de control biológico es influenciado por una serie de factores bióticos y abióticos que afectan su habilidad para sobrevivir, propagarse, infectar y matar a sus hospederos (Inglis y Goettel, 2007). Entre los factores abióticos la temperatura, pH y luz solar son limitantes importantes que pueden afectar la eficacia inmediata y persistencia del micoparásito (Jaronski, 2010).

9.3.1 Termotolerancia

La cepa evaluada mostró crecimiento a partir del día(T1) al día 13 (T13) a 15°C y 25 °C. Por otra parte, el cultivo a 30 °C mostró una disminución del crecimiento mientras que la cepa a 35 °C mostró crecimiento entre el día 6 (T6) y el día 13 (T13). En la Tabla 6 se muestra el promedio de crecimiento obtenido a partir de tiempo total de incubación de la cepa, testigo positivo y testigo negativo.

Tabla 6. Promedio de crecimiento micelial de la cepa *M. anisopliae* a 15, 25, 30 y 35 °C.

Cepa	15 °C	25°C	30°C	35°C
<i>Isaria</i>				
<i>Fumosorosea</i>	4.367 ± 1.295	4.365 ± 1.294	4.033 ± 0.902	4.033 ± 0.902
IF				
<i>M. anisopliae</i>	4.333 ± 0.333	3.933 ± 0.302	2.433 ± 0.187	0.366 ± 0.028

Se realizó un ANOVA con los resultados del crecimiento a distintas temperaturas de *M. anisopliae*, los resultados se muestran en la Tabla 9 (Anexos). La prueba de Tukey confirma la desigualdad entre el crecimiento de *M. anisopliae* a 15, 25 30°C, mientras que 35°C muestra disparidad con el testigo IF, ya que éste no mostró crecimiento micelial.

Durante la evaluación de crecimiento micelial a distintas temperaturas, se observó el mayor desarrollo a 25 °C, seguida de 15 °C. Las muestras cultivadas a 30 y 35

°C mostraron bajo y nulo desarrollo. Los resultados permiten identificar a la cepa como mesofílica, ya que el crecimiento se encontró entre los 15 y 25 °C (Castillo,2006).

Es de suma importancia evaluar la temperatura a la que pueden desarrollarse distintas cepas como parte de un protocolo de control para los organismos que pueden ser liberados en campo (Luz y Fargues, 1997).

9.3.2 pH

El mayor crecimiento micelial se registró a pH 7 (Tabla 7). El promedio de crecimiento se obtuvo a partir de tiempo total de incubación de las cuatro cepas, testigo positivo y testigo negativo.

Tabla 7. Promedio de crecimiento micelial de *M. anisopliae* a pH 4, 5, 6 y 7.

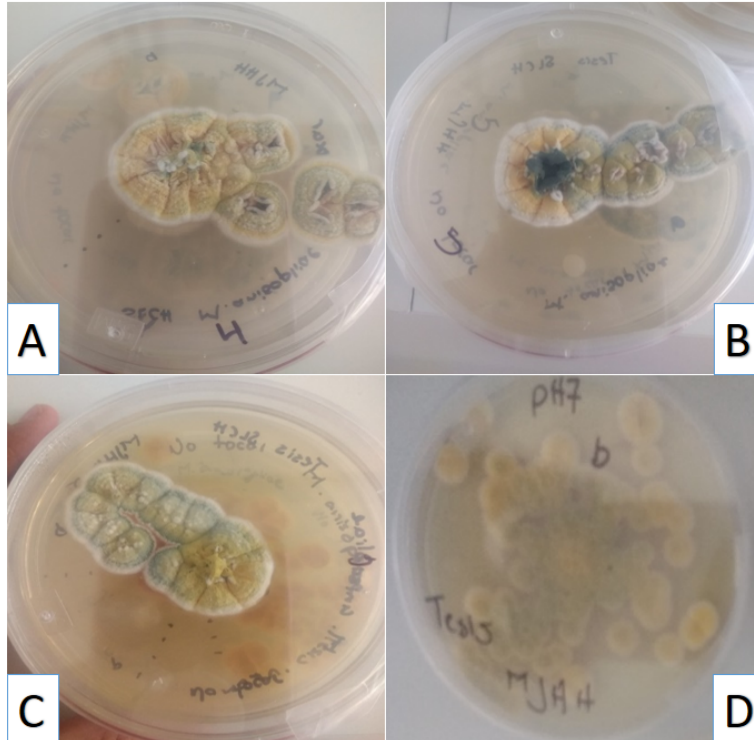
Cepa	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
<i>Isaria fumosorosea</i> IF	2.5 ± 0.192	2.633 ± 0.202	2.466 ± 0.189	2.466 ± 0.189
<i>M. anisopliae</i>	3.433 ± 0.264	3.533 ± 0.271	2.266 ± 0.174	3.700 ± 0.284

Se realizó un ANOVA con los resultados del crecimiento a pH 4, 5, 6 y 7 de la cepa *M. anisopliae* (Tabla 10). La prueba de Tukey para diferencia entre medias, confirma la desigualdad en el crecimiento de *M. anisopliae* a pH 4, 5, 6 y 7.

La microbiota del suelo es altamente influenciada por el pH (Klingen y Haukeland, 2006). En general, una alta acidez detiene el crecimiento de bacterias e incrementa el desarrollo de hongos (Zimmermann, 1989). Es por ello que el pH es un factor decisivo para el establecimiento de *M. anisopliae*. Se observó durante la mayor tasa de crecimiento a pH 7, seguido de pH 5, pH 4 y presentándose una disminución a pH 6. Las cepas no presentaron una diferencia significativa en el crecimiento con respecto al pH después de 13 días en incubación, excepto las

cepas en pH
redujo

6, donde se



significativamente el crecimiento. En la Figura 15 se pueden observar los cambios que presentó *M. anisopliae* a diferentes valores de pH, por ejemplo, cambio de color de las colonias y crecimiento acelerado en pH 7.



Figura 15. Cultivos de *M. anisopliae* a diferentes valores de pH; (A) pH 4, (B) pH 5, (C) pH 6 y (D) pH 7.

9.3.3 Fotoperiodo

La evaluación de fotoperiodo sometiendo a *M. anisopliae* a 12 horas luz, 12 horas oscuridad mostró un crecimiento menor en los aislados en comparación a los cultivos que se mantuvieron 24 h en oscuridad (Tabla 8). El promedio de crecimiento se obtuvo a partir de tiempo total de incubación de las cuatro cepas, testigo positivo y testigo negativo.

Tabla 8. Promedio de crecimiento micelial de *M. anisopliae* a fotoperiodo 12:12 y oscuridad total.

Cepa	Fotoperiodo 12:12	24 h
<i>Isaria Fumosorosea</i> IF	3.099 ± 0.238	3.599 ± 0.276
<i>M. anisopliae</i>	2.133 ± 0.164	2.333 ± 0.179

Se realizó un ANOVA con los resultados del crecimiento de *M. anisopliae* a 12:12 y 24 h oscuridad prueba de Tukey entre medias hay diferencia entre de las cepas a h de oscuridad. En podemos observar de *M. anisopliae*



(Tabla 11). La para diferencia muestra que si el crecimiento 12:12 h. y a 24 la Figura 16 el crecimiento sometido a

12:12 h de fotoperiodo, podemos ver que las colonias se tornaron de color verde olivo. La reducción en el crecimiento micelial observado en la prueba de fotoperiodo 12:12 h es bajo pero existe una diferencia notoria entre la cepa que se mantuvo a completa oscuridad. Le Grand y Cliquet (2013), evaluaron el efecto de la exposición UV en la germinación y tolerancia de hongos entomopatógenos incubados de 7 a 14 días a 25 °C, La radiación tuvo un efecto de disminución en

la tasa de germinación en comparación a cultivos no irradiados. La radiación ultravioleta proveniente de la luz solar es probablemente el factor ambiental más perjudicial que afecta la viabilidad de hongos usados para el control biológico. La mayoría de los ACB fúngicos son sensibles a la radiación UV. Sin embargo, existe una alta variabilidad intra e interespecie en la susceptibilidad a la radiación ultravioleta (Fernandes et al. 2015).

Figura 16. *M. anisopliae* sometido a 12:12 h (Luz/oscuridad)

9.4 Evaluación del porcentaje de germinación de conidios y uredosporas

Para realizar los ensayos de interacción entre *M. anisopliae* y *H. vastatrix*; se prepararon suspensiones de *H. vastatrix* con una concentración de 1×10^5 uredosporas/ml, para lo cual fueron necesarios 10 mg de uredosporas de acuerdo con Mahfud et al., (2006), quienes obtuvieron una concentración de 1.6×10^5 uredosporas/ml. Las suspensiones de *M. anisopliae* se realizaron a una concentración de 1×10^6 conidios/ml de acuerdo a reportes que demuestran que la inhibición de la germinación de *H. vastatrix* es más efectiva a esta concentración (Mahfud et al., 2006; Canjura-Saravia et al., 2002). La interacción *H. vastatrix*-*M. anisopliae* se logró identificar a nivel microscópico mediante la penetración del tubo germinal de *M. anisopliae* a las uredosporas a partir de las 48 horas de incubación, lo cual muestra que *M. anisopliae* es capaz de desarrollar mecanismos de invasión para disminuir el porcentaje de germinación de uredosporas mediante lesiones de la pared celular de *H. vastatrix*, lo que puede contribuir a la reducción de su viabilidad (Ferreira y Boley, 1991) (Figura 17).

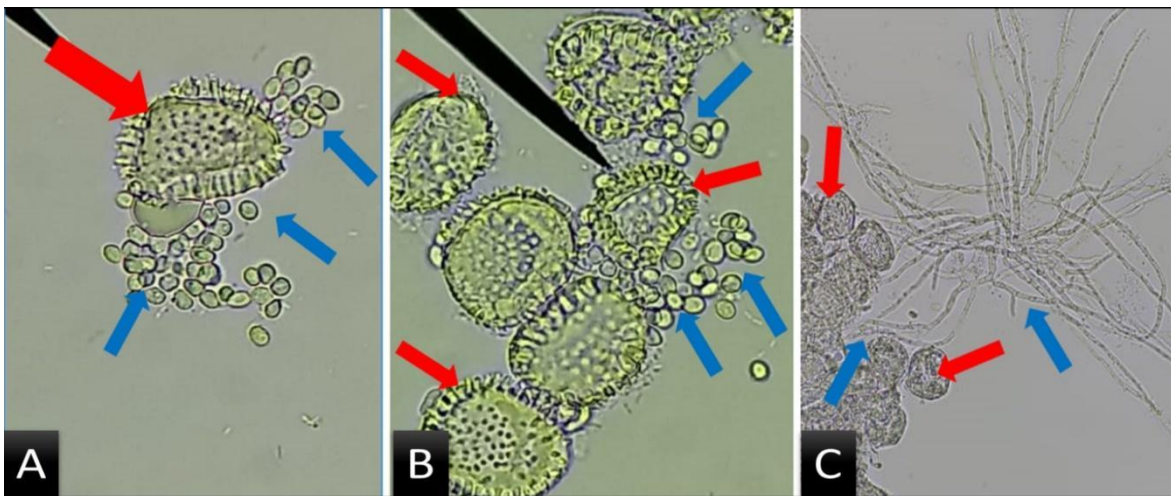


Figura 17. Interacción entre *M. anisopliae* y *H. vastatrix*. (A) Conidios de *M. anisopliae* penetrando las uredosporas de *H. vastatrix* a las 24 horas observados a 40x; (B) conidios rodeando las uredosporas a las 24 horas observados a 40x y (C) lesiones y pérdida de viabilidad de las uredosporas de *H. vastatrix* a las 48 horas observados a 40x. Los conidios se señalan con flechas azules, mientras que las uredosporas con flechas rojas.

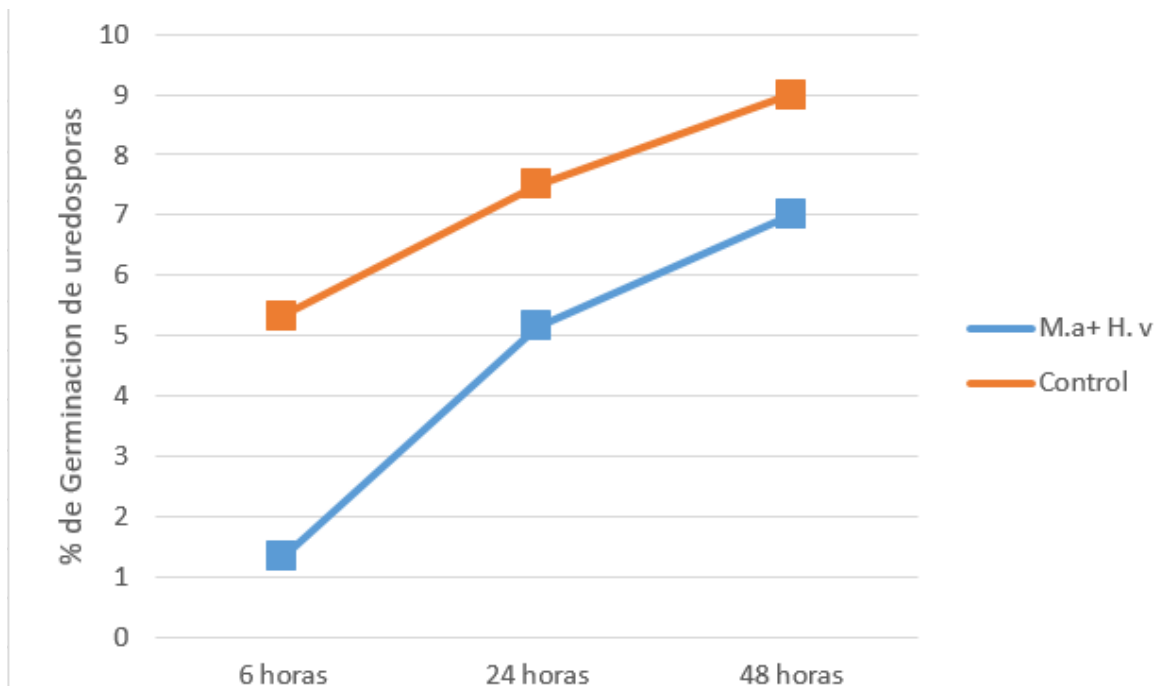


Figura 18. Porcentaje de germinación de uredosporas de *Hemileia vastatrix* a las 6, 24 y 48 horas de incubación.

De acuerdo a la Figura 18 se observa la germinación de uredosporas de *H. vastatrix* con respecto al control. El aumento en la germinación de las uredosporas se dio a las 48 horas al igual que el porcentaje mayor de germinación de conidios. *M. anisopliae* desarrolló el tubo germinativo hasta las 48 horas, a pesar de que hubo un aumento en el porcentaje de uredosporas germinadas, la presencia del tubo germinativo nos indica que *M. anisopliae* presentó capacidad parasítica significativa contra *H. vastatrix*.

En la figura 19 se muestra el porcentaje de germinación de conidios de *M. anisopliae*, se observa un pico a las 48 horas, siendo en este tiempo el mayor porcentaje de germinación de conidios.

Estos resultados indican que *M. anisopliae* tiene capacidad para desarrollar el tubo germinativo, el cual es una estructura de gran importancia mediante la cual se inicia el proceso de invasión a la uredospora a través de la ruptura de la pared celular, por lo tanto es importante identificar a las cepas con mayor porcentaje de germinación para asegurar la invasión de un mayor número de uredosporas y de

este modo lograr seleccionar a la cepa más adecuada para el control específico de *H. vastatrix* (Mafud, 2006).

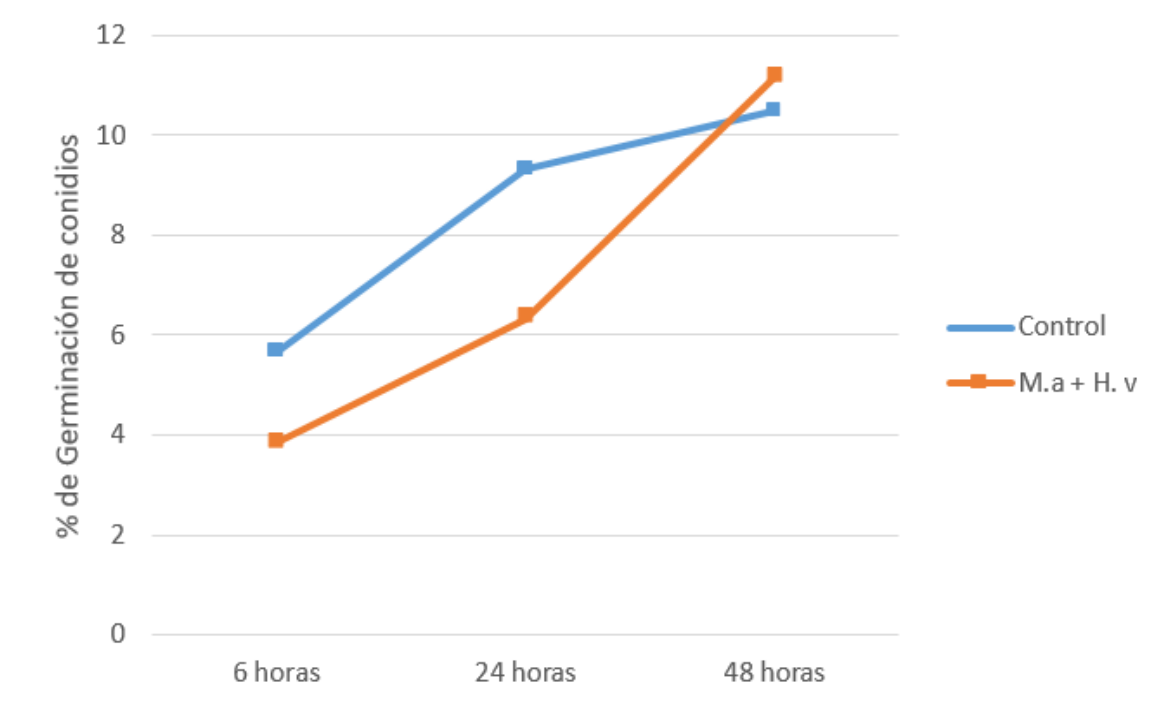


Figura 19. Porcentaje de germinación de conidios de *M. anisopliae* a las 6, 24 y 48 horas de incubación.

Se desconoce mucho sobre los mecanismos desarrollados por los hongos fitopatogenos biotróficos sin embargo, se ha descrito que son capaces de secretar una serie de proteínas que pueden participar en el proceso infectivo de la planta, como la proteína Avr4 la cual es producida por el patógeno fúngico biotrófico *Cladosporium fulvum*, la cual pertenece a un conjunto de efectores, Avr4 es una lectina de unión a quitina con afinidad a los oligómeros de quitina de tres residuos de N-acetil glucosamina, ésta proteína se puede unir a la quitina presente en la pared celular del hongo confiriéndole protección en contra de la acción de quitinasas exogenas (Van den Burg, 2006) por lo tanto se debe desarrollar un método para cuantificar la producción de quitina en *M. anisopliae*. La inactivación de *H. vastatrix* puede deberse al efecto de las quitinasas del micoparásito que afectan la pared celular de las uredosporas, comprometiendo su estructura e impidiendo la germinación. Mahfud et al. (2006), realizaron un estudio *in vitro* para

evidenciar el parasitismo de *V. psalliotae* sobre *H. Vastatrix*. La germinación de uredosporas se redujo significativamente en todos los intervalos de incubación en la presencia del hiperparásito en agua estéril, observándose un aumento en la germinación de *V. psalliotae* en presencia de *H. vastatrix*. El hongo roya actúa como un inductor de la actividad quitinolítica de los hongos entomopatógenos, de esta forma el micoparásito inicia con la degradación de la pared celular para después iniciar la penetración en las uredosporas y obtener los nutrientes que requiere, así se ve afectada la germinación de *Hemileia vastatrix* (Kushalappa y Eskes, 1989).

Se ha descrito para otros entomopatógenos que los conidios pueden tener una pequeña cantidad de enzima, la cual al reconocer el sustrato, detona su producción en cantidades considerables con el fin de que se lleve a cabo la penetración en el hospedante (Nguyen et al., 2015).

Debido a que *H. vastatrix* es un hongo fitopatógeno que ha evolucionado efectivamente para adaptarse a las condiciones del medio y lograr invadir a su hospedero, ha desarrollado mecanismos de patogenicidad que le permiten superar múltiples obstáculos que se presentan durante la patogénesis, como pueden ser la respuesta de defensa de la propia planta hospedera, así como la presencia del hongo entomopatógeno *M. anisopliae*.

10. CONCLUSIONES

Se realizó la caracterización macroscópica, microscópica así como la identificación genética que corresponde a *M. anisopliae*

M. anisopliae crece a pH 7, con un fotoperiodo 12:12 h y en un rango de temperatura de 15°C a 25 °C.

El hiperparásito *M. anisopliae* a concentración de 1×10^6 conidios/ml mostró que es capaz de disminuir el porcentaje de germinación de *H. vastatrix* en un 81% a temperatura ambiente, en condiciones de oscuridad en todos los intervalos de incubación.

11. SUGERENCIAS

- Evaluar la actividad quitinolítica de *Metarhizium anisopliae* para determinar si este es el mecanismo con el que parasita a hongos e insectos.
- Caracterizar a la raza de *H. vastatrix* que se utilizó en este trabajo.
- Estudiar la posibilidad de desarrollar un biofungicida elaborado a partir de *M. anisopliae*.
- Evaluar la capacidad parasítica de diferentes cepas de *M. anisopliae* en las razas II y IV de *H. vastatrix* que son las más comunes en México.
- Evaluar diferentes cepas de *M. anisopliae* de diferentes hábitats para determinar cuál es la que tiene mejor efectividad contra *H. vastatrix*.
- Continuar con los estudios *in vivo* de las cepas seleccionadas que permitan evaluar el trabajo a nivel invernadero y posteriormente a campo.

12. BIBLIOGRAFÍA

- APS. 2011. The American Phytopathological Society. Coffee rust (*Hemileia vastatrix*). Disponible en: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/CoffeeRust.aspx>
- Asociación Mexicana de la Cadena Productiva del Café (AMECAFE). 2012. Padrón Nacional de Cafetaleros. Plan Integral de Promoción del Café de México. Disponible en: <http://amecafe.org.mx/backup/pcm2012.pdf>
- Asociación Nacional del Café (Anacafé). 2013. La Roya del Café es una enfermedad temible, pero puede controlarse. Disponible en: http://www.anacafe.org/glifos/index.php/Recomendaciones_Control_Roya
- Avelino, J., Rivas, G. 2013. La roya anaranjada del cafeto. Disponible en: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01071036>
- Ayala, Z., Mier, T., Sánchez, J., Toriello, C. 2005. Variabilidad intraespecífica del crecimiento de *Lecanicillium lecanii* (*Verticillium lecanii*) por efecto de la temperatura. Revista Mexicana de Micología. 20: 93-97 p.
- Barquero, M. 2013. Recomendaciones para el combate de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.). San José, Costa Rica. Centro de Investigaciones en Café (CICAFE). 3ra ed. 63 p.
- Barranco, J., Alatorre, R., Gutiérrez, M., Viniestra, G., Saucedo, G. 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii*. Enz. Microbiol. Technol. 30 p.
- Barreto, C., Staats, C., Schrank, A., Vainstein, M. 2004. Distribution of Chitinases in the Entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. Curr. Microbiology. 48: 102-107 p.

- Barva, H. 2013. Recomendaciones para el combate de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.). Centro de Investigaciones en Café (CICAFFE). Costa Rica. 73 p.
- Becker, R., S. 1991. El sistema *Coffea* spp y *Hemileia vastatrix*. En La Roya de Cafeto Conocimiento y Control. 1991. Eschborn. 281 p.
- Canjura, S., Sánchez, V., Krauss, U., Somarriba, E. 2002. Reproducción masiva de *Verticillium* sp., hiperparásito de la roya del café, *Hemileia vastatrix*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. 66: 13-19 p.
- Cañedo, V., Ames, T. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 62 p.
- Carballo, M., Guaharay, F. 2004. Control Biológico de Plagas Agrícolas. Serie Técnica Manual Técnico. 53: 15-31 p.
- Castellón, B., J. 1999. Uso de abonos orgánicos y sombra para almácigos de café orgánico. Tesis Mag. Sc. Turriabla, Costa Rica. 69 p.
- Castillo, P., G. 2013. La roya anaranjada del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.) su comportamiento en México (Propuesta para enfrentar un nuevo brote epidemiológico). Asociación Mexicana de la Cadena Productiva del Café. A. C. (AMECAFÉ).
- Castro, F., Charles, E., Barreto, R. 2009. Confirmation of the occurrence of teliospores of *H. vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. Tropical Plant Pathology. 34 (2): 108-113 p.
- Centro de Estudios de las Finanzas Públicas (CEFP). 2001. El mercado de café en México. Palacio Legislativo de San Lázaro. D.F. México. 25 p.
- Cristancho, M., Rozo, Y., Escobar, R., Gaitán, A. 2012. Outbreak of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in Colombia. New Disease Reports. 19 p.

- Escamilla, P., E. 1993. El café Cereza en México. Tecnología de Producción. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 116 p.
- Eskes, A., Mendes, M., Robbs, C. 1991. Laboratory and field studies on parasitism of *Hemileia vastatrix* with *Verticillium lecanii* and *V. leptobactrum*. *Café Cacao Tea XXXV* (4): 275-282 p.
- Fernandes, E., Rangel, D., Barga, G., Roberts, D. 2015. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Current Genetics* 61: 427-440 p.
- Ferreira, S., Boley, R. 1991. *Hemileia vastatrix*. Disponible en: http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/h_vasta.htm.
- Franco, C., Rodríguez, N., Cervantes, M., Barranco, F. 2011. Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. Artículo de revisión. 143-159 p.
- Gómez, R., Rojas, A., Rojas, A., Cruz, C. 2004. Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. *Journal of Microbiological Methods*. 56: 213- 219 p.
- Gonzales, E., Surís, M. 2007. Selección in vitro de aislamientos promisorios de *Lecanicillium lecanii* para la lucha biológica de *Hemileia vastatrix* (berk. et br.). *Revista Protección Vegetal*. 22 (2): 128-130 p.
- Guerrero C., Carrillo L., Aguilera P. 1999. Caracterización morfológica y germinación de cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* asociado a larvas de escarabaideos y curculionidos. *Agrosur (Chile)* 37 (2): 23-34 p.
- Haddar, F., Saraiva, R., Mizubuti, E., Romeiro, R., Maffia, L. 2014. Isolation and selection of *Hemileia vastatrix* antagonists. *EUR J Pant Pathology*. 139: 763-772 p.

- Hajek, A., Leger, R. St. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annual Review of Entomology 39:293-322 p.
- Hall, R., A. 1979. Pathogenicity of *Verticillium lecanii* conidia and blastosporas against the aphid *Macrosiphoniella sanborni*. Entomophaga 24 (2): 191-198 p.
- Inglis, G.D., M.S. Goettel. 2007. Overview of pathogen groups: Fungi. Capítulo IV-4. En: Field manual of techniques in invertebrate pathology. Springer, 2 ed. 852 p.
- Jackson, M., McGuire. M., Lacey, L., Wraight, S. 1997. Liquid culture production of desiccation tolerant blastosporas of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. Mycol. Res. 101: 35-41 p.
- Jaronski, S. 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. BioControl 55: 159-185 p.
- Javed, Z. 1987. Epidemiología y control de la roya del cafeto en Centroamérica. Plagas y enfermedades de carácter epidémico en cultivos frutales de la región centroamericana. CATIE. Serie Técnica. Informe Técnico. 110: 17-26 p.
- Jiménez, C., A. 1997. Aporte de la caficultura al desarrollo de América Latina. En Memorias de XVIII Simposio Latinoamericano de Caficultura. San José. Costa Rica. PROMECAFE. 3-11 p.
- Kaaya, G., Mwangi E., Ouna, E. 1996. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* y *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Journal of invertebrate pathology, 67: 15-20 p.
- Klingen, I., S. Haukeland. 2006. The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. Capítulo 9.

- En: Eilenberg, J., H.M.T. Hokkanen (eds.). An ecological and societal approach to biological control, Springer. 324 p.
- Kushalappa, A. 1989. Biology and Epidemiology. En: Coffee Rust: Epidemiology, Resistance and Management. Ed. Por A.C. Kushalappa y A.B. Eskes. Florida, USA. 16-80 p.
- Laboratorio Nacional De Geoprocamiento de Información Fitosanitaria (LaNGIF). 2013. Roya del cafeto. *Hemileia vastatrix*. Disponible en: <http://langif.uaslp.mx/royacafeto.php>
- Le Grand, M., S. Cliquet. 2013. Impact of culture age on conidial germination, desiccation and UV tolerance of entomopathogenic fungi. Biocontrol Science and Technology. 23: 847-859 p.
- Lecuona, R.E. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Argentina. Talleres gráficos Mariano. 338 p.
- López, A., Chamorro, T., Gallo, C. 1990. Aspectos económicos de la roya del cafeto. En 50 años de CENICAFE. 1938-1988. Conferencias conmemorativas. Chinchin. 91 - 96 p.
- Luz, C., J. Fargues, 1997. Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. Mycopathologia 138: 117-125 p.
- Mahfud, M., Mior, A., Meon, S., Kadir, J. 2006. *In vitro* and *in vivo* tests for parasitism of *Verticillium psalliotae* Treschow on *Hemileia vastatrix* Berk & Br. Malaysian Journal of Microbiology. 2 (1): 46-50 p.
- Miranda, A. E. 2017. Muestreo aerobiológico de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*), y evaluación de cepas de *Lecanicillium lecanii* como control biológico. 65-72 p.
- Montesinos, E. Bonaterra, A. Badosa, E. Francés, J. Alemany, J. Llorente, I. Moragrega, C. 2002. Review Article: Plant-microbe interactions and the new

- biotechnological methods of plant disease control. *Int. Microbiol.* 5: 169-175 p.
- Monzón C., A. 1997. Evaluación de dos aislamientos de *Verticillium sp.* como agente de control biológico de la roya (*H. vastatrix*) del cafeto (*Coffea arabica* L.), en condiciones de invernadero. En: Simposio Latinoamericano de Cafeticultura. (XVIII edición, Costa Rica). Memorias XVIII Simposio Latinoamericano de Cafeticultura. San José, Costa Rica. IICA/PROMECAFE/ICAFFE. Septiembre 1997. 524 p.
- Nguyen, Q., Quyen, D., Nguyen, S., Van Hanh, V. 2015. An extracellular antifungal 264 chitinase from *Lecanicillium lecanii*: purification, properties, and application in biocontrol against 265 plant pathogenic fungi. *Turkish Journal of Biology* 39: 6 -14 p.
- Organización Internacional de Café (OIC). 2013. Estadísticas, disponible en: <http://dev.ico.org/documents/cy2012-13/sc-26c-organic.pdf>
- Organización Internacional de Café (OIC). 2014 Estadísticas, disponible en: <http://www.ico.org/prices/po.htm>
- Parés, M., Basso, C., Jauregui, D., Melendez, L. 2006. Cantidad, viabilidad y germinabilidad de los granos de polen de *Carica papaya* L. *Revista de la Facultad de Agronomía*. [online]. Vol. 23 (2): 172-180 p.
- Ramiro, D., Escoute, J., Petitot, A., Nicole, M., Maluf, M., Fernandez, D. 2009. Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*H. vastatrix* race II) associated with defense responses in resistant and susceptible coffee cultivars. *Plant Pathology Journal*. 58: 944-955 p.
- Reich, P., B. Jeannequin, G. Ridray, J. Lagier. 2003. Climatic factors on entomopathogenic hyphomycetes infection of *Tialeurodes vaporariorum* (*Homoptera: Aleyroidae*) in Mediterranean glasshouse tomato. *Biological control*, 28: 320-331 p.

- Rivillas, O., Serna, G., Cristancho, Gaitán, B. 2011. La roya del Cafeto en Colombia (Impacto manejos y costos del control, resultados de investigación). Centro Nacional de Investigación del Café (Cenicafe) chinina, Cladas, Colombia. 53 p.
- Rocha, P., Viguera, G., Shirai, K. 2011. Production and activities of chitinases and hydrophobins from *Lecanicillium lecanii*. Bioprocess Biosyst Eng. 34: 681-686 p.
- Rojas, A., Cruz, C., Guerrero, M., Rodríguez, V., Ibarra, J., E. 1999. Selection and characterization of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. World Journal Microbiology Biotechnology. 15: 299 – 308 p.
- Rolz, A., De León, F., Paniagua, O. 2013. Evidencia de un antagonismo in vitro de especies de *Trichoderma* contra *Hemileia vastatrix* (roya del café). Centro de Ingeniería Bioquímica, Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala.
- Rubio, S., Ferreres, C. 2005. Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos. En: Centro de Ciencias Medioambientales (CCMA-CSIC). Dpto. Protección Vegetal. Madrid España. 1-16 p.
- SAGARPA. 2011. Proyecto Estratégico Fomento Productivo. Estrategia de innovación hacia la competitividad en la cafeticultura mexicana). Plan de Innovación de la Cafeticultura en el Estado de Puebla. 5-14 p.
- SAGARPA. 2018. Boletín epidemiológico del Cafeto Núm 54. Febrero, 2018. Disponible en <http://www.royacafe.lanref.org.mx/>
- Sandino D., V.M. 2003. Manejo integrado de la salivita de la caña de azúcar. Nicaragua. FUNICA/UNA/CATIE, 26 p.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2013. Cierre de producción de cultivos cíclicos y perennes. Disponible en:

http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2008. Campañas nacionales. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Disponible en: <http://senasicaw.senasica.sagarpa.gob.mx/campañasnacionales.html>

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), SAGARPA. 2013. Ficha técnica No. 40 de la Roya del caféto (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome) Disponible en: <http://www.senasica.gov.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=19732&IdUrl=58982>

Stoner, K. 2004. Approaches to the biological control of insects. Sustainable agricultura. Northeast región SARE. UMCE Bulletin 7144 p.

Suárez, L. 2016. Aislamiento e identificación de *Moniliophthora roreri*. Standard. 7th ed. M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.

Subero, L. 2005. La roya del café (en línea). Disponible en www.infocafes.com.

Tanada, Y., Kaya, H.K. 1993. Insect Pathology. 554-594 p.

Van den Burg, H., A. Harrison, S., Joosten, M., Vervoort, J. 2006. *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. Mol Plant-Microbe Interact. 19:1420–30 p.

Vandermeer, J., Perfecto, I., Liere, H. 2009. Evidence for hyperparasitism of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) by the entomogenous fungus, *Lecanicillium lecanii*, through a complex ecological web. Plant Pathology. 58: 636–641 p.

Vicentini, S., Magalhaes, B.P. 1996. Infection of the grasshopper, *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal. Anais da Sociedade Entomologica do Brasil 25(2):309-314 p.

Zambolim, L., Zambolim, E., Várzea V. 2005. Durable resistance to coffee leaf rust. 450 p.

Zimmermann G. 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ps.2780370410>

13. ANEXOS

Tabla 9. ANOVA de los resultados de crecimiento micelial a 15, 25, 30 y 35°C.

Temperatura	F	Nivel p	F crit
15 °C	0.2450	0.6	4.2596
25 °C	0.6097	0.4	4.2596
30 °C	1.8890	0.01	4.2596
35° C	44.2413	0	4.2596

Tabla 10. ANOVA de los resultados de crecimiento micelial de *M. anisopliae* a pH 4, 5, 6, y 7

pH	F	Nivel p	F crit
4	1.9923	0.17	4.2596
5	1.4059	0.24	4.2596
6	0.2013	0.65	4.2596
7	4.4185	0.04	4.2596

Tabla 11. ANOVA de los resultados del crecimiento de las cepas a fotoperiodo 12:12 h y 24 h oscuridad

Fotoperiodo	F	Nivel p	F crit
12:12 h	14.7543	0.03	4.2596
24 h	39.3815	0.06	4.2596