

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS



CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DEL HONGO *Mycena citricolor* Berk & Curt, CON AISLAMIENTOS OBTENIDOS DE CULTIVARES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) PROVENIENTES DE LAS DIFERENTES ZONAS CAFETALERAS DE GUATEMALA, C.A.

JORGE WALDEMAR GARCÍA TÚCHEZ

Guatemala, mayo de 2012

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DEL HONGO *Mycena citricolor* Berk & Curt, CON AISLAMIENTOS OBTENIDOS DE CULTIVARES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) PROVENIENTES DE LAS DIFERENTES ZONAS CAFETALERAS DE GUATEMALA, C.A.

TESIS

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR:

JORGE WALDEMAR GARCÍA TÚCHEZ
EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO
INGENIERO AGRÓNOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
EN EL GRADO ACADÉMICO DE
LICENCIADO

GUATEMALA, MAYO DE 2012

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

RECTOR MAGNÍFICO
LIC. CARLOS ESTUARDO GÁLVEZ BARRIOS

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	Dr. Lauriano Figueroa Quiñonez
VOCAL PRIMERO	Dr. Ariel Abderramán Ortiz López
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr. MSc. Marino Barrientos García
VOCAL TERCERO	Ing. Agr. MSc. Oscar René Leiva Ruano
VOCAL CUARTO	Br. Lorena Carolina Flores Pineda
VOCAL QUINTO	P. Agr. Josué Antonio Martínez Roque
SECRETARIO	Ing. Agr. Carlos Roberto Echeverría Escobedo

Guatemala, mayo de 2012

Guatemala, mayo de 2012

Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala

Honorables miembros:

De conformidad con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración el trabajo de tesis titulado:

“CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DEL HONGO *Mycena citricolor* Berk & Curt, CON AISLAMIENTOS OBTENIDOS DE CULTIVARES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) PROVENIENTES DE LAS DIFERENTES ZONAS CAFETALERAS DE GUATEMALA, C.A.”

Presentado como requisito previo a optar al título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

Esperando que el mismo llene los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato suscribirme.

Atentamente,

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

JORGE WALDEMAR GARCÍA TÚCHEZ

ACTO QUE DEDICO

A:

Dios

Señor todo poderoso que estuvo siempre a mi lado en los momentos más difíciles, por darme vida, fuerzas, sabiduría, por ser mi guía durante todos estos años en el inicio de mi carrera profesional. Este triunfo va dedicado hacia ti.

Mi madre

Lilian Elizabeth Túchez, por ser ejemplo de esfuerzo, fe y amor. Gracias por estar a mi lado durante todos estos años, enseñándome que con esfuerzo, dedicación y confianza en Dios todo es posible. Este logro nunca hubiera sido logrado sin tu ayuda, te amo mami. Lo logramos!!!

Mi padre

Amilcar Waldemar García, por el apoyo, consejos brindados, y confianza depositada en mí. Este triunfo es todo tuyo también.

Mis hermanas

Mónica Naythé, Karla Patricia porque siempre han estado presentes en mi mente y corazón, por apoyarme moral y económicamente durante mis estudios. Las quiero mucho. Ahora es mi turno de ayudarles y con gusto lo haré.

Mis abuelos

Elvia Luz Orozco, José Guadalupe Túchez Q.E.P.D. Carlota García Q.E.P.D., Carlos Natividad García Q.E.P.D, porque a través de su ejemplo de vida, cariño fueron un estímulo en mi trayectoria estudiantil.

Mi familia

A mis tíos por ser un ejemplo para mí, a mis primas y primos, por su incondicional afecto y cariño.

Familia Coloma Túchez

Por el apoyo y consejos brindados durante estos años, por la ayuda en mis años de estudio, por ser mis segundos padres, los quiero mucho.

A mis amigos

Cristina Son, Jhonatan Reyes (Serafín), Sergio García (Chito), Jaime Molina (Piña), Alex Pacheco, Pablo García (Negro), Rudy Guillermo (Copias), Rony Dubón (Panda), Juan Pablo Monroy (Doc), David González, Diego Pérez (Maza), Roswell Sandoval, Tracy Vela, Victor Arévalo (Morza), Napoleón Pérez (Chavo), José Andrés Bucaro, Karla López, Marielos Flores, Hugo Gramajo, Kevin Nufio, Julisa Ojer, Angela Meoño, Nelson

Sequén, Mildred Cárdenas, Iris Santos, Juan Carlos Anleú, Lorena García, Keben Delgado, Alejandra Mayorga, Manuel Galindo, Amilcar Celada, por su cariño, amistad y apoyo durante nuestra vida estudiantil, que sus metas y esfuerzos se conviertan en éxitos, gracias por todos los momentos que pasamos juntos en esta gloriosa facultad.

Aura Cristina

Por tu apoyo incondicional, tu cariño sincero y por animarme a seguir siempre adelante y no darme nunca por vencido a pesar de todas las adversidades.

TESIS QUE DEDICO

A:

DIOS

Que guió mis pasos, me dio fuerzas para alcanzar mis metas, sueños y anhelos. SEÑOR EN TÍ CONFÍO.

GUATEMALA

País de la eterna primavera, que este éxito sirva para poder contribuir en tu desarrollo.

USAC

Por abrirme las puertas y ser mi casa de estudios y contribuir con mi desarrollo ético y profesional. Por formar hombres y mujeres de éxito con conciencia social.

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Gloriosa unidad académica, formadora de ingenieros agrónomos(as) de éxito y dispuestos por lograr el desarrollo integral de nuestro país. Gracias por enseñarme a amar cada día más mi carrera.

A MIS CATEDRÁTICOS

Por trasmitirme sus enseñanzas y conocimientos durante mi instancia en esta casa de estudios.

CAFICULTORES DE GUATEMALA

Esperando que este trabajo brinde conocimientos y recomendaciones que contribuyan al desarrollo de la caficultura nacional.

AGRADECIMIENTOS

A:

Mi asesor y amigo

Dr. Edín Orozco, por su apoyo, confianza, asesoramiento y paciencia en la realización de esta tesis. Por la amistad brindada, por ayudarme a cumplir esta meta, enseñarme a nunca darme por vencido y seguir estudiando para ser un profesional de éxito.

Mi supervisor

Ing. Agr. Fredy Hernández Ola, por la paciencia, tiempo y supervisión durante la etapa de EPS.

GHORTEX, S.A.

Ing. Agr. Emilio Say, Inga. Agra. Alejandra Agosto, Augusto Estrada, Lidia Tubac, Gerson Portillo, Jesús Batres y personal de fincas de la empresa, por abrirme las puertas en todo momento, amistad, confianza y conocimientos transmitidos durante mi EPS.

Subárea de protección de plantas FAUSAC

Ing. Agr. Samuel Córdova, Ing. Agr. Álvaro Hernández, Ing. Agr. Filadelfo Guevara, Ing. Agr. Carlos González, Ing. Agr. Geisler Gómez, Angela Meoño, Brenda de Maldonado, Doña Luky, Julio Peña, Pedro Echeverría, por la amistad, confianza brindada durante todo el tiempo compartido.

Lic. Mamerto Reyes y Dr. David Monterroso

Por la ayuda, conocimientos y experiencia aportados en la realización de esta investigación.

Mis evaluadores

Ing. Agr. Manuel Martínez e Ing. Agr. Guillermo García, por el tiempo, apoyo y conocimientos aportados a esta investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE CUADROS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	vi
Resumen	vii
1 INTRODUCCIÓN	1
2 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	3
3 MARCO TEÓRICO.....	4
3.1 Marco conceptual	4
3.1.1 Historia del café en Guatemala	4
3.1.2 Importancia económica del café para Guatemala	4
3.1.3 Clasificación botánica.....	4
3.1.4 Morfología de la planta de café (<i>Coffea arabica</i> L.).....	4
3.1.4.1 Raíz.....	4
3.1.4.2 Hojas.....	5
3.1.4.3 Porte y tallo	5
3.1.4.4 Flores	5
3.1.4.5 Frutos.....	6
3.1.4.6 Semilla y germinación	6
3.1.5 Principales especies de café	7
3.1.6 Principales cultivares comerciales en Guatemala	7
3.1.6.1 Bourbon	7
3.1.6.2 Caturra	7
3.1.6.3 Pache común	7
3.1.6.4 Pache colis.....	8
3.1.6.5 Maragogype	8
3.1.6.6 Pacamara.....	8
3.1.6.7 Catuaí	8
3.1.6.8 Mundo novo	8

3.1.6.9 Pacas	8
3.1.6.10 Catimor	9
3.1.6.11 Robusta	9
3.1.7 Delimitación de los cultivares por altura en Guatemala.....	9
3.1.7.1 Zona sur-occidental de Guatemala	9
3.1.7.2 Zona de producción de café de las verapaces.....	9
3.1.7.3 Zona centro-oriente.....	9
3.1.8 Enfermedades del cultivo de café	9
3.1.9 <i>Mycena citricolor</i>	10
3.1.9.1 Taxonomía de <i>Mycena citricolor</i>	10
3.1.9.2 Biología de <i>Mycena citricolor</i>	10
3.1.9.3 Síntomas causados por <i>Mycena citricolor</i>	12
3.1.9.4 Ciclo de la enfermedad	12
3.1.9.5 Infección.....	14
3.2 MARCO REFERENCIAL	15
4 OBJETIVOS	17
4.1 General.....	17
4.2 Específicos	17
5 HIPÓTESIS	18
6 METODOLOGÍA.....	19
6.1 Colecta de material vegetal enfermo	19
6.2 Obtención de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i>	19
6.3 Estudio in vitro de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i>	19
6.3.1 Crecimiento micelial de <i>Mycena citricolor</i> en diferentes medios de cultivo	19
6.3.2 Crecimiento micelial de <i>Mycena citricolor</i> en diferentes temperaturas.....	20
6.3.3 Crecimiento micelial <i>in vitro</i> de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i>	21
6.3.4 Coloración del micelio de los aislamientos.....	21
6.3.5 Apariencia del micelio	21
6.4 Estudio fase teleomórfica y anamórfica <i>in vitro</i> de <i>Mycena citricolor</i>	21
6.4.1 Gemación <i>in vitro</i> de <i>Mycena citricolor</i>	21
6.5 Estudio de patogenicidad de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> en cultivares comerciales e híbridos de café con diferentes métodos de inoculación del hongo	22
6.5.1 Estudio de patogenicidad de <i>Mycena citricolor</i> en hojas embrionarias de café.....	22

6.5.2 Estudio de patogenicidad de <i>Mycena citricolor</i> en hojas maduras de café	23
6.5.3 Estudio de patogenicidad de <i>Mycena citricolor</i> en frutos verdes de café	23
6.6 Determinación del índice de agresividad de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i>	23
7 RESULTADOS.....	25
7.1 Obtención de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> en áreas cafetaleras de Guatemala.....	25
7.2 Estudio <i>in vitro</i> de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> , provenientes de las principales zonas cafetaleras del país.....	26
7.2.1 Crecimiento micelial en diferentes medios de cultivo	26
7.2.2 Crecimiento micelial de <i>Mycena citricolor</i> en diferentes temperaturas	26
7.2.3 Crecimiento micelial <i>in vitro</i> de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i>	28
7.2.4 Coloración de micelio de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i>	30
7.2.5 Patrón de crecimiento del micelio de aislamientos <i>Mycena citricolor in vitro</i>	30
7.3 Estudio del estado anamórfico y teleomórfico <i>in vitro</i> de <i>Mycena citricolor</i>	32
7.3.1 Gemación, estado anamórfico <i>in vitro</i>	32
7.3.2 Caracterización estado teleomórfico	34
7.3.3 Secuencia de formación de gemas y basidiocarpos de <i>Mycena citricolor in vitro</i>	35
7.4 Estudio de patogenicidad de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> en cultivares comerciales e híbridos de café, con diferentes métodos de inoculación del hongo	36
7.4.1 Evaluación de patogenicidad de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> en hojas embrionarias de café	36
7.4.2 Estudio de patogenicidad de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> en hojas maduras de café	38
7.4.3 Evaluación de patogenicidad de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> en frutos verdes de café.....	40
7.5 Evaluación del índice de agresividad de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i>	41
8 CONCLUSIONES.....	45
9 RECOMENDACIONES	46
10 BIBLIOGRAFÍA	47
11 ANEXO 1.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
Figura 1. Estructura de reproducción asexual de <i>Mycena citricolor</i>	11
Figura 2. Estructuras de origen sexual o teleomórfico de <i>Mycena citricolor</i>	11
Figura 3. Ciclo de <i>Mycena citricolor</i> en café para las condiciones ambientales de la zona cafetalera alta (>900 m altitud) de Guatemala.....	14
Figura 4. Características morfológicas de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> en medio de cultivo PDA a 21 °C. Se observa el color de la colonia y patrón de crecimiento del micelio de cuatro aislamientos evaluados. A) micelio ramificado; B) micelio anillado y ramificado; C) micelio anillado, algodonoso y ramificado; D) micelio algodonoso.	31
Figura 5. Morfología de gemas de <i>Mycena citricolor</i> en medio PDA a 21 °C. A) crecimiento abundante de gemas; B) morfología y diámetro de una gema; C y D) estructura de gemas observada mediante microscopía electrónica de rastreo fotos de ANACAFE.	33
Figura 6. Morfología de basidiocarpos de <i>Mycena citricolor</i> en medio PDA a 21 °C. A) Crecimiento abundante de basidiocarpos; B) características de basidiocarpo.	35
Figura 7. Secuencia de generación de fase asexual y sexual de <i>Mycena citricolor in vitro</i> en medio de cultivo PDA a 21 °C.....	36
Figura 8. Evaluación de patogenicidad de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> en hojas embrionarias de café. A) Plántulas de café, 24 horas después de la inoculación con <i>M. citricolor</i> ; B) flechas muestran necrosis en hojas tres días después de la inoculación; C) síntomas de la enfermedad 10 días después de la inoculación con <i>M. citricolor</i> ; D) hojas embrionarias de café inoculadas mostrando síntomas de hipersensibilidad.	37
Figura 9. Evaluación de patogenicidad de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> en frutos verdes de café: A) Testigo sin inocular, se observa sanidad a los 10 días; B) fruto 3 días después de la inoculación de gemas; C) fruto con 6 días después de la inoculación del hongo, se observa necrosis; y D) fruto 10 días después de la inoculación del hongo.....	41
Figura 10. Fotos de microscopía electrónica de rastreo, en el estudio de inoculación de gemas de <i>Mycena citricolor</i> en hojas maduras de café. A) Se observa desarrollo de hifas a partir de la gema inoculada, 6 horas después de la inoculación en hoja de café; B) mayor crecimiento de hifa en la hoja 12 horas después de la inoculación en hoja de café. Fotografías propiedad de ANACAFÉ.....	42

ÍNDICE DE CUADROS

CONTENIDO	PÁGINA
Cuadro 1. Procedencia de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> , Guatemala, 2010.	25
Cuadro 2. Análisis de varianza para IVCM de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> en diferentes medios de cultivo, 2011.	26
Cuadro 3. Comparación de medias para la variable IVCM (mm) de <i>Mycena citricolor</i> en diferentes medios de cultivo, a temperatura de 21 °C, 2011.	26
Cuadro 4. Análisis de varianza para la variable IVCM (mm) de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> con de temperatura de 17 °C, 21 °C y 25 °C, en medio PDA, 2011.	27
Cuadro 5. Comparación de medias para la variable IVCM (mm) de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> , a temperatura de 17 °C, 21 °C y 25 °C, en medio PDA, 2011.	27
Cuadro 6. Análisis de varianza para la variable IVCM (mm) de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> en medio de cultivo PDA a temperatura de 21 °C.	28
Cuadro 7. Comparación de medias para variable IVCM (mm) de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> , en medio PDA a 21 °C, provenientes de zonas cafetaleras de Guatemala.	28
Cuadro 8. Patrón de crecimiento del micelio observado en 9 aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> en medio de cultivo PDA a temperatura de 21 °C.	31
Cuadro 9. Análisis de varianza para variable número de gemas/cm ² en medio de cultivo PDA a 21°C, correspondiente a seis aislamientos de <i>Mycena citricolor</i>	32
Cuadro 10. Comparación de medias para la variable número de gemas/cm ² de seis aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> en medio PDA y 21 °C.	33
Cuadro 11. Características del basidiocarpo.	34
Cuadro 12. Análisis de varianza para la variable diámetro de lesión (mm) en los cultivares evaluados.	39
Cuadro 13. Comparación de medias para las variables diámetros de lesión y número de gemas producidas por aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> en cultivares de café evaluados <i>in vitro</i>	39
Cuadro 14. Nivel de agresividad de los aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> estudiados y obtenidos según propuesta de Ivaniuk y Pliakhnevich (2008).	44

ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINA
Tabla 1. Niveles de agresividad descritos por Ivaniuk y Pliakhnevich (2008).....	43

ÍNDICE DE GRÁFICAS

CONTENIDO	PÁGINA
Gráfica 1. Crecimiento micelial diario de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> en medio PDA: A) 17 °C; B) 21 °C y; C) 25 °C.	27
Gráfica 2. Crecimiento micelial (mm) diario de nueve aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> en medio de cultivo PDA a 21 °C: A) Suchitepéquez, finca “Los Andes”; B) Escuintla, finca “Sábana Grande”; C) Chimaltenango, finca “La Soledad”; D) San Marcos, finca “Santa Julia”; E) Quetzaltenango, finca “El Faro”; F) Chimaltenango, finca “Santa Elisa”; G) Retalhuleu, finca “Las Casas”; H) Suchitepéquez, finca “Parraxé”; I) Alta Verapaz, finca “El Manantial”.....	29
Gráfica 3. A) Periodo de incubación de aislamientos de <i>Mycena citricolor</i> ; B) periodo de latencia de aislamientos; C) número de gemas por lesión de aislamientos; D) frecuencia de infección de aislamientos de <i>M. citricolor</i> , y E) área de lesión provocada por gemas de aislamientos de <i>M. citricolor</i> en hojas de café.	43

Biological characterization of the fungus *Mycena citricolor* Berk & Curt, with isolates from coffee (*Coffea arabica* L.) cultivars from different coffee growing regions of Guatemala, C.A.

Caracterización biológica del hongo *Mycena citricolor* Berk & Curt, con aislamientos obtenidos de cultivares de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de las diferentes zonas cafetaleras de Guatemala, C.A.

Resumen

En Guatemala el cultivo de café (*Coffea arabica* L.), es uno de los rubros más importantes para la economía del país y genera empleo principalmente en el área rural. *Mycena citricolor* es el hongo causante de la enfermedad ojo de gallo, la cual afecta plantaciones de café que se encuentran en altitudes mayores a 900 m, con precipitaciones de 2000 y 5000 mm por año.

El estudio de la biología de dicho patógeno y aspectos de patogenicidad de aislamientos del hongo, otorga elementos básicos para brindar recomendaciones del manejo de la enfermedad en campo.

En el presente estudio se realizó la caracterización *in vitro* de nueve aislamientos de *Mycena citricolor*, provenientes de siete regiones productoras de café en Guatemala. Así mismo, se evaluó la patogenicidad de dichos aislamientos en cultivares comerciales e híbridos de café, mediante diferentes métodos de inoculación del hongo. El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, durante los años 2010-2011.

Se determinó que la temperatura óptima de desarrollo del hongo fue 21 °C en los medios de cultivo de PDA ó EHCA. El color del micelio de los aislamientos observado fue blanco y se mantuvo constante a través de la manipulación en laboratorio. El patrón de crecimiento micelial de los aislamientos fue diferente mostrando los patrones en formato anillado, ramificado y algodonoso. Las colonias del hongo presentaron patrón de crecimiento micelial distinto al original 20 días después de la inoculación debido a que ocurren mutaciones por la manipulación en laboratorio. La formación de la fase anamórfica del hongo en medio de cultivo PDA fue favorecida cuando fue expuesto a condiciones de luz y humedad durante tres días. Durante la gemación del hongo, se observaron abundantes estructuras reproductivas llamadas gemas de color amarillo con poca variabilidad morfológica. El hongo también formó la fase teleomórfica *in vitro* y consiste en un basidiocarpo amarillo, de consistencia suave y

mucilaginosa, favorecido por condiciones de estrés. En cuanto a la evaluación de la patogenicidad de los aislamientos, de los métodos evaluados, el de inoculación de gemas en hojas maduras de café fue el más eficiente. La inoculación en frutos verdes de café no fue efectiva para evaluar la patogenicidad de los aislamientos del hongo. El periodo de incubación del hongo en hojas determinado *in vitro* fue de 2 a 6 días y el periodo latente de 6 a 8 días. Se determinó que el aislamiento A5, según criterio de Pliakhnevich & Ivaniuk (2008), presentó nivel de agresividad mayor que 5, considerado como alto. Así mismo, los aislamientos A1, A2, A4, A6, A7, A8 y A9 poseen agresividad baja debido a que tienen un índice de agresividad menor que 2, según el mismo criterio.

Basado en los resultados se recomienda utilizar los medios de cultivo PDA ó EHCA con temperatura de 21 °C para estudios de *Mycena citricolor* en condiciones *in vitro*. Promover el método de inoculación de gemas de *M. citricolor* en hojas embrionarias o maduras de café para determinar patogenicidad de aislamientos *in vitro*, determinación de resistencia en genotipos de café y evaluación de fungicidas. Realizar caracterización molecular de *M. citricolor* con mayor número de aislamientos.

1 INTRODUCCIÓN

El cultivo de café (*Coffea arabica* L.), en Guatemala es un rubro importante en la economía del país, genera empleo principalmente en el área rural. Según ANACAFÉ, el 70% del costo de producción de café está ampliamente relacionado a la contratación de mano de obra (ANACAFÉ, 2009).

El hongo *Mycena citricolor*, causa la enfermedad ojo de gallo, pertenece a la clase Basidiomycetes, orden Agaricales y familia Agaricaceae (Kirk et al., 2008). Es una enfermedad de mucha importancia dentro de la caficultura guatemalteca. De acuerdo a un diagnóstico realizado, se demostró que en Guatemala, esta enfermedad es preocupante en zonas altas comprendidas entre altitudes mayores a 900 m, con precipitaciones de 2000 y 5000 mm por año (Avelino et al., 1992; Orozco & Pacheco, 2009).

En la presente investigación se estudiaron características morfológicas *in vitro* y patogénicas de nueve aislamientos de *Mycena citricolor* provenientes de siete regiones cafetaleras de Guatemala, a la vez se evaluaron diferentes métodos de inoculación del hongo. El hongo fue aislado en medio de cultivo PDA a partir de hojas provenientes de campo con síntomas de la enfermedad.

En la caracterización *in vitro* de aislamientos del hongo, se estudiaron características como el índice de velocidad de crecimiento micelial (IVCM) con diferentes medios de cultivo y temperatura, coloración de colonias, patrón de crecimiento micelial, formación de fase anamórfica y teleomórfica en medio de cultivo PDA. El IVCM del hongo en medio PDA y EHCA fue 3.55 y 3.46 mm respectivamente, y a temperatura de 21 °C el IVCM fue 3.52 mm. La coloración de la colonia de los aislamientos fue color blanco. En cuanto al patrón de crecimiento micelial se observó crecimiento de formato anillado, ramificado y algodonoso. Estas características se observaron de forma simultánea entre aislamientos, encontrando que estos tienen más de un patrón de crecimiento a la vez. La fase asexual o anamórfica del hongo ocurrió tres días después que éste fue expuesto a condiciones de luz y humedad. La fase sexual o teleomórfica del hongo se presentó 40-50 días después de la inoculación en medio de cultivo PDA.

Para determinar la patogenicidad de aislamientos de *Mycena citricolor*, se realizó la inoculación de gemas provenientes de aislamientos del hongo en medio PDA, en hojas embrionarias, hojas maduras y frutos verdes de café de diferentes cultivares comerciales e híbridos provenientes de ensayos de campo de ANACAFÉ. La inoculación en frutos verdes de café no fue efectiva

para evaluar la patogenicidad de los aislamientos, pero se observaron lesiones en menos del 8% de los frutos inoculados quince días después de la inoculación del hongo. Para la prueba de inoculación en hojas maduras de café, se realizó un análisis de varianza para variables diámetro de lesión (mm) y número de gemas producidas por lesión, encontrando que el cultivar más susceptible al patógeno es la especie *Coffea liberica*, mientras que caturra es más resistente al patógeno.

En la prueba de determinación del índice de agresividad de aislamientos de *Mycena citricolor* se evaluaron nueve aislamientos bajo criterio de Pliakhnevich & Ivaniuk (2008). Se determinó que los aislamientos codificados como A1, A2, A4, A6, A7, A8 y A9 poseen agresividad baja debido a que tienen índice de agresividad <2 , mientras que el aislamiento A3 tuvo nivel de agresividad medio con índice de 3-4 y el aislamiento A5 posee índice de agresividad >5 lo que indica que tiene nivel de agresividad alto.

Esta investigación forma parte de las líneas de investigación de la Asociación nacional del café, relacionado a la enfermedad ojo de gallo en café.

2 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

En Guatemala, el cultivo de café es afectado por diversas enfermedades, ocasionadas por fitopatógenos entre los que se pueden mencionar: *Colletotrichum* spp., *Hemileia vastatrix*, *Cercospora* spp., *Phoma* spp., *Mycena citricolor*, entre otros, que ocasionan enfermedades de importancia. La mayor producción de café en Guatemala se produce en la parte alta (arriba de los 900 m), debido a la calidad de café que allí se produce. Sin embargo, fueron establecidos algunos cultivares susceptibles a ojo de gallo.

La enfermedad ojo de gallo es causada por el hongo *Mycena citricolor*. Afecta hojas viejas y/o jóvenes, tallos jóvenes y frutos en diferentes estados de desarrollo. En Guatemala, el problema se observa principalmente en cafetos cultivados en partes altas (arriba de 900 m de altitud). Estas áreas se caracterizan por tener humedad relativa arriba del 80%, temperaturas alrededor de los 20 °C y precipitaciones entre 2000 y 5000 mm por año. La enfermedad inicia con el comienzo de las lluvias en los meses de abril a mayo. El hongo puede sobrevivir en lesiones redondas de coloración gris ceniciento y marrón que quedaron en las hojas del año anterior y es allí donde inicia el ciclo de la enfermedad. Al intensificarse las lluvias en mayo y junio, el hongo produce estructuras asexuales infectivas de manera abundante sobre las lesiones o partes del vegetal afectado y cada gema producida si llega a depositarse en una hoja o parte susceptible de la planta de café, ocasiona una nueva lesión, de tal forma que, en poco tiempo existe suficiente inóculo en la plantación de café. La enfermedad tiende a incrementarse, el problema se acentúa cada vez más en tiempo y espacio, y entonces se considera como epidemia. Los principales factores que contribuyen al desarrollo de la enfermedad en plantaciones de cafeto en Guatemala son: presencia de temperaturas alrededor de 20 °C, humedad relativa en torno al 85%, lluvias frecuentes, periodos prolongados de mojado foliar, terrenos con pendiente donde no hay luz solar por la mañana, falta de ventilación, más de tres ejes manejados después de recepa, deficiencia la de fertilización, mal manejo de enfermedades y cultivares susceptibles como catimor, entre otros. El daño en los cafetos consiste en defoliación, muerte de brotes jóvenes, caída de frutos en diferentes etapas de desarrollo, todo ello, disminuye la productividad (Orozco & Pacheco, 2009).

De acuerdo a lo anterior, la fase de campo ha sido parcialmente estudiada. Sin embargo, la biología del hongo y patogenicidad de aislamientos de *Mycena citricolor* en cultivares de café *in vitro* no han sido estudiados. Esta fase es fundamental para evitar pérdidas en condiciones de campo y debe ser investigada debido a la importancia que tiene esta enfermedad para la caficultura de Guatemala.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 Marco conceptual

3.1.1 Historia del café en Guatemala

Los padres Jesuitas introdujeron el café a Guatemala en el año 1760, y lo utilizaron como planta ornamental para adornar sus jardines en Antigua Guatemala. El primer registro de plantaciones de café como cultivo data desde 1800, en las orillas de la ciudad de Guatemala. A partir de 1860 surgen en el país las grandes fincas dedicadas al cultivo de café en los departamentos de Guatemala, Sacatepéquez, Suchitepéquez, Retalhuleu, Escuintla, Alta Verapaz, Jutiapa y Quetzaltenango. En 1871 el cultivo de café se convierte en un negocio con fines lucrativos y se constituye en un cultivo de importancia para la economía del país y ocupa el primer lugar dentro de los productos de exportación (ANACAFÉ, 1991).

3.1.2 Importancia económica del café para Guatemala

Las exportaciones de café guatemalteco, durante el transcurso del periodo 2006/2007 tuvieron aumento del 12% comparado con el periodo de 2005/2006. Durante el periodo 2008/2009 ANACAFÉ reporta para el mercado internacional ventas de 4.9 millones de quintales oro (ANACAFÉ, 2007; ANACAFÉ, 2009).

El ingreso de divisas para el periodo 2008/2009 llegó a los US\$655.87 millones comparado con los US\$252 millones que se alcanzó durante el periodo 2001/2003 (ANACAFÉ, 2009).

3.1.3 Clasificación botánica

La planta de café pertenece al orden Rubiales, familia Rubiaceae, género *Coffea* y especie *Coffea arabica* L. (Jones, 1987; Mondadori, 1977).

3.1.4 Morfología de la planta de café (*Coffea arabica* L.)

3.1.4.1 Raíz

El sistema radicular del cafeto está formado por una raíz principal llamada pivotante, raíces axilares, raíces laterales y raíces absorbentes. Diámetro mayor a 3 mm son denominadas raíces principales, su función primordial es de anclaje al suelo y transporte de sustancias al sistema aéreo de la planta (ANACAFÉ, 2006; Braga et al., 2000).

Las raíces pivotantes son cortas y gruesas con terminación abrupta extendiéndose 45 cm bajo la superficie del suelo. Las raíces axilares tienen un crecimiento vertical, generalmente se

originan de ramificaciones de la raíz pivotante y pueden alcanzar una profundidad de 3 m bajo el suelo. Las raíces absorbentes tiene diámetro menor de 3 mm; estas son asociadas a procesos de absorción y transporte de sustancias del suelo a la planta (Braga et al., 2000).

3.1.4.2 Hojas

La planta de cafeto posee hojas lustrosas sin vellosidades, sus hojas varían en anchura, de 12 a 15 cm de largo y alrededor de 6 cm de ancho en promedio, la forma de la lámina es oval o elíptica, con ápice acuminado, poco agudas en la base. La formación de las hojas inicia en el ápice del tallo y ramas; en ellas se realizan los procesos fotosintéticos y producción de hormonas, que son necesarios para el crecimiento y desarrollo adecuado de la planta (Haarer, 1977; ANACAFÉ, 2006).

3.1.4.3 Porte y tallo

El cafeto es un arbusto que puede llegar a medir 7 m de altura, tallo central único con pocas ramificaciones verticales las cuales nacen de los nudos, las ramas laterales son abundantes y ramificadas. Es liso con nudos situados a una distancia de 5 a 15 cm uno del otro y alternos en pares donde emergen las ramas laterales (Sánchez, 1998; ANACAFÉ, 2006).

Las yemas son estructuras morfológicas que se encuentran entre el tallo y las ramas; éstas inicialmente se encuentran indiferenciadas, cuando la planta va desarrollando, las yemas se diferencian en ramas o inflorescencias, según la clase de estímulo que provoque la planta (Flores, 1999).

El crecimiento de la planta de cafeto, en altura se da a los primeros tres años, después de ese periodo se da un mayor desarrollo de ramas secundarias y terciarias, donde se concentrará la producción de frutos; por lo tanto si la planta no es renovada, la producción de flores se dará en el poco crecimiento de brotes nuevos de las ramas (ANACAFÉ, 2006).

3.1.4.4 Flores

Las flores del cafeto tienen coloración blanca, subsésiles, 2 a 9 flores en cada axila foliar, juntas en pequeños racimos, bractéolas de forma ovada, corola formada por 5 lóbulos, anteras más cortas que los lóbulos de la corola (Haarer, 1977).

Las yemas que dan origen a la inflorescencia, se encuentran distribuidas de forma axilar en las ramas laterales, con promedio de 12 flores por nudo, en cultivares altamente productivos se pueden encontrar de 40 a 45 flores por nudo. Son de naturaleza vegetativa y por estímulos de

días cortos durante octubre y diciembre, se transforman en yemas florales (ANACAFÉ, 1998; ANACAFÉ, 2006).

Según Sánchez (1998); las flores individuales son completas, hermafroditas y auto fértiles.

Los botones florales tienen crecimiento lento durante dos meses, y alcanzan un tamaño de 5 a 8 mm y detienen su crecimiento, iniciando un periodo de reposo por algunas semanas (ANACAFÉ, 2006).

Los cultivares de *Coffea arabica* L. poseen un alto porcentaje de autofecundación (91-96%), mientras que con polinización cruzada no excede del 9% (ANACAFÉ, 2006).

3.1.4.5 Frutos

Son caedizos, color rojo vino o coloración amarilla dependiendo de la variedad, pulpa delgada, el endospermo de la semilla es color verde oscuro (Sánchez, 1998).

Después que los óvulos han sido polinizados, los frutos empiezan a desarrollarse, el ovario fecundado comienza a crecer, en las primeras 6 o 7 semanas el fruto tiene un crecimiento lento, alcanzando 3 a 4 mm. Un mes y medio después de la floración, se da un crecimiento acelerado, que continúa hasta los tres meses y medio, posteriormente continúa el llenado de grano, en esta etapa el fruto consume gran cantidad de nutrientes. Entre el cuarto y sexto mes el grano se endurece, forma la pulpa y alcanza su madurez fisiológica obteniendo su máximo tamaño, el fruto llega a su punto de corte alrededor del octavo mes después de la floración (ANACAFÉ, 1998; ANACAFÉ, 2006).

3.1.4.6 Semilla y germinación

El endospermo forma la mayor parte de la semilla, el cual es duro y de coloración verde (ANACAFÉ, 1998).

El embrión tiene como función formar la planta, se localiza en la base de la semilla, tiene apariencia de una pequeña paleta de 4 mm de largo con coloración crema. Para que el embrión desarrolle, la semilla debe estar madura y deben existir condiciones adecuadas de humedad y temperatura, la semilla absorbe agua del suelo y el embrión comienza a crecer (ANACAFÉ, 2006; Haarer, 1977).

Inicialmente la radícula comienza a brotar, curvándose hacia abajo, el hipocotilo crece y levanta los cotiledones envueltos por el pergamino, que luego se desintegra abriéndose la “mariposa”,

de aquí en adelante la planta comienza a producir su alimento por medio del proceso de fotosíntesis (ANACAFÉ, 2006).

3.1.5 Principales especies de café

En Guatemala la principal especie de interés comercial que se cultiva es *Coffea arabica* L., siendo ésta especie de mayor importancia a nivel mundial ya que más del 70% de toda la producción proviene de ésta especie (ANACAFÉ, 1991).

Otra especie de importancia es *Coffea canephora*; se ha caracterizado porque algunas de sus líneas han desarrollado resistencia a ciertas plagas y enfermedades como nematodos y roya (Sánchez, 1998).

3.1.6 Principales cultivares comerciales en Guatemala

3.1.6.1 Bourbon

En Guatemala está considerado como un cultivar altamente productivo, adaptable a diferentes alturas y con magnífica respuesta a varias formas de manejo de la planta. Se menciona que es un arbusto de porte alto, ramas secundarias abundantes, buena cantidad de axilas florales, brotes de color verde, vino a sustituir gradualmente al cultivar typica. Es muy precoz en su maduración, con riesgos de caída de frutos en zonas con lluvias intensas. Se ha cultivado en diferentes altitudes, los mejores resultados han sido encontrados en zonas comprendidas entre 1067 a 1800 m (Sánchez, 1998; ANACAFÉ, 1991; ANACAFÉ, 2006).

3.1.6.2 Caturra

Fue descubierto en el estado de Minas Gerais, Brasil, como resultado de una mutación del cultivar bourbon. Es precoz de alta producción y requiere un buen manejo cultural, agronómico y adecuada fertilización. Posee entrenudos cortos y fácil de cosechar debido al tamaño de la planta, pero tiende a durar poco en el campo (menor longevidad en comparación al bourbon) (ANACAFÉ, 2006; ANACAFÉ, 1991; Sánchez, 1998).

3.1.6.3 Pache común

Tuvo origen en Finca "Brito", Santa Cruz Naranjo, Santa Rosa, Guatemala, en 1949, el cual se identificó como mutación del cultivar typica. Es una planta de porte bajo, con entrenudos cortos, ramificaciones frondosas, cuya característica es terminar en una copa bastante plana (ANACAFÉ, 1991).

3.1.6.4 Pache colis

Es originario de Mataquescuintla, Jalapa, Guatemala, fue encontrado dentro de una plantación de caturra y pache común. Es un cafeto de porte bajo con entrenudos cortos, se adapta a rangos de altitud de 900 a 1900 m, con temperaturas frescas (ANACAFÉ, 2006).

3.1.6.5 Maragogype

Fue descubierto en Brasil, como mutación de typica, es una planta de porte alto, superior a typica y bourbón. Sus frutos presentan el ombligo saliente bien desarrollado y sus semillas son de gran tamaño, convirtiéndose en la característica principal de este cultivar. Tiene la desventaja de ser una planta poco productiva, pero la calidad de taza es muy apreciada en mercados especiales, se cultiva en la región de Cobán, en altitudes de 600 a 800 m, con una tecnología de bajos insumos (ANACAFÉ, 2006).

3.1.6.6 Pacamara

Fue obtenido del cruzamiento entre pacas y maragogype que se realizó en El Salvador, es una planta de porte pequeño y alta productividad, con hojas y frutos grandes. Presenta variaciones en tamaño del fruto y grano, se adapta muy bien a altitudes de 900 a 1250 m y lluvias anuales de 2500 a 3000 mm bien distribuidos (ANACAFÉ, 1991; ANACAFÉ, 2006).

3.1.6.7 Catuai

Es una planta de porte bajo, su silueta es casi cilíndrica y sus frutos no se desprenden fácilmente de la rama. Ha demostrado un comportamiento excelente, alta producción y requiere un buen manejo agronómico. Se adapta muy bien a altitudes de 800 a 1400 m en la Boca Costa y de 1100 a 1700 m en la zona central oriental y norte del país (ANACAFÉ, 1991; ANACAFÉ, 2006).

3.1.6.8 Mundo novo

Es originario del municipio de Urupés, en el estado de Sao Paulo, Brasil. Es de porte alto y buena capacidad productiva, maduración un poco tardía comparada con bourbón, se adapta bien a regiones del centro y oriente del país con precipitaciones anuales de 1200 a 1800 mm de lluvia (ANACAFÉ, 1991; ANACAFÉ, 2006).

3.1.6.9 Pacas

Tuvo origen en El Salvador por mutación del cultivar bourbón, muy parecido al cultivar caturra, con características muy similares a éste. Es de porte bajo, entrenudos cortos, follaje abundante

y muy compacto, su fruto es de maduración precoz y la planta en general responde a suelos de buena fertilidad y manejo de tejido mediante recepas, con mucho vigor vegetativo y cosechas abundantes (ANACAFÉ, 1991; Sánchez, 1998).

3.1.6.10 Catimor

Los catimores son muy precoces y productivos, exigentes al buen manejo agronómico, especialmente a la fertilización y manejo de sombra. Presenta mayor susceptibilidad a *Mycena citricolor* en zonas altas, por lo que su cultivo es recomendado en zonas bajas y medias (ANACAFÉ, 2006).

3.1.6.11 Robusta

Ocupa un mínimo porcentaje en producción respecto a los demás cultivares que se cultivan en Guatemala, pero ha constituido un valioso recurso para el café injertado como patrón para otros cultivares. Pertenece a la especie *Coffea canephora*, es un arbusto grande y vigoroso, las plantas después de unos años emiten de tres a cinco ejes verticales con cierta inclinación lateral. Se comporta muy bien en altitudes mínimas en donde se cultiva café en Guatemala (ANACAFÉ, 1991; ANACAFÉ, 2006).

3.1.7 Delimitación de los cultivares por altura en Guatemala (Sánchez, 1998)

3.1.7.1 Zona sur-occidental de Guatemala

De 610 a 915 m de altitud: caturra, pacas, catimor 5269 o 5159

De 916 a 1219 m de altitud: catimor 5175, catuaí, caturra, pacas

De 1220 a 1524 m de altitud: catuaí y tekisic

3.1.7.2 Zona de producción de café de las Verapaces

De 457 a 915 m de altitud: caturra, pacas, tekisic, catimor, pache y mundo novo.

De 916 a 1524 m de altitud: catuaí, cekisic, catimor 5175, caturra

3.1.7.3 Zona centro-oriente

De 610 a 1524 m de altitud: tekisic, pache, pacas, caturra, mundo novo, catimor 5175, 5269, 5159

3.1.8 Enfermedades del cultivo de café

Las enfermedades en el cultivo de café son causadas por diversos seres bióticos como los fitopatógenos.

Los fitopatógenos pueden ser transmitidos por semilla, plántulas o pueden existir dentro de la rizósfera del suelo y manifestarse de manera cíclica.

Entre las enfermedades que más atacan al cultivo de café se mencionan las siguientes:

- Antracnosis de ramas y frutos, causada por *Colletotrichum* spp.
- Roya del café, causada por *Hemileia vastatrix*
- Ojo de gallo, causada por *Mycena citricolor*
- Mancha de hierro, causada por *Cercospora* spp.
- Phoma o derrite, causada por *Phoma* spp.
- Mal del talluelo, causada por *Fusarium* spp., *Pythium*, *Rhizoctonia* (Orozco, 2008).

3.1.9 *Mycena citricolor*

3.1.9.1 Taxonomía de *Mycena citricolor* (Kirk et al., 2008)

Phylum:	Basidiomycota
Subphylum:	Agaramycotina
Clase:	Basidiomycetes
Orden:	Agaricales
Familia:	Agaricaceae
Género:	<i>Mycena</i>
Especie:	<i>Mycena citricolor</i>

3.1.9.2 Biología de *Mycena citricolor*

La enfermedad conocida como ojo de gallo es causada por el patógeno *M. citricolor*, puede mermar la producción del cultivo de café (Wang, 1994).

El hongo tiene como principal característica la producción de dos tipos de estructuras reproductivas: gemas (fase asexual) y basidiocarpos (fase sexual) (Barquero, 2004; Orozco & Calderón, 2009).

Cuando las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo del hongo y en cultivares de café susceptibles, se observan estructuras semejantes a pequeños alfileres de coloración amarilla, que aparecen sobre las lesiones, esta es la fase asexual del hongo. El hongo durante esta fase produce cuerpos fructíferos conocidos como gemas de forma esférica, de consistencia mucilaginosa. Esta característica, permite la adherencia de las gemas en hojas u otras partes vegetativas (Orozco & Calderón, 2009).

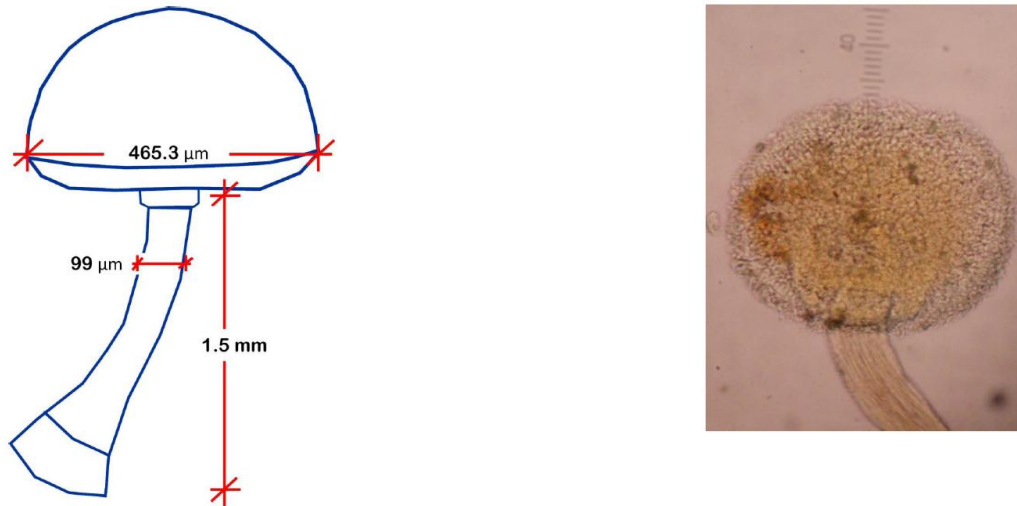


Figura 1. Estructura de reproducción asexual de *Mycena citricolor*

Fuente: Orozco & Calderón (2009)

El estado sexual o teleomorfo de *M. citricolor*, se puede encontrar muy pocas veces en la naturaleza y de acuerdo con expertos, estado del hongo tiene poca importancia en el desarrollo de la enfermedad (Borbón, 1999).

En la fase sexual, los basidiocarpos tienen forma de paraguas en miniatura, coloración amarilla, el píleo es hemisférico con diámetro de 3 mm, desarrollado sobre un pedicelo de 7 mm de longitud. Estos cuerpos fructíferos se originan de hojas o frutos de café que cayeron de la planta. Sin embargo, por tratarse de un ambiente húmedo, existe rápida descomposición del material vegetal enfermo que se deposita en el suelo, además abundante cantidad de microorganismos en el ambiente y otros parásitos, evita el apareamiento de estas estructuras. Por ello, raramente son observados en el campo (Orozco & Calderón, 2009).

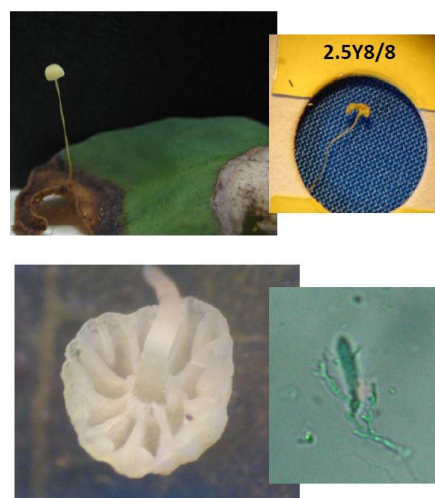


Figura 2. Estructuras de origen sexual o teleomórfico de *Mycena citricolor*

Fuente: Orozco & Calderón (2009)

El hongo puede sobrevivir en lesiones que se observan sobre hojas viejas, muy poco en frutos enfermos que quedaron en la planta o tejidos enfermos de las ramas. Estas lesiones son de coloración blanquecina, tienen aspecto seco y aproximadamente medio centímetro de diámetro. Allí el hongo sobrevive de un año para otro y es allí donde se origina el inóculo primario, el cual da inicio a la enfermedad (Orozco & Calderón, 2009).

3.1.9.3 Síntomas causados por *Mycena citricolor*

Los síntomas en hojas son manchas circulares de color café oscuro, que cambian a gris ceniciento al madurar la lesión; sus bordes son bien definidos y se pueden observar tanto en el haz, como en el envés de la hoja (Guharay et al., 2000).

La mancha puede tener un diámetro comprendido de 6 a 10 mm cuando se observan en hojas, lesiones jóvenes tienen coloración oscura y lesiones viejas coloración crema (Wang et al., 1999).

Según Sequeira (1952), el efecto de la enfermedad ojo de gallo sobre el rendimiento se debe primordialmente a la defoliación; ésta defoliación no depende del número de lesiones presentadas en la hoja, si no que depende de la ubicación de las lesiones en la hoja, una lesión en la vena central, cerca del pecíolo de la hoja causa la caída prematura de hojas originada por la interrupción del flujo normal de auxinas en la lámina foliar hasta el pecíolo.

3.1.9.4 Ciclo de la enfermedad

Para que ocurra la enfermedad se requiere de condiciones con alta humedad relativa 80 a 95%, precipitaciones superiores a 15 mm, sombra densa y altas densidades de siembra. El patógeno necesita de 18 a 25 horas de alta humedad, bajo luz difusa, para comenzar a producir nuevas infecciones, pero, el período de formación de nuevas gemas lleva aproximadamente 8 días (Wang, 1994; Guharay et al., 2000).

Cuando las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de la enfermedad, se observa el daño en las plantas y aparecen los síntomas característicos de la enfermedad. Esto se lleva a cabo en las etapas que pueden resumirse de la siguiente manera:

Etapas de sobrevivencia del hongo. Durante noviembre a marzo en algunos casos abril, que corresponde a la época seca en Guatemala, el hongo sobrevive en lesiones características de la enfermedad en las plantas de café que fueron dañadas el año anterior. Ese es el inóculo más importante y se debe manejar para evitar que se convierta en epidemia. Así mismo el

hongo puede sobrevivir en malezas que crecen en los cafetales, árboles de sombra o helechos que se encuentran en el campo. El número de lesiones que puede encontrarse por hoja o material enfermo de café o planta hospedera es variable (Orozco & Calderón, 2009).

Etapas de gemación del hongo. Al inicio de las lluvias en abril a mayo, en lesiones causadas por el hongo es donde ocurre la gemación. En las lesiones, se observa varios cuerpos fructíferos, en promedio 20 por lesión. Las gemas del hongo se desprenden fácilmente y caen en tejido sano, se pueden dispersar debido al salpique de agua de lluvia y el viento. Cada gema producida tiene la potencialidad de infectar y producir más lesiones con cuerpos fructíferos que pueden infectar nuevas hojas. La presencia de una película de agua y temperatura alrededor de 20 °C es importante para que esto ocurra. Cuando estas gemas se depositan en hojas de cafetos o tallos jóvenes; en pocas horas, inicia la germinación de las gemas con la emisión de hifa del hongo sobre el tejido de la planta de café y ocurre la infección (Orozco & Calderón, 2009).

Fructificación de nuevas lesiones o inóculo secundario. Esta fase se debe principalmente al desarrollo de la enfermedad cuando las lluvias se intensifican ocurre el apareamiento de nuevas lesiones de color marrón de diferente formato, producto de la producción de las gemas iniciales producidas por el hongo. Se trata de lesiones secundarias que producen más inóculo en el área foliar. La dispersión de las gemas y las infecciones en la planta afectada continúan. Durante esta etapa se puede observar la defoliación de los cafetos. Cuando ocurre defoliación severa el ataque del hongo puede continuar en frutos y tallos jóvenes (Orozco & Calderón, 2009).

Final del ciclo de la enfermedad e inóculo residual. Al final de la época lluviosa, la humedad disminuye, la temperatura se incrementa, hay mayor ventilación y menos horas de mojado foliar. Este ambiente es adverso al desarrollo del hongo y por lo tanto se paraliza la producción de gemas asexuales en las lesiones. En plantaciones de café con altitudes arriba de 1600 m y con alta humedad, el hongo continúa produciendo gemas con el rocío del amanecer en diciembre, enero y febrero. Sin embargo, la incidencia y severidad de la enfermedad disminuye. Todas aquellas lesiones en las hojas de color marrón, se tornan de gris ceniciento o blanquecino en la planta de café y esto constituye el inóculo residual que dará origen a la enfermedad el próximo año (Orozco & Calderón, 2009), figura 3.

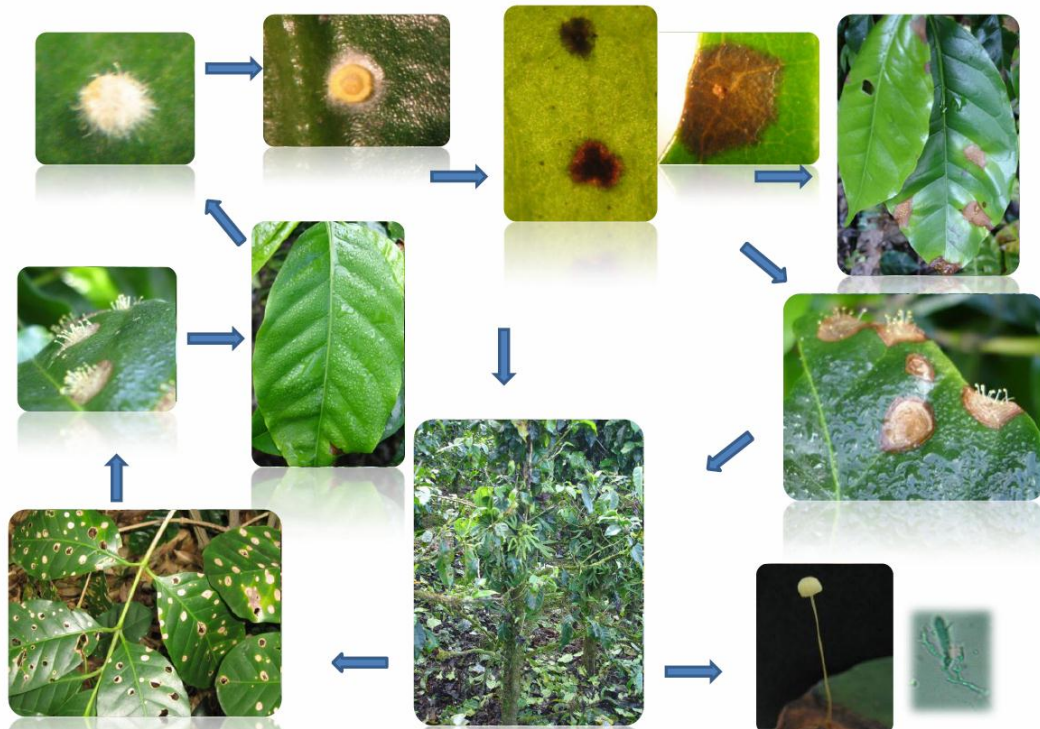


Figura 3. Ciclo de *Mycena citricolor* en café para las condiciones ambientales de la zona cafetalera alta (>900 m altitud) de Guatemala.

Fuente: Orozco & Calderón (2009).

3.1.9.5 Infección

La producción de ácido oxálico es liberado antes de la penetración del hongo en las hojas, de tal manera que el calcio de las paredes celulares de la planta es capturado, lo cual provoca que el tejido del hospedero se debilite, permitiendo de esta manera la entrada de la hifa, a través de las paredes celulares (Rao y Tewari, 1987).

Vargas et al. (2000) utilizaron hojas de café con lesiones viejas en las cuales el hongo permanece en estado latente. Así mismo, observaron por medio de microscopía electrónica de barrido las estructuras de las gemas germinadas y sin germinar, gemas adheridas al pedicelo, micelio y las fíbulas. El tejido foliar afectado por el patógeno muestra micelio dentro de la célula y entre las paredes celulares del hospedero. El hongo penetra en forma directa al hospedero, pero posiblemente pueda aprovechar heridas o abertura de estomas en la hoja para penetrar hacia el interior del tejido foliar. El ácido oxálico tiene como fin disminuir el pH a nivel celular, activando enzimas como la oxidasa del ácido indolacético (AIA-oxidasa), celulasa y poligalacturonasa que digieren la pared celular del hospedero. En el caso de *M. citricolor* no existe producción de pectina metil esterasa y se encuentran presentes niveles muy bajos de poligalacturonasa y celulasa. (Rao y Tewari, 1987).

3.2 MARCO REFERENCIAL

Avelino et al. (1992), estudiaron el desarrollo del ojo de gallo y evaluación de daños en el norte de Guatemala y cita que la enfermedad es preocupante en zonas relativamente altas con fuerte pluviometría y nubosidad, en donde se produce café de calidad en Guatemala.

La recepa como práctica cultural ha permitido disminuir la humedad existente en los cafetos. Avelino et al. (1992) mencionan que se pasó de 54% en 1990 al 17% en 1991, después de haber recepado el surco vecino.

Medina (2001), elaboró un manual técnico sobre manejo integrado de la enfermedad en cultivo de café. Menciona que una estrategia de manejo integral debe involucrar acciones de tipo cultural como desombre, deshije, poda, deshierve; con el fin de aumentar la ventilación, iluminación y reducción de la humedad ambiental dentro de plantaciones de café, y así permitir condiciones desfavorables para el desarrollo del hongo.

En el combate químico, existen pocas opciones para este hongo y van encaminadas a manejo integrado. Orozco & Leal (2009), evaluaron la aplicación de productos biológicos y químicos en el manejo de ojo de gallo, en Finca La Soledad, Acatenango, Chimaltenango. Exponen que prácticas aisladas de control químico no tienen reducción de daños, en tanto que el manejo integrado de la enfermedad es una alternativa para solucionar el problema. Evaluación de productos químicos conjuntamente con productos biológicos pueden brindar opciones de manejo de la epidemia.

En cuanto a la biología del hongo. Morales (2002), concluye que para condiciones de Retalhuleu, el ciclo de vida de *M. citricolor* ocurre en 15 días en campo y 19 en ambiente controlado. Orozco & Calderón (2009), mencionan que el patógeno se puede encontrar presente en hojas viejas durante los meses de diciembre-abril. El inóculo primario es el responsable del inicio del ciclo de la enfermedad. El ciclo de la enfermedad tiene inicio, al principio de las lluvias y con temperatura favorable, en lesiones viejas se promueve la gemación del hongo. Realizaron aislamientos del patógeno en medio PDA, el cual germinó a las 24 horas después del aislamiento a temperatura de 20 °C, a las 48 horas observaron crecimiento lateral de hifas. La fase teleomórfica ha sido esporádicamente encontrada en campo, se caracteriza por la presencia de basidiocarpos de coloración amarilla, con una longitud del pedicelo de 7 mm, consistencia suave y mucilaginoso, sin importancia en el ciclo de la enfermedad. El daño en cafetos consiste en defoliación, muerte de brotes jóvenes, caída

de frutos en diferentes etapas de desarrollo, todo ello, disminuye la productividad (Orozco & Pacheco, 2009).

Estudios relacionados a la epidemiología de ojo de gallo han sido efectuados por Orozco & Pacheco (2009), en fincas de la Costa Sur de Guatemala, Sacatepéquez y Chimaltenango. Ellos indican que el problema se observa en cafetos cultivados en partes altas comprendidas entre 900 a 1900 m, áreas con humedad relativa arriba del 80%, temperaturas cercanas a 20 °C y precipitación entre 2000 y 5000 mm por año. La enfermedad inicia con el comienzo de las lluvias (abril a mayo). El hongo sobrevive en lesiones redondas de coloración gris ceniciento y marrón que quedaron en hojas del año anterior (inóculo primario). Al intensificarse las lluvias, el hongo produce estructuras asexuales infectivas de manera abundante y cada gema producida si llega a depositarse en una hoja o parte susceptible de la planta de café, ocasiona una nueva lesión, de tal forma que, en poco tiempo existe suficiente inóculo secundario en la plantación de café. La enfermedad tiende a incrementarse, el problema se acentúa cada vez más en tiempo y espacio, y entonces se considera como epidemia. Los factores que contribuyen al desarrollo de la enfermedad son: temperatura, humedad relativa, lluvias frecuentes, periodos prolongados de mojado foliar, terrenos con pendiente donde no hay luz solar por la mañana, falta de ventilación, más de tres ejes manejados después de recepa, deficiencia en la fertilización, mal manejo de enfermedades. En las áreas de estudio, el cultivar más susceptible a la enfermedad es catimor.

4 OBJETIVOS

4.1 General

- Realizar la caracterización biológica de *Mycena citricolor* y obtención de métodos para evaluar la patogenicidad de aislamientos del hongo en cultivares de café (*Coffea arabica* L.) en condiciones *in vitro*.

4.2 Específicos

- Realizar la caracterización *in vitro* de aislamientos de *Mycena citricolor*, provenientes de las principales zonas cafetaleras del país.
- Evaluar la patogenicidad de los aislamientos de *Mycena citricolor* en cultivares comerciales y genotipos promisorios de café con diferentes métodos de inoculación del hongo.

5 HIPÓTESIS

Como hipótesis de trabajo, la investigación se inició asumiendo que en las diferentes zonas cafetales del país, por la misma diversidad climática y ecológica que presentan, los aislamientos de *Mycena citricolor* diferirán en sus características morfológicas y de patogenicidad en diferentes cultivares de café.

Haciendo operativa esta hipótesis se hicieron los siguientes planteamientos:

- i. El crecimiento micelial de los aislamientos realizados es igual;
- ii. La coloración de los aislamientos es igual;
- iii. El patrón de crecimiento micelial de los aislamientos es igual;
- iv. La patogenicidad de los aislamientos es igual en todos los cultivares de café.

6 METODOLOGÍA

El estudio se realizó, siguiendo las etapas: colecta de hojas enfermas de café; obtención de aislamientos de *Mycena citricolor*; caracterización *in vitro* de aislamientos de *M. citricolor*; evaluación de patogenicidad de aislamientos de *M. citricolor* en cultivares comerciales y genotipos promisorios de café con diferentes métodos de inoculación del hongo.

6.1 Colecta de material vegetal enfermo

Se colectaron muestras de *M. citricolor* en siete departamentos de Guatemala, con el fin de obtener muestras del hongo de diferentes zonas cafetaleras de Guatemala.

6.2 Obtención de aislamientos de *Mycena citricolor*

Hojas con sintomatología de ojo de gallo fueron desinfectadas con alcohol al 70% durante 30 segundos e hipoclorito de sodio al 3% durante un minuto. Posteriormente, fueron lavadas con agua destilada-estéril; y colocadas durante 48 horas en cámara húmeda la cual consistió en bolsas plásticas y papel toalla humedecida, para estimular el desarrollo de gemas infectivas del hongo. Una vez producidas las gemas; estas fueron colocadas sobre medio de cultivo para realizar el aislamiento.

El medio de cultivo utilizado fue PDA a una proporción de 39 g por litro de agua destilada. El medio de cultivo fue esterilizado en autoclave durante 15 minutos a temperatura de 121 °C y presión de 15 psi. Posteriormente, fue adicionado en cajas petri estériles. Las cajas petri fueron inoculadas con gemas y colocadas en incubadora a 20-22 °C, sin luz para estimular el crecimiento del hongo.

6.3 Estudio *in vitro* de aislamientos de *Mycena citricolor*

El estudio *in vitro* de aislamientos de *M. citricolor* se realizó con las evaluaciones: determinación del índice de velocidad de crecimiento micelial (IVCM) del hongo en diferentes medios de cultivo y temperatura, coloración del micelio, apariencia del micelio, caracterización de fase anamórfica y teleomórfica del hongo y gemación.

6.3.1 Crecimiento micelial de *Mycena citricolor* en diferentes medios de cultivo

Para determinar en que medio de cultivo el crecimiento micelial de *M. citricolor* es más rápido se evaluaron los medios de cultivo PDA, saburó, y extracto de hojas de café-agar (EHCA), a temperatura de 21 °C. La composición de los medios de cultivo se muestra en el anexo 1. Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave durante 15 minutos a temperatura de 121 °C y presión de 15 psi, posteriormente fueron colocados en cajas petri.

Se realizaron mediciones del índice de velocidad de crecimiento micelial (IVCM) del hongo. Las mediciones se iniciaron 24 horas después de la inoculación de gemas en los medios de cultivo evaluados durante un periodo de ocho días. El IVCM fue calculado utilizando la fórmula de Manguire, adaptada por Oliveira (1991), citada por Oliva (2009).

$$\text{IVCM} = \sum (D - D_a) / N$$

Dónde:

D = diámetro medio actual (mm)

D_a = diámetro medio del día anterior (mm)

N = número de días después de la inoculación en medio de cultivo (días)

En la evaluación de IVCM se utilizó diseño completamente al azar (DCA), con tres tratamientos y tres repeticiones, la unidad experimental fue cada una de las cajas petri. De acuerdo con López (2008), en este diseño estadístico están incluidos principios de repetición, aleatorización y es utilizado cuando no hay necesidad de control local, debido a que el ambiente experimental es homogéneo y los tratamientos se asignan a unidades experimentales mediante una aleatorización completa, sin ninguna restricción. De tal forma, las unidades experimentales se evaluaron bajo condiciones homogéneas de temperatura, luminosidad y cantidad de medio de cultivo (PDA, saburó ó EHCA).

El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Dónde,

Y_{ij} = variable respuesta de la ij-ésima unidad experimental

μ = media general de la variable respuesta

τ_i = efecto del i-ésimo tratamiento desde i=1 hasta j=3.

ε_{ij} = error experimental asociado a la ij-ésima unidad experimental desde i=1 hasta j=9.

6.3.2 Crecimiento micelial de *Mycena citricolor* en diferentes temperaturas

Se evaluó el IVCM de *M. citricolor* a temperatura de 17 °C, 21 °C y 25 °C, en medio PDA, para determinar la temperatura de mejor desarrollo de *M. citricolor in vitro*. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento, cada repetición consistió en una caja petri inoculada con el hongo.

Se utilizó diseño estadístico completamente al azar (DCA), siendo la unidad experimental las cajas petri y la variable estudiada IVCM (mm) del hongo.

Las mediciones de IVCM, se iniciaron 24 horas después de la inoculación en medio PDA durante ocho días. El índice de velocidad de crecimiento micelial fue calculado utilizando la fórmula de Manguire, citada por Oliva (2009).

6.3.3 Crecimiento micelial *in vitro* de aislamientos de *Mycena citricolor*

Se estudiaron nueve aislamientos de *M. citricolor* en medio de cultivo PDA y temperatura de 21 °C. De cada aislamiento se tomaron discos de 2 mm de diámetro de PDA con micelio del hongo en crecimiento activo, el disco se colocó en el centro de una caja petri con medio de cultivo nuevo, método descrito por Orozco & Calderón (2009) y López (2001). Se prepararon tres repeticiones por cada aislamiento.

Las mediciones de IVCM se iniciaron 24 horas después de la inoculación en medio PDA, durante ocho días.

6.3.4 Coloración del micelio de los aislamientos

El color del micelio fue descrito a partir de la tabla de colores de Munsell (1975). Esta característica se observó diez días después de la inoculación del hongo en cajas petri con medio de cultivo PDA.

6.3.5 Apariencia del micelio

La apariencia del micelio se evaluó visualmente, tomando los criterios: a) micelio ramificado; b) micelio anillado y ramificado; c) micelio anillado, algodonoso y ramificado y d) micelio algodonoso.

Esta característica cualitativa se observó en cajas petri con medio PDA, diez días después de la inoculación del hongo en medio PDA bajo temperatura de 21 °C.

6.4 Estudio fase teleomórfica y anamórfica *in vitro* de *Mycena citricolor*

Se realizó con nueve aislamientos de *M. citricolor* en medio PDA a temperatura de 21 °C. La fase anamórfica y teleomórfica se estudió en medio de cultivo PDA. Se estudió el número de días y condiciones *in vitro* que el hongo necesita para desarrollar estas fases.

6.4.1 Gemación *in vitro* de *Mycena citricolor*

Se realizó con nueve aislamientos de *M. citricolor* en medio de cultivo PDA. Para cada aislamiento se realizaron tres repeticiones. La cuantificación se realizó 20 días después de la inoculación del hongo en medio PDA. Los aislamientos fueron expuestos a condiciones de

humedad, 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La producción de gemas fue cuantificada con ayuda de una cámara de conteo de nematodos. Se seleccionaron áreas de 1cm² en medio de cultivo y se realizó el conteo de gemas presente en medio de cultivo.

6.5 Estudio de patogenicidad de aislamientos de *Mycena citricolor* en cultivares comerciales e híbridos de café con diferentes métodos de inoculación del hongo

Se realizó la inoculación de gemas (fase anamórfica) de *M. citricolor*, evaluando los métodos: a) inoculación en hojas embrionarias de café, obtenidas a partir de la germinación de semilla en cámara húmeda; b) inoculación en hojas maduras de café, provenientes de campo; c) inoculación en frutos verdes de café, provenientes de campo. Se inocularon gemas de los aislamientos provenientes de los departamentos de San Marcos, Suchitepéquez, Quetzaltenango, Chimaltenango, Retalhuleu, Escuintla y Alta Verapaz. En cada ensayo, se analizaron las ventajas y desventajas de cada método.

6.5.1 Estudio de patogenicidad de *Mycena citricolor* en hojas embrionarias de café

Se utilizaron los cultivares catimor, caturra, pache colis, catuaí, bourbón y cinco híbridos de café provenientes de un ensayo de campo de ANACAFÉ ubicado en el departamento de Santa Rosa. Estos últimos, son materiales seleccionados de acuerdo a características agronómicas y poseen resistencia a *Hemileia vastatrix*. Para la obtención de las plántulas, semillas de dichos cultivares fueron desinfestados con alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 3%. Fueron colocadas en cámara húmeda durante 75 días. Las cámaras húmedas consistieron en bandejas plásticas transparentes con papel toalla humedecido con agua destilada-estéril. Cuando las plántulas abrieron los cotiledones, fueron seleccionadas y colocadas en bandejas plásticas transparentes previamente desinfestadas con alcohol al 70%. En el fondo de dichas cajas, se colocó papel toalla humedecido con agua destilada-estéril para mantener el ambiente húmedo y encima se colocaron tres plántulas con los cotiledones completamente abiertos. Posteriormente, con ayuda de una pinza, se tomaron gemas de los aislamientos de San Marcos, Suchitepéquez, Quetzaltenango, Chimaltenango, Retalhuleu, Escuintla y Alta Verapaz. Se colocó una gema en el haz de cada una de las hojas embrionarias y se asperjó con agua destilada-estéril. En la inoculación no se realizó herida en las hojas. Después de la inoculación de gemas del hongo en plántulas de café, se realizaron observaciones cada 24 horas para registrar síntomas de la enfermedad ojo de gallo en las plántulas, durante quince días.

6.5.2 Estudio de patogenicidad de *Mycena citricolor* en hojas maduras de café

Para este estudio se utilizaron hojas maduras de los cultivares caturra, catuaí, bourbón, oro verde, tupí, obata, la especie *Coffea liberica*, y diez híbridos de café obtenidos en el ensayo de ANACAFÉ anteriormente mencionado. Las hojas colectadas fueron conducidas al laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala. Se desinfectaron con alcohol al 70% durante 30 segundos e hipoclorito de sodio al 3% durante un minuto y lavadas con agua destilada-estéril. Luego, se colocaron en bandejas plásticas transparentes con papel toalla humedecido. Se realizó la inoculación del hongo de los aislamientos de San Marcos, Suchitepéquez, Quetzaltenango, Chimaltenango, Retalhuleu, Escuintla y Alta Verapaz. Con ayuda de una pinza se colocaron cuatro gemas en el haz de cada hoja, posteriormente, con ayuda de un atomizador se asperjaron las hojas con agua destilada-estéril. Las observaciones se iniciaron 24 horas después de la inoculación con gemas de aislamientos del hongo, para registrar el incremento del diámetro de lesión, durante quince días.

6.5.3 Estudio de patogenicidad de *Mycena citricolor* en frutos verdes de café

Para el estudio de patogenicidad de *M. citricolor* en frutos verdes de café, se utilizaron frutos de los cultivares caturra, obata, tupí, oro verde y diez híbridos de café, anteriormente indicado. Así mismo, se contemplaron los aislamientos provenientes de San Marcos, Suchitepéquez, Chimaltenango, Quetzaltenango, Retalhuleu, Escuintla y Alta Verapaz. Los frutos de todos los genotipos indicados fueron colectados en campo en el departamento de Santa Rosa, estación experimental de ANACAFÉ. Fueron conducidos al laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala. Posteriormente, fueron desinfectados con alcohol al 70% durante 30 segundos e hipoclorito de sodio al 3% durante un minuto y lavados con agua destilada-estéril. Luego, se colocaron en cámara húmeda como la descrita anteriormente. La inoculación se hizo con la ayuda de una micropipeta colocando sobre cada fruto una gota de agua destilada-estéril y una gema del hongo. Lecturas de síntomas causados por el hongo se iniciaron 24 horas después de la inoculación de gemas de aislamientos del hongo en frutos verdes de café, durante quince días.

6.6 Determinación del índice de agresividad de aislamientos de *Mycena citricolor*

El estudio se realizó, inoculando nueve aislamientos del hongo en hojas maduras de café. Se colocaron cuatro gemas por hoja de café, inoculando hojas de 17 cultivares; estas se mantuvieron en cámara húmeda durante 15 días a temperatura de 21-23 °C y humedad relativa

del 90%. Se realizaron evaluaciones para registrar el período de incubación, período de latencia, cantidad de lesiones, cantidad de gemas por lesión y tamaño de lesión final.

Para el índice de agresividad de los aislamientos estudiados se utilizó la fórmula descrita por Pliakhnevich & Ivaniuk (2008).

$$IA: (FI*LA*SC)/(IP*LP)$$

Dónde:

IA: índice de agresividad

FI: porcentaje de infección (incidencia) de aislamientos

LA: área de lesión quince días después de la inoculación (mm)

SC: gemación (gemas/lesión)

IP: período de incubación

LP: período de latencia.

Las lecturas se iniciaron 24 horas después de la inoculación de gemas de aislamientos del hongo en hojas, durante quince días.

7 RESULTADOS

7.1 Obtención de aislamientos de *Mycena citricolor* en áreas cafetaleras de Guatemala

Se obtuvieron nueve aislamientos del hongo *M. citricolor*, los cuales provienen de siete departamentos de Guatemala y se listan en el Cuadro 1.

De los departamentos de Suchitepéquez y Chimaltenango se tomaron dos muestras en diferente finca. Los sitios de muestreo fueron seleccionados por presentar condiciones ambientales que favorecen el desarrollo del hongo y altos niveles de severidad de la enfermedad en campo. Así mismo, porque las áreas de donde proceden los aislamientos se encuentran en estudio por parte de ANACAFÉ en investigaciones respecto a la enfermedad ojo de gallo en Guatemala.

En cada sitio de muestreo se colectaron hojas; las cuales mostraban sintomatología causada por el hongo. Las muestras colectadas fueron identificadas con el lugar de procedencia y colocadas en bolsas plásticas transparentes. Posteriormente, fueron trasladadas al laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala, en donde se obtuvieron los aislamientos.

Cuadro 1. Procedencia de aislamientos de *Mycena citricolor*, Guatemala, 2009-2011.

AISLAMIENTO	PROCEDENCIA	ALTITUD (m)	REFERENCIACIÓN		FECHA DE COLECTA
			Longitud	Latitud	
A1	Suchitepéquez	1091	14°31'32''	91°11'36''	septiembre, 2009
A2	Escuintla	654	14°21'55''	90°49'55''	octubre, 2009
A3	Chimaltenango	1619	14°31'56''	90°59'20''	septiembre, 2009
A4	San Marcos	1515	14°55'40''	91°53'22''	septiembre, 2009
A5	Quetzaltenango	1185	14°42'04''	91°34'31''	septiembre, 2009
A6	Chimaltenango	1380	14°29'43''	90°58'17''	octubre, 2009
A7	Retalhuleu	776	14°38'12''	91°33'80''	julio, 2011
A8	Suchitepéquez	758	14°33'20''	91°28'20''	octubre, 2009
A9	Cobán	1280	15°33'25''	90°07'30''	abril, 2010

Los aislamientos se obtuvieron mediante la metodología propuesta por González (2003). Después de 24 horas, se presentó crecimiento micelial del hongo y con ello se purificó la colonia, obteniendo solamente el hongo en estudio para la posterior caracterización y determinación de patogenicidad de los aislamientos obtenidos.

7.2 Estudio *in vitro* de aislamientos de *Mycena citricolor*, provenientes de las principales zonas cafetaleras del país

7.2.1 Crecimiento micelial en diferentes medios de cultivo

El hongo *M. citricolor*, en condiciones *in vitro* tiene crecimiento micelial considerado medio. El micelio se desarrolló ocho a diez días en los medios evaluados. En el análisis de varianza para la variable índice de crecimiento micelial (IVCM) para datos obtenidos del crecimiento del hongo en los medios PDA, EHCA y Saburó a 21 °C, hubo diferencia significativa (Cuadro 2). Lo que indica que el crecimiento del hongo varía de acuerdo al medio utilizado. El coeficiente de variación fue 5.45%, indicando confiabilidad de la información. El IVCM medio más alto fue de 3.55 mm y 3.46 mm con los medios de cultivo EHCA y PDA respectivamente. Con el medio de cultivo saburó, el IVCM fue de 2.12 mm siendo el menor (Cuadro 3). En base a esta información se recomienda incubación del hongo *M. citricolor* a temperatura de 21 °C y utilizar el medio de cultivo PDA ó EHCA para estudios *in vitro*.

Cuadro 2. Análisis de varianza para IVCM de aislamientos de *Mycena citricolor* en diferentes medios de cultivo, 2011.

FUENTES DE VARIACIÓN	SC	GI	CM	F	Pr
<i>Medios de cultivo</i>	3.87	2	1.93	70.19	0.0001*
<i>Error</i>	0.17	6	0.03		
<i>Total</i>	4.03	8			

CV = 5.45%

*Diferencia significativa según medios de cultivo evaluados.

Cuadro 3. Comparación de medias para la variable IVCM (mm) de *Mycena citricolor* en diferentes medios de cultivo, a temperatura de 21 °C, 2011.

Medio de Cultivo	IVCM (mm)	Grupo Tukey ($p \leq 0.05$)*
<i>EHCA</i>	3.55	A
<i>PDA</i>	3.46	A
<i>SABURÓ</i>	2.12	B

*No existe diferencia significativa entre tratamientos con la misma letra.

7.2.2 Crecimiento micelial de *Mycena citricolor* en diferentes temperaturas

El crecimiento micelial de los aislamientos de *M. citricolor* en medio de cultivo PDA, bajo temperatura de 17 °C, 21 °C y 25 °C, en condiciones *in vitro* fue diferente. En el análisis de varianza para la misma variable, hubo diferencia significativa para todas las temperaturas estudiadas (Cuadro 4). El hongo presentó el IVCM medio más alto de 3.52 mm a 21 °C. Así mismo, con temperatura de 17 °C y 25 °C, el hongo tuvo una media de IVCM de 2.27 y 0.19 mm respectivamente (Cuadro 5).

Cuadro 4. Análisis de varianza para la variable IVCM (mm) de aislamientos de *Mycena citricolor* con temperatura de 17 °C, 21 °C y 25 °C, en medio PDA, 2011.

FUENTES DE VARIACIÓN	SC	GI	CM	F	Pr
Temperatura	17.01	2	8.51	1604.64	<0.0001*
Error	0.03	6	0.01		
Total	17.04	8			

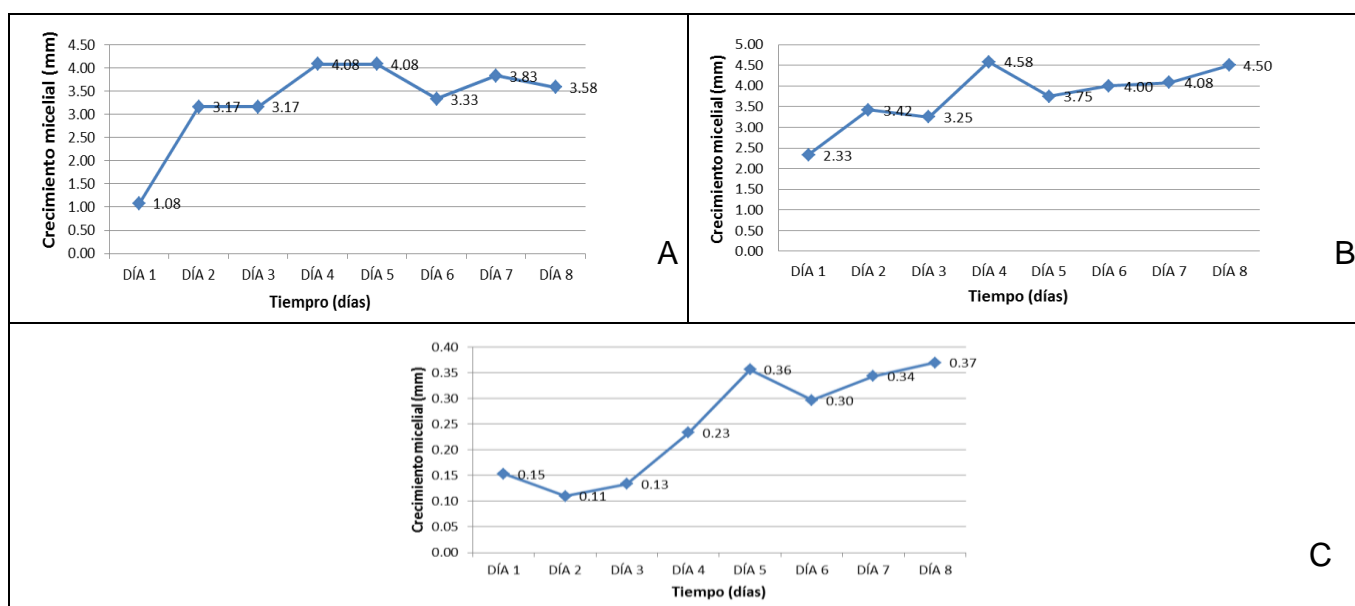
* Diferencia significativa según temperatura evaluada.

Cuadro 5. Comparación de medias para la variable IVCM (mm) de aislamientos de *Mycena citricolor*, a temperatura de 17 °C, 21 °C y 25 °C, en medio PDA, 2011.

Temperatura	IVCM (mm)	Grupo Tukey ($p \leq 0.05$)*
21 °C	3.52	A
17 °C	2.27	B
25 °C	0.19	C

*No existe diferencia significativa entre tratamientos con la misma letra.

El comportamiento de crecimiento micelial diario de *M. citricolor* bajo temperatura de 17 °C, 21 °C y 25 °C, en medio de cultivo PDA, se muestra en la gráfica 1.



Gráfica 1. Crecimiento micelial diario de aislamientos de *Mycena citricolor* en medio PDA: A) 17 °C; B) 21 °C y; C) 25 °C.

Basado en los resultados obtenidos del análisis de crecimiento micelial del hongo en diferente temperatura *in vitro*, se concluye que la temperatura óptima de crecimiento micelial de *M. citricolor* bajo condiciones de laboratorio es de 21 °C. Orozco & Calderón (2009), reportan crecimiento del hongo bajo condiciones de laboratorio a temperatura de 20°C, análogo a lo que acontece en el campo. Así mismo, Wellman (1950), cita que en plantaciones donde la temperatura sobrepasa los 23 °C, el desarrollo del hongo se ve afectado. Resultados similares

fueron obtenidos en este estudio con aislamientos del hongo a temperatura de 25 °C, en donde el desarrollo del hongo se vio afectado en cuanto a crecimiento micelial en medio PDA.

7.2.3 Crecimiento micelial *in vitro* de aislamientos de *Mycena citricolor*

El crecimiento micelial de los nueve aislamientos indicados en el Cuadro 1, evaluado a temperatura de 21 °C y medio de cultivo PDA, fue diferente. Hubo diferencia significativa para la variable IVCM (mm), entre aislamientos evaluados por lo que se realizó una prueba de comparación de medias bajo criterio de Tukey y Scott & Knott (Cuadro 6). Esto indica que existe diferente crecimiento *in vitro* entre aislamientos. El coeficiente de variación fue 6.55%. El aislamiento A1 (Suchitepéquez) presentó IVCM medio más alto 3.52 mm, seguido del aislamiento A9 (Alta Verapaz) con 3.5 mm y el aislamiento A7 (Retalhuleu) mostró el IVCM medio más bajo 2.25 mm (Cuadro 7).

Cuadro 6. Análisis de varianza para la variable IVCM (mm) de aislamientos de *Mycena citricolor* en medio de cultivo PDA a temperatura de 21 °C.

FUENTES DE VARIACIÓN	GI	SC	CM	Valor F	Pr
Tratamiento	8	4.29	0.54	12.1	<0.0001*
Error	18	0.8	0.04		
Total	26	5.09			

CV = 6.55%,

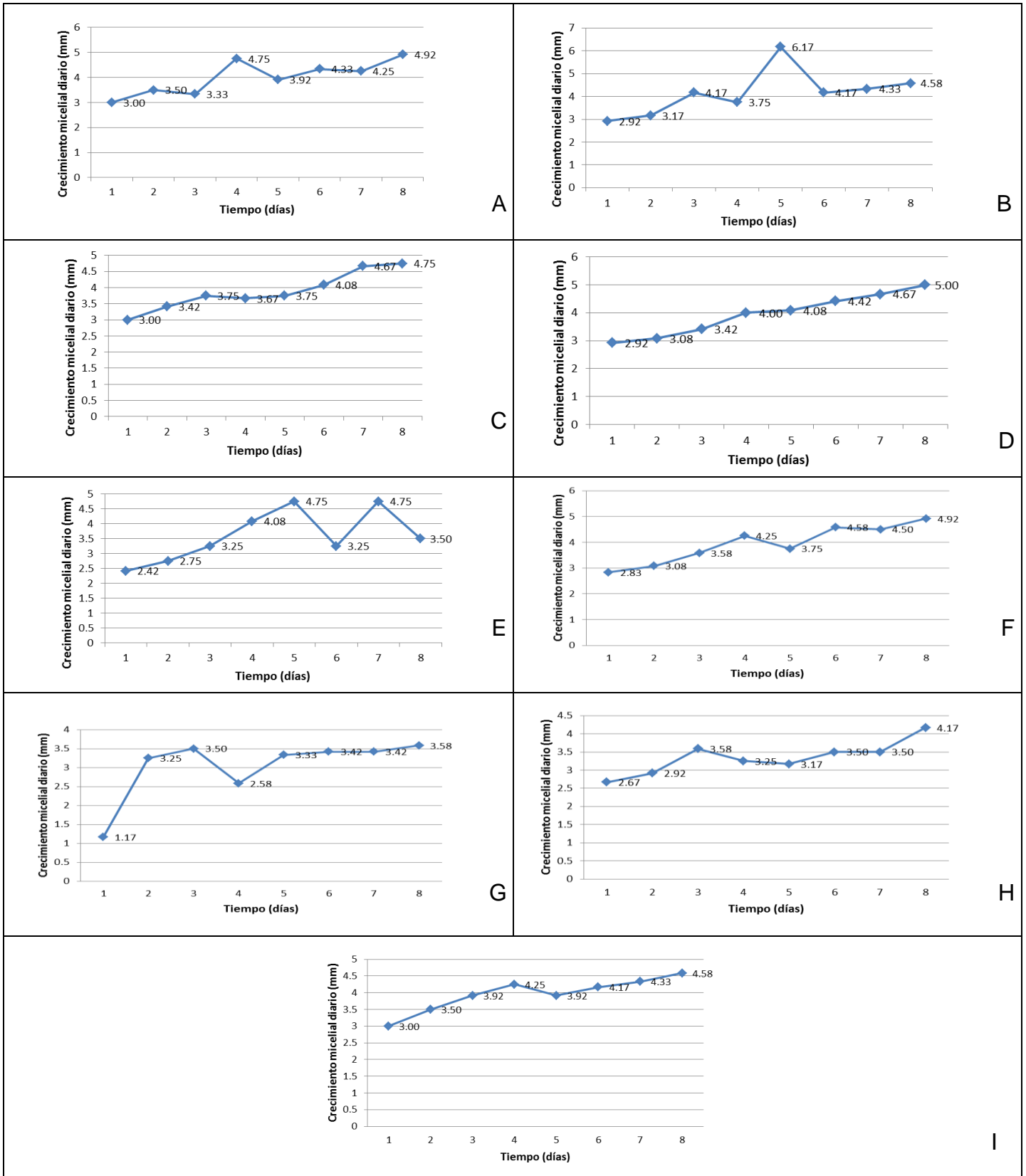
* Diferencia significativa entre aislamientos evaluados.

Cuadro 7. Comparación de medias para variable IVCM (mm) de aislamientos de *Mycena citricolor*, en medio PDA a 21 °C, provenientes de zonas cafetaleras de Guatemala.

AISLAMIENTO	IVCM (mm)	Grupo Tukey ($p \leq 0.05$)	Scott & Knott ($p \leq 0.05$)*
A1	3.52	A	A
A9	3.5	A	A
A2	3.48	A B	A
A3	3.46	A B	A
A4	3.41	A B	A
A6	3.37	A B	A
A8	3.05	A B	B
A5	2.9	B	B
A7	2.25	C	C

*No existe diferencia significativa entre tratamientos con la misma letra.

La gráfica 2, muestra el comportamiento del crecimiento micelial diario de aislamientos de *M. citricolor* a temperatura de 21 °C y medio de cultivo PDA.



Gráfica 2. Crecimiento micelial (mm) diario de nueve aislamientos de *Mycena citricolor* en medio de cultivo PDA a 21 °C: A) Suchitepéquez, finca "Los Andes"; B) Escuintla, finca "Sábana Grande"; C) Chimaltenango, finca "La Soledad"; D) San Marcos, finca "Santa Julia"; E) Quetzaltenango, finca "El Faro"; F) Chimaltenango, finca "Santa Elisa"; G) Retalhuleu, finca "Las Casas"; H) Suchitepéquez, finca "Parraxé"; I) Alta Verapaz, finca "El Manantial".

Basado en la evaluación, los aislamientos A1 y A9 se diferencian de los otros por presentar mejor adaptación al medio y temperatura evaluados. En cuanto al aislamiento A7, que presentó menor IVCM, es probable que requiera otras condiciones para su crecimiento. Romero (1988), menciona que condiciones de incubación como humedad, pH del medio, temperatura, tienen influencia en el desarrollo de un hongo en condiciones *in vitro*.

7.2.4 Coloración de micelio de aislamientos de *Mycena citricolor*

El color del micelio de *M. citricolor* observado visualmente diez días después de la inoculación del hongo en medio PDA y comparado con la tabla de colores de Munsell (1975), fue blanco y sin coloración del sustrato (Figura 4). No se observó variabilidad de coloración del micelio de aislamientos estudiados a temperatura de 21 °C en medio PDA. Resultado similar es reportado por Bonilla (1979); López (2001); Orozco & Calderón (2009), quienes describen que la coloración del micelio de *M. citricolor* en condiciones *in vitro* es blanca en medio PDA. También, Sequeira (1952), reporta el mismo resultado cuando el hongo se desarrolla a temperatura de 20-25 °C. Esta característica de coloración no varió a través del tiempo ni a través de su manipulación en laboratorio. Según estos resultados, el color del micelio es característica fenotípica estable de ésta especie, cuando se manipula en condiciones *in vitro*, algo que no sucede con otras como *Colletotrichum gloeosporoides*, tal como es mencionado por Oliva (2009), que sufren mutaciones al manipularse.

7.2.5 Patrón de crecimiento del micelio de aislamientos *Mycena citricolor in vitro*

Los patrones de crecimiento micelial evaluados de forma visual diez días después de incubación de los aislamientos, a 21 °C en medio de cultivo PDA fue diferente. Se observó patrón de crecimiento con formato anillado, ramificado y algodonoso (Figura 4). Estas características se observaron de forma simultánea entre aislamientos, encontrando que tienen más de un patrón de crecimiento a la vez (Cuadro 8).

La característica que se mantuvo constante en casi todos los aislamientos excepto el A9, fue la presencia de ramificaciones en el micelio. Los aislamientos codificados como A1, A3, A6, A7 y A8, presentaron patrón de crecimiento micelial anillado y ramificado. Los aislamientos presentaron patrones de crecimiento micelial distintos al patrón original 20 días después de la inoculación en medio PDA. Esto es debido a la manipulación en donde ocurren mutaciones. Basado en esta característica, la caracterización del patrón de crecimiento micelial para *M. citricolor* se debe realizar diez días después de la inoculación en medio de cultivo.



Figura 4. Características morfológicas de aislamientos de *Mycena citricolor* en medio de cultivo PDA a 21 °C. Se observa el color de la colonia y patrón de crecimiento del micelio de cuatro aislamientos evaluados. A) micelio ramificado; B) micelio anillado y ramificado; C) micelio anillado, algodonoso y ramificado; D) micelio algodonoso.

Cuadro 8. Patrón de crecimiento del micelio observado en nueve aislamientos de *Mycena citricolor* en medio de cultivo PDA a 21 °C, Guatemala 2011.

Aislamiento	Patrón de crecimiento del micelio
A1	Anillado y ramificado
A2	Ramificado
A3	Anillado y ramificado
A4	Anillado, algodonoso y ramificado
A5	Anillado, algodonoso y ramificado
A6	Anillado y ramificado
A7	Anillado y ramificado
A8	Anillado y ramificado
A9	Algodonoso

7.3 Estudio del estado anamórfico y teleomórfico *in vitro* de *Mycena citricolor*

7.3.1 Gemación, estado anamórfico *in vitro*

Para la gemación *in vitro* de aislamientos de *M. citricolor*, se evaluaron nueve aislamientos del hongo, los cuales fueron descritos anteriormente. Los aislamientos del hongo, tres días después de ser expuestos a luz y humedad produjeron abundantes estructuras parecidas a un alfiler, las cuales según la literatura son llamadas gemas, y corresponden al estado anamórfico del hongo (Figura 5). De acuerdo con Buller (1934), constituye la estructura infectiva del hongo. Cuando placas petri conteniendo el micelio del hongo fueron sometidas a condiciones de oscuridad y sin humedad no se observó gemación. Información análoga fue observada por Buller (1934), donde observó que cultivos de *M. citricolor* en oscuridad crecían normalmente, pero no producían gemas. Una vez estos cultivos fueron expuestos a luz se inició la gemación del hongo. Por ello, se considera que luz y humedad son necesarias en el ciclo de vida del hongo en estudio.

De los aislamientos estudiados, los identificados como A1 y A9 fueron los primeros en producir gemas, posiblemente estos aislamientos reaccionen de mejor forma a la exposición a luz. En el análisis de varianza para las variables número de gemas/cm² emitidas, diámetro de gema (mm) y longitud del pedicelo de la gema (mm), de seis aislamientos estudiados (A1, A2, A3, A4, A5 y A9), se encontró diferencia significativa entre aislamientos tan solo para la variable número de gemas/cm² (Cuadro 9), lo cual indica que algunos aislamientos emiten mayor número de gemas *in vitro*. Los aislamientos A5 y A1, produjeron media de gemas/cm² de 166.83 y 158.78, respectivamente. El aislamiento A3 con media de 74 gemas/cm² fue el que menos estructuras asexuales desarrolló (Cuadro 10).

Cuadro 9. Análisis de varianza para variable número de gemas/cm² en medio de cultivo PDA a 21 °C, correspondiente a seis aislamientos de *Mycena citricolor*.

FUENTES DE VARIACIÓN	SC	GI	CM	F	Pr
Número de gemas/cm ²	23451.29	5	4690.26	7.11	0.0026*
Error	7917.7	12	659.81		
Total	31368.99	17			

CV = 21.26%,

* Hay diferencia significativa entre aislamientos evaluados.

Cuadro 10. Comparación de medias para la variable número de gemas/cm² de seis aislamientos de *Mycena citricolor* en medio PDA y 21 °C.

AISLAMIENTO	Media de número gemas/cm ²	Grupo Tukey ($p \leq 0.05$)	Scott & Knott ($p \leq 0.05$)*
A5	166.83	A	A
A1	158.78	A	A
A9	128.44	A B	A
A2	120.83	A B	A
A4	76	B	B
A3	74	B	B

*No existe diferencia significativa entre tratamientos con la misma letra.

La longitud promedio (60 gemas por aislamiento) del pedicelo y diámetro de gema fue 2.1 mm y 0.3 mm, respectivamente. Los aislamientos descritos como A6, A7 y A8, no presentaron desarrollo de gemas ni pedicelo, lo cual indica que la cantidad de luz usada no fue adecuada para estimular el desarrollo de estructuras anamórficas del hongo. Rodríguez (1965), encontró que la máxima producción de gemas y su coloración amarilla, se da cuando el micelio del hongo es expuesto a longitudes de onda de 310-400 nm.

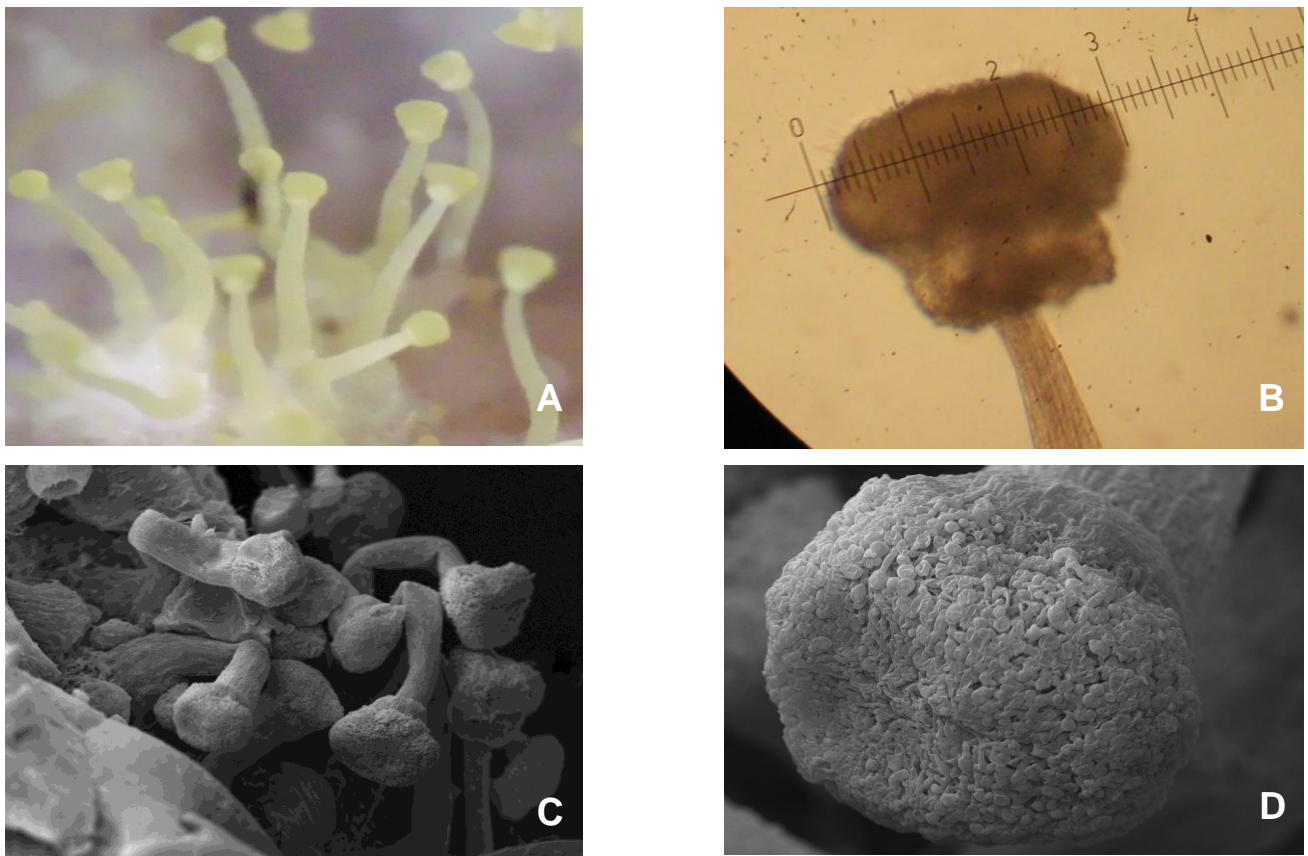


Figura 5. Morfología de gemas de *Mycena citricolor* en medio PDA a 21 °C. A) crecimiento abundante de gemas; B) morfología y diámetro de una gema; C y D) estructura de gemas observada mediante microscopía electrónica de rastreo fotos de ANACAFE.

7.3.2 Caracterización estado teleomórfico

Se contemplaron nueve aislamientos de *M. citricolor* en PDA, 21 °C y oscuridad. Los aislamientos A1, A2, A3, A4, A5, A7 y A9, a los 40-50 días después de la inoculación, bajo las condiciones mencionadas no produjeron gemas, pero si desarrollaron basidiocarpos. Los aislamientos A6 y A8 no produjeron gemas ni basidiocarpos. Los basidiocarpos según Maublanc & Rangel (1914), corresponden a la fase sexual o teleomórfica de *M. citricolor*. Esta estructura tiene forma de sombrilla, color amarillo intenso, consistencia suave característica de hongos Agaricales dentro de Basidiomycota y produce o libera abundantes basidiosporas. En medio de cultivo, fue fácil producirla (Figura 6). Sin embargo, se menciona que en campo es difícil encontrarse (López, 2001). Así mismo, el estado teleomórfico, fue observado en medio de cultivo contaminado con otros hongos, lo que indica que el hongo produce estructuras sexuales bajo condiciones de estrés en el medio. Situación similar fue observada por Salas y Hancock (1972), quienes observaron que el hongo produjo basidiocarpos en medio de cultivo con *Penicillium oxalicum*.

Las características de los basiocarpos formados por aislamientos estudiados de *M. citricolor* en medio PDA, fueron tomadas de la clave de determinación taxonómica de macro-hongos de López (2010) se presentan en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Características del basidiocarpo.

Parte del basidiocarpo	Característica observada	
Píleo	<i>Color</i>	Amarillo pálido
	<i>Tamaño</i>	5 mm
	<i>Forma</i>	Umbilicado
	<i>Superficie</i>	Fibrillosa
	<i>Margen</i>	Sulcado
	<i>Fluorescencia</i>	Presente
Himenio	<i>Color</i>	Amarillo pálido
	<i>Forma de lamelas</i>	Sinuada
	<i>Margen de lamelas</i>	Entero
	<i>Espaciamiento entre lamelas</i>	Subdistante
	<i>Número de lamelas</i>	16
Estípite	<i>Color</i>	Amarillo pálido
	<i>Posición del estípite respecto al píleo</i>	Central
	<i>Forma</i>	Bulboso sin anillo
	<i>Longitud</i>	17 mm
	<i>Superficie</i>	Torcida pubescente
	<i>Consistencia</i>	Suave y mucilaginosa
	<i>Base</i>	Con almohadilla de micelio moderado
	<i>Volva</i>	No presente

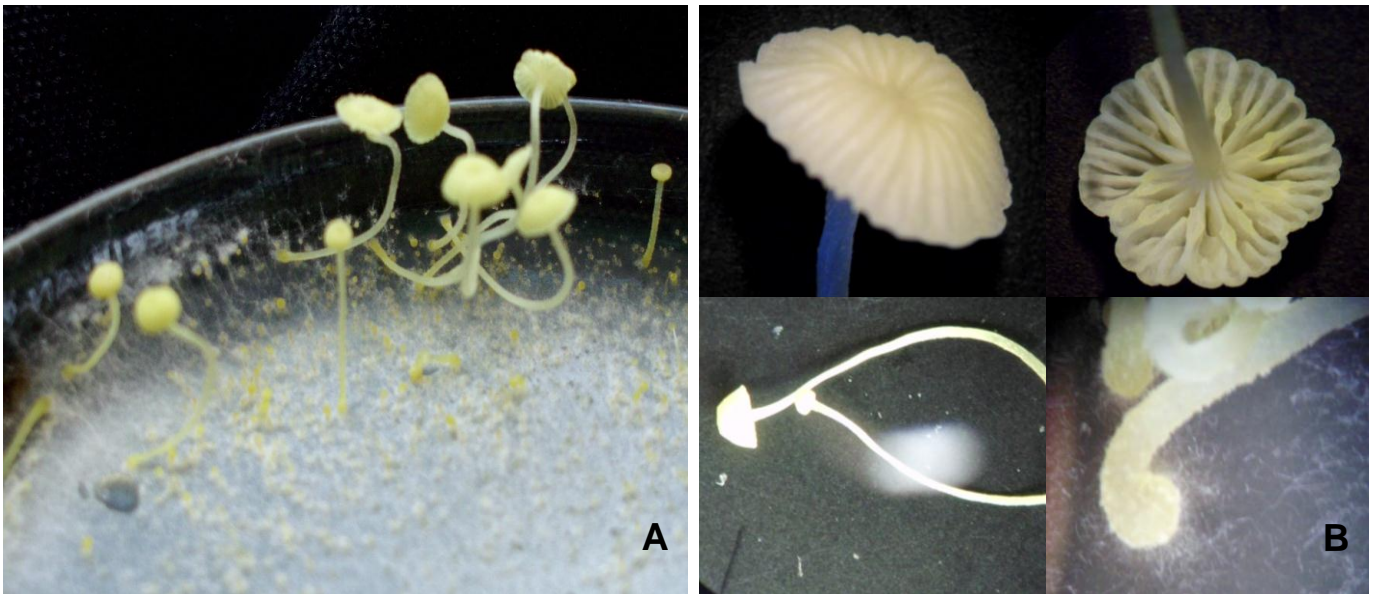


Figura 6. Morfología de basidiocarpos de *Mycena citricolor* en medio PDA a 21 °C. A) Crecimiento abundante de basidiocarpos; B) características de basidiocarpo.

7.3.3 Secuencia de formación de gemas y basidiocarpos de *Mycena citricolor in vitro*

Luego de 24 horas después de la inoculación de gemas del hongo en medio PDA a 21 °C, se observó el crecimiento lateral de hifas. Posteriormente, se motivó la gemación *in vitro* del hongo en las cajas petri con micelio y fueron expuestas a 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad con la adición de agua asperjada encima del hongo. La gemación del hongo se observó tres a cuatro días después que el micelio fue sometido a condiciones anteriormente mencionadas. Se observaron abundantes estructuras asexuales del hongo denominadas gemas. Resultados análogos a los descritos por Orozco et al. (2010), en donde observaron que la fase asexual del hongo en condiciones de laboratorio se desarrolla en un periodo de tres a ocho días.

La fase sexual ó teleomórfica de *M. citricolor* se presentó 40-50 días después de la inoculación del hongo en medio de cultivo PDA a temperatura de 21 °C. Se observó que los basidiocarpos producidos, liberan abundantes basidiosporas, las cuales producen micelio cuando son colocadas en medio de cultivo. Así mismo, cuando estos basidiocarpos fueron colocados en medio de cultivo, generaron micelio en todo el basidiocarpo incluyendo el estípite. Este micelio producido cuando fue expuesto a luz y humedad produjo estructuras asexuales del hongo. La secuencia observada en el estudio se presenta en la Figura 7.



Figura 7. Secuencia de generación de fase asexual y sexual de *Mycena citricolor* *in vitro* en medio de cultivo PDA a 21 °C.

7.4 Estudio de patogenicidad de aislamientos de *Mycena citricolor* en cultivares comerciales e híbridos de café, con diferentes métodos de inoculación del hongo

7.4.1 Evaluación de patogenicidad de aislamientos de *Mycena citricolor* en hojas embrionarias de café

En la inoculación de *M. citricolor* en hojas embrionarias de café, 75 días después de germinada la semilla de los cultivares: catimor, caturra, pache colis, catuaí, bourbón y los híbridos ICATÚ x CATIMOR (15-I-4 cv. 4), ICATÚ x CATIMOR (15-II-5 cv. 4), ICATÚ x CATIMOR (6-IV-5 cv. 9), CATUCAÍ MEZCLA DE LÍNEAS (CIA 1-41-23 cv.73) y CIA mezcla de líneas cv.178, con gemas de *M. citricolor*; se observaron lesiones provocadas por el hongo 24 a 72 horas después de la inoculación de este. Las lesiones consistieron en necrosis de tejido, color marrón a negro con formato circular de diámetro inicial 0.5 mm. Estas lesiones 15 días después de la inoculación, alcanzaron diámetro de 6 a 8.5 mm. Además, se observaron síntomas de hipersensibilidad en hojas embrionarias inoculadas con el patógeno (Figura 8). En el análisis de varianza para la variable diámetro de lesión (mm), no existió diferencia significativa entre el diámetro de lesión provocado por *M. citricolor* en hojas embrionarias de cultivares e híbridos evaluados. Este

resultado puede ser debido a la inoculación del hongo en tejidos no lignificados; ya que las hojas embrionarias inoculadas fueron germinadas bajo condiciones de laboratorio y no fueron expuestas a luz directa durante la germinación. Por lo tanto, éstas son más susceptibles a la penetración del hongo. Estos resultados explican lo encontrado por Tewari et al. (1986), quienes inocularon hojas de café de plantas provenientes de invernadero y campo. Ellos obtuvieron mayor infección con hojas del primer grupo, las cuales estuvieron expuestas a menor intensidad lumínica.

De acuerdo a los resultados obtenidos con este método de inoculación del hongo, se observó que todos los cultivares e híbridos de café evaluados son susceptibles a *M. citricolor*, ya que estos presentaron lesión 15 días después de la inoculación con el hongo.

Por lo tanto, este método de inoculación es recomendado para estudios de patogenicidad de *M. citricolor*, especialmente cuando se introduce una semilla por primera vez al país o a una finca y se desea saber la resistencia para dicho hongo.



Figura 8. Evaluación de patogenicidad de aislamientos de *Mycena citricolor* en hojas embrionarias de café. A) Plántulas de café, 24 horas después de la inoculación con *M. citricolor*; B) flechas muestran necrosis en hojas tres días después de la inoculación; C) síntomas de la enfermedad 10 días después de la inoculación con *M. citricolor*; D) hojas embrionarias de café inoculadas mostrando síntomas de hipersensibilidad.

7.4.2 Estudio de patogenicidad de aislamientos de *Mycena citricolor* en hojas maduras de café

En la evaluación realizada a partir de la inoculación de gemas de *M. citricolor* en hojas maduras de café provenientes de campo, se observaron lesiones iniciales 2 a 6 días después de la inoculación del hongo. Estas fueron aumentando de diámetro día a día hasta alcanzar promedio de 8 a 13.5 mm, 15 días después de la inoculación. En condiciones de campo los diámetros de lesión citados son similares. Buller (1934) y Wellman (1950), citan que en campo el diámetro de lesión en hojas oscila entre 6-10 milímetros.

En el análisis de varianza para la variable diámetro de lesión (mm) existió diferencia significativa entre todos los cultivares e híbridos de café inoculados para dicha variable (Cuadro 12). Los materiales que mayor diámetro de lesión presentaron corresponden al híbrido ICATU x CATIMOR (6-IV-5 cv. 9), seguido de cultivares catuaí y caturra (Cuadro 13). Resultados similares fueron encontrados por Núñez et al. (1995), en donde evaluaron la susceptibilidad a *M. citricolor* en varios cultivares de café bajo condiciones de laboratorio, encontrando que el cultivar caturra presenta susceptibilidad a la penetración del hongo. Orozco et al. (2010), en plantaciones de café en el campo determinaron que los catimores y sarchimores son resistentes a roya del café pero son susceptibles a ojo de gallo. En contraposición, el cultivar caturra presenta cierta resistencia a ojo de gallo pero es susceptible a roya del café, algo que es importante considerar en la planificación de nuevas plantaciones de café.

El cultivar bourbón y el híbrido ICATÚ x CATUAÍ 99 (H-145-17-17 cv.2), presentaron menor diámetro de lesión con 5.69 y 8.16 mm, respectivamente. Núñez et al. (1995), exponen la hipótesis que “el grado de susceptibilidad a la penetración del hongo puede venir del grosor de la cutícula de las hojas de la planta”. Según Kuc (1966), la función de la cutícula es un factor que actúa como resistencia a la entrada de patógenos a la planta.

Núñez et al. (1995), mencionan dos factores a tomar en cuenta para la evaluación de resistencia de cultivares de café a *M. citricolor*: penetración y gemación del hongo. Basado en esta cita se contó el número de gemas producidas por lesión y se realizó análisis de varianza para la variable mencionada en los cultivares e híbridos evaluados. Existió diferencia significativa en el número de gemas emitidas por lesión de cada genotipo inoculado (Cuadro 12). La especie *Coffea liberica* que también fue incluida, presentó media de 13.47 gemas por lesión, lo cual indica es susceptible al hongo en cuanto a gemación. El cultivar caturra y el híbrido ICATU x CATIMOR (6-IV-5 cv. 9) presentan menor grado de susceptibilidad al hongo respecto a la gemación con una media de 2.17 y 2.83 gemas por lesión, respectivamente.

Cuadro 12. Análisis de varianza para la variable diámetro de lesión (mm) en los cultivares evaluados.

FUENTES DE VARIACIÓN	SC	GI	CM	F	Pr
<i>Cultivar</i>	516.95	16	32.31	6.94	<0.0001*
<i>Error</i>	889.09	191	4.65		
<i>Total</i>	3810.74	315			

CV = 22.9%

* Hay diferencia significativa entre aislamientos evaluados.

Cuadro 13. Comparación de medias para las variables diámetros de lesión y número de gemas producidas por aislamientos de *Mycena citricolor* en cultivares de café evaluados *in vitro*.

CULTIVAR	MEDIA DIÁMETRO DE LESIÓN (mm)	GRUPO TUKEY (≤ 0.05)*	Scott & Knott (≤ 0.05)	MEDIA NÚMERO DE GEMAS	GRUPO TUKEY (≤ 0.05)*	Scott & Knott (≤ 0.05)
ICATU x CATIMOR (6-IV-5 cv. 9)	13.38	A	A	2.83	C	C
Catuaí	12.18	A B	A	4.69	B C	C
Caturra	11.48	A B C	B	2.17	C	C
Obatá	11.48	A B C	B	7.56	A B C	B
CATUCAÍ MEZCLA DE LÍNEAS cv.69	10.92	A B C D	B	7.42	A B C	B
ICATU X CATUAÍ 99 (H-140-3-41 cv.8)	10.59	B C D E	B	4.92	B C	C
ICATU x CATIMOR (15-II-5 cv. 4)	9.63	B C D E	C	6.81	A B C	B
CATUCAÍ MEZCLA DE LÍNEAS (CIA 1-41-23 cv.73)	9.41	C D E	C	7.42	A B C	B
Oro Verde	9.3	C D E	C	6.00	B C	C
<i>Coffea liberica</i>	9.18	C D E	C	13.47	A	A
CATUCAÍ 7 (CIA-31-6-16- cv.8)	9.18	C D E	C	9,69	A B	B
ICATU x CATIMOR (15-I-4 cv. 4)	9.13	C D E	C	5.69	B C	C
Tupí	9.07	C D E	C	7.17	A B C	B
CIA MEZCLA DE LÍNEAS cv.178	8.73	D E	C	4.25	B C	C
CATUCAÍ 7 (CIA-1-41-19 cv.3)	8.43	D E	C	4.89	B C	C
ICATU X CATUAÍ 99 (H-145-17-17 cv.2)	8.16	E F	D	7.28	A B C	B
Bourbón	5.69	F	E	4.22	B C	C

*No existe diferencia significativa entre cultivares con la misma letra

Núñez et al. (1995), sugieren que el factor más importante que condiciona la resistencia de la planta a *M. citricolor* viene de diferencias en el número de gemas por lesión.

Tomando este criterio, se concluye que la especie *Coffea liberica* presenta mayor susceptibilidad a *M. citricolor* comparada con el cultivar caturra que muestra resistencia al patógeno, bajo condiciones de laboratorio. Situación similar es observada en campo en donde el cultivar caturra muestra resistencia a la enfermedad. Sin embargo, de momento la especie *C. liberica* únicamente está siendo utilizada como patrón en la realización de injertos.

7.4.3 Evaluación de patogenicidad de aislamientos de *Mycena citricolor* en frutos verdes de café

Se inocularon frutos verdes de café en condiciones *in vitro* de cultivares e híbridos provenientes de ensayos de campo de ANACAFÉ, con gemas de aislamientos de *M. citricolor*. Los primeros síntomas de la enfermedad fueron observados tres días después de inocular el hongo en frutos, en menos del 1% del total de frutos verdes de café inoculados. Los primeros síntomas observados fueron, micelio en la superficie del área inoculada, posteriormente se observaron manchas necróticas en el centro del fruto en donde se inoculó el hongo (Figura 9). Estas manchas aumentaron su diámetro día a día. A los 15 días después de la inoculación, el 8% de los frutos inoculados se encontraban infectados. Se observó que todos los híbridos y cultivares presentaron lesión 15 días después de la inoculación. Según Bonilla (1979), para lograr infección a partir del contacto de gemas del patógeno con frutos, es indispensable procurar las condiciones para su desarrollo, principalmente temperatura y humedad relativa constante y mantener la superficie del fruto la mayor cantidad de tiempo posible mojada. En esta evaluación la superficie de los frutos no se mantuvo mojada de forma constante, por lo tanto la gema se deshidrató y no provocó infección.

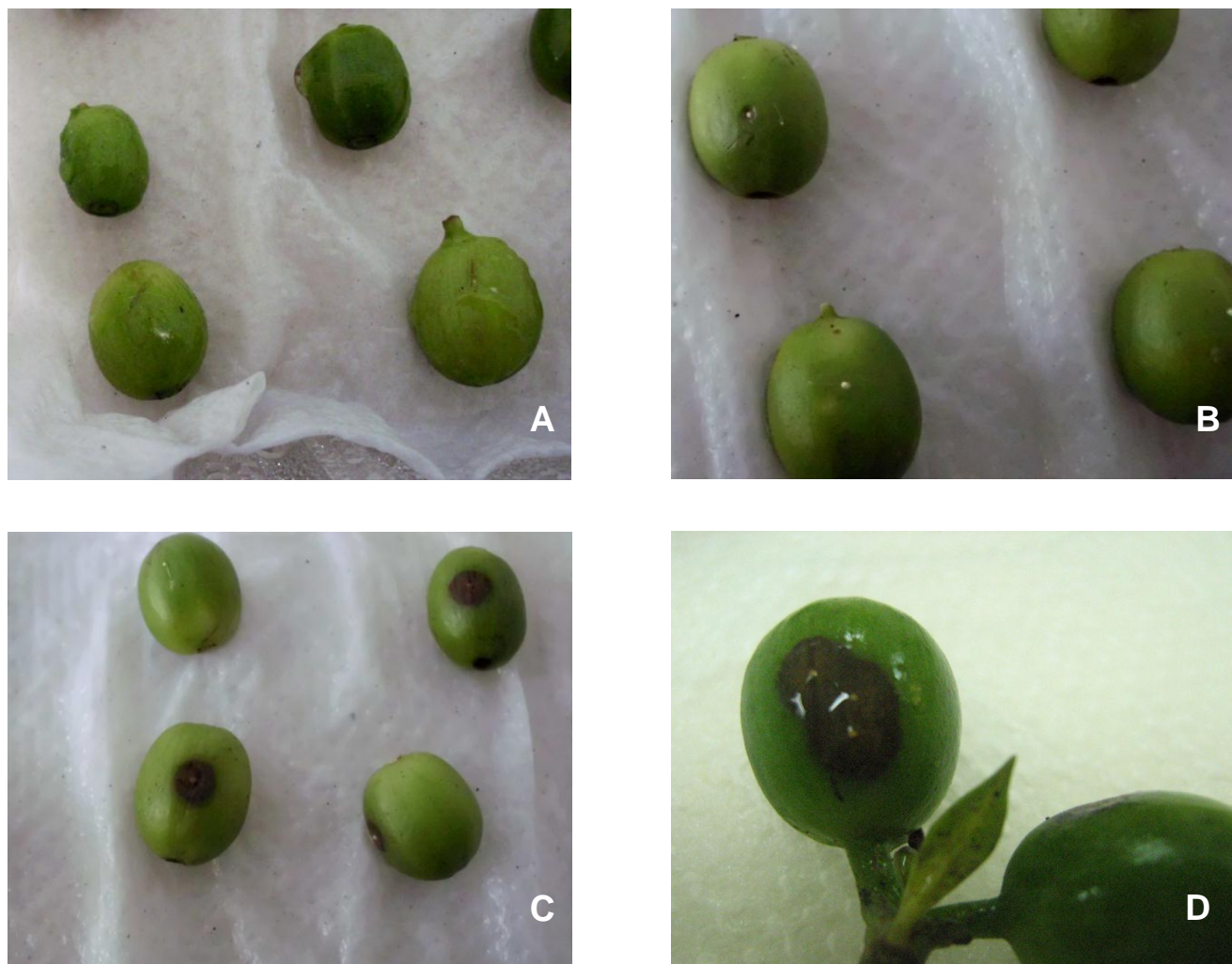


Figura 9. Evaluación de patogenicidad de aislamientos de *Mycena citricolor* en frutos verdes de café: A) Testigo sin inocular, se observa sanidad a los 10 días; B) fruto 3 días después de la inoculación de gemas; C) fruto con 6 días después de la inoculación del hongo, se observa necrosis; y D) fruto 10 días después de la inoculación del hongo.

7.5 Evaluación del índice de agresividad de aislamientos de *Mycena citricolor*

Los resultados corresponden al estudio de nueve aislamientos de *M. citricolor* procedentes de diferentes regiones cafetaleras del país, estos resultados muestran diferencias entre los aislamientos en todas las variables evaluadas. El período de incubación (PI) es el tiempo comprendido desde la infección hasta el apareamiento de síntomas visibles. En esta evaluación aislamientos de *M. citricolor* al ser inoculados en hojas maduras de café, provocaron lesión 2 a 6 días después de la inoculación (Gráfico 3.A), los aislamientos A5 y A8 causaron lesión 2 días después de la inoculación y el aislamiento A6 causó lesión 6 días después. Mediante microscopía electrónica de rastreo se observó la estructura asexual del hongo. Muestras analizadas revelan que la gema está compuesta por abundante micelio. A las

12 horas después de la inoculación se observa una producción masiva de micelio proveniente de una gema; cualidad que permite al hongo una alta capacidad para provocar infección (figura 10). De esta forma se concluye que el proceso de infección del hongo se da en menos de 6 horas después de su inoculación en hojas maduras de café, y síntomas de la enfermedad son observados 2 a 6 días después de la inoculación del hongo en hojas maduras de café.

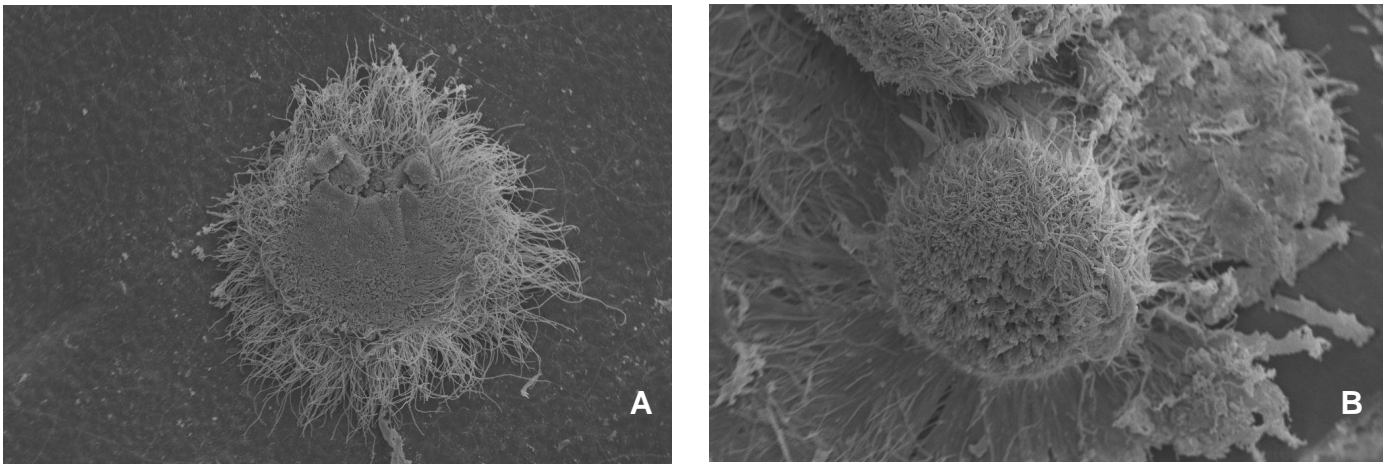
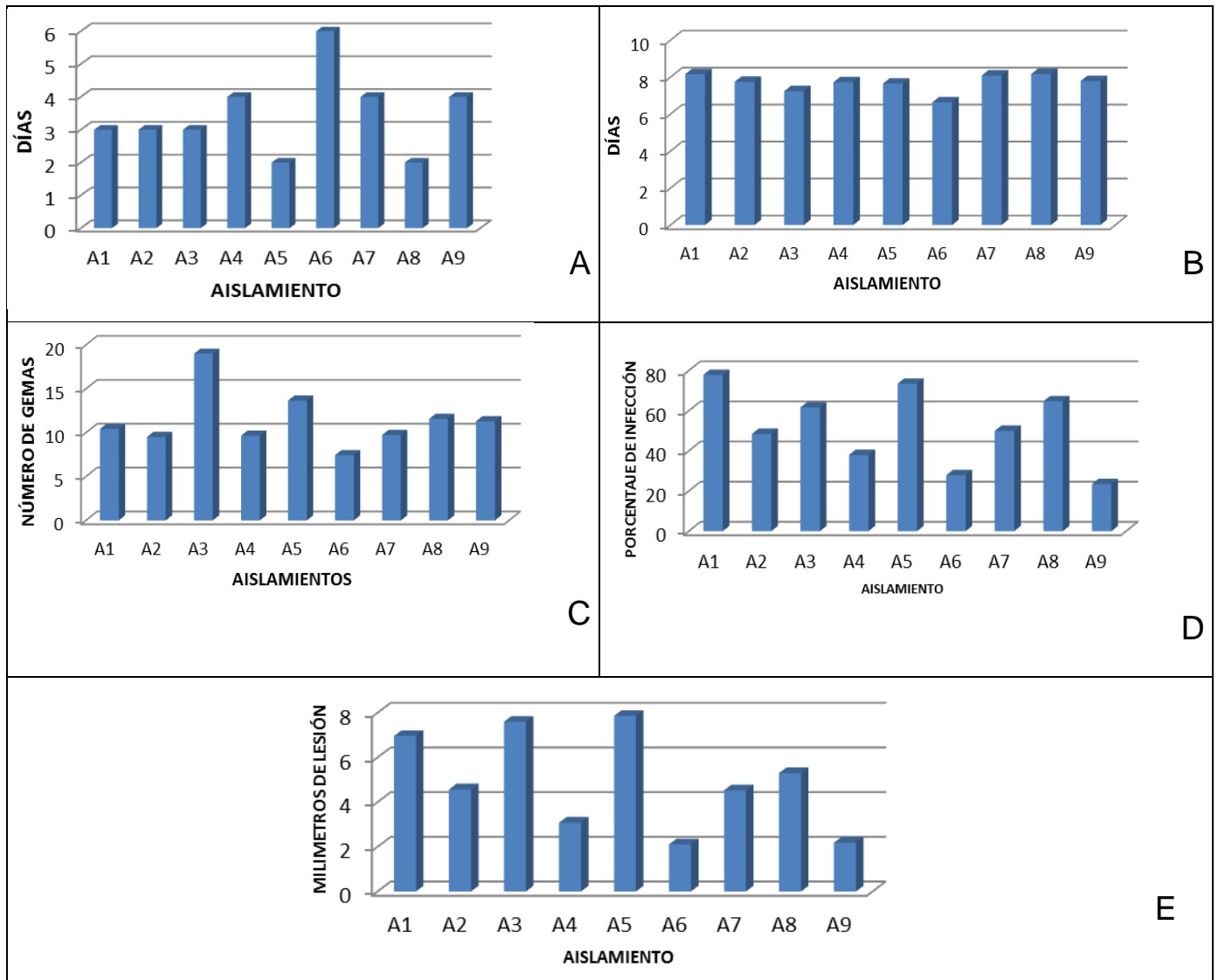


Figura 10. Fotos de microscopía electrónica de rastreo, en el estudio de inoculación de gemas de *Mycena citricolor* en hojas maduras de café. A) Se observa desarrollo de hifas a partir de la gema inoculada, 6 horas después de la inoculación en hoja de café; B) mayor crecimiento de hifa en la hoja 12 horas después de la inoculación en hoja de café. Fotografías propiedad de ANACAFÉ.

Al estudiar el período de latencia (PL), tiempo de crecimiento del hongo hasta formación de estructuras reproductivas del hongo, se encontró que la aparición de gemas oscila entre 6 a 8 días después de la aparición de síntomas (Gráfico 3.B), en condiciones de laboratorio. Datos similares fueron obtenidos por Vargas (2000), quien concluye que la aparición de gemas se da en un periodo de 8 días después de la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad. El número de gemas fue de 6 a 19 gemas en promedio y el número de gemas depende del tamaño de lesión en la hoja (Gráfico 3.C). El aislamiento A3 fue el aislamiento que mayor número de gemas produjo (19 gemas) y el aislamiento A6 produjo promedio de 6 gemas por lesión, siendo el aislamiento que menor número de gemas produjo. Se observa que hubo alta variabilidad en el proceso de infección entre los aislamientos estudiados ya que se obtuvo un porcentaje máximo de 80% y un mínimo de 23.5% de infección (gráfico 3.D). El tamaño de lesión provocada por aislamientos de *M. citricolor*, 15 días después de la inoculación, oscila en promedio 2.1 y 7.8 mm de diámetro (Gráfico 3.E), en donde el aislamiento A5 produjo diámetros de lesión con promedio de 7.8 mm y los aislamientos A6 y A9 produjeron los diámetros más pequeños con promedio de 2.1 mm.



Gráfica 3. A) Período de incubación de aislamientos de *Mycena citricolor*; B) período de latencia de aislamientos; C) número de gemas por lesión de aislamientos; D) frecuencia de infección de aislamientos de *M. citricolor*, y E) área de lesión provocada por gemas de aislamientos de *M. citricolor* en hojas de café.

Con los resultados descritos anteriormente, se determinó el índice de agresividad de aislamientos de *M. citricolor* mediante criterios de la tabla 1, los cuales fueron descritos por Pliakhnevich & Ivaniuk (2008).

INDICE DE AGRESIVIDAD	NIVEL DE AGRESIVIDAD
<1-2	BAJO
3-4	MEDIO
> 5	ALTO

Tabla 1. Niveles de agresividad descritos por Pliakhnevich & Ivaniuk (2008).

Cuadro 14. Nivel de agresividad de los aislamientos de *Mycena citricolor* estudiados y obtenidos según propuesta de Pliakhnevich & Ivaniuk (2008).

AISLAMIENTO	% IA*	NIVEL DE AGRESIVIDAD
A1	2.31	BAJO
A2	0.91	BAJO
A3	4.1	MEDIO
A4	0.37	BAJO
A5	5.16	ALTO
A6	0.11	BAJO
A7	0.68	BAJO
A8	2.43	BAJO
A9	0.19	BAJO

*porcentaje índice de agresividad de aislamientos

Basados en los resultados obtenidos, se permite concluir que la agresividad de aislamientos de *M. citricolor*, es decir su capacidad de penetración, difusión en el hospedero y de crecimiento en los tejidos hasta su reproducción es variable. Este estudio determinó que los aislamientos A1, A2, A4, A6, A7, A8 y A9 poseen una agresividad baja. Esto quiere decir que estos aislamientos estudiados comparten características similares en cuanto al tamaño de la lesión, días necesarios para la formación de las lesiones y para iniciar el proceso de formación de gemas. El aislamiento A3 tuvo un nivel de agresividad medio. Por otra parte el aislamiento A5 posee un índice de agresividad superior a 5 indicando que tiene un nivel de agresividad alto, por lo tanto tarda menor tiempo en iniciar la formación de gemas y a la vez alcanza un mayor número de gemas en las lesiones, respecto a los aislamientos que tienen un índice de agresividad bajo. Es recomendable estudiar este aspecto con técnicas moleculares para profundizar más respecto a variabilidad genética de los aislamientos.

8 CONCLUSIONES

- Fueron estudiados nueve aislamientos de *Mycena citricolor* provenientes de diferentes regiones productoras de café en Guatemala. La temperatura óptima de crecimiento micelial *in vitro* fue de 21 °C en medio de cultivo PDA o EHCA. La coloración del hongo fue blanco, patrón de crecimiento micelial anillado, ramificado y algodonoso, la fase anamórfica consiste en gemas de color amarillo con poca variabilidad morfológica, con gemación abundante y la fase teleomórfica un basidiocarpo amarillo, diminuto, consistencia suave y mucilaginoso, favorecido por condiciones de estrés.
- Los aislamientos de *Mycena citricolor* estudiados fueron considerados patogénicos en hojas embrionarias y hojas maduras de siete variedades y diez híbridos de dos especies de café evaluados. Se encontró diferencia significativa en cuanto a la patogenicidad de los aislamientos del hongo con nivel de agresividad alto. La prueba en frutos verdes de café no fue efectiva para determinar patogenicidad de aislamientos. El periodo de incubación en hojas determinado *in vitro* fue de 2 a 6 días y el periodo latente de 6 a 8 días.

9 RECOMENDACIONES

- Utilizar los medios de cultivo PDA ó EHCA con temperatura de incubación de 21 °C para estudios de *Mycena citricolor* en condiciones *in vitro*.
- Promover el método de inoculación de gemas de *M. citricolor* en hojas embrionarias o maduras de café *in vitro* para determinar patogenicidad de aislamientos, determinación de resistencia en genotipos de café y evaluación de fungicidas.
- Realizar caracterización molecular de *M. citricolor* con mayor número de aislamientos.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. ANACAFE (Asociación Nacional del Café, GT). 1991. Manual de caficultura. Guatemala. 169 p.
2. _____. 1998. Manual de caficultura. Guatemala. 318 p.
3. _____. 2006. Guía técnica de caficultura. Guatemala. 213 p.
4. _____. 2007. Mercados externos y mercado interno: amplios espacios para el mercado guatemalteco de calidad. *El Cafetal (GT)* no. 7(julio):14-15.
5. _____. 2009. Año cafetalero 2008-2009: satisfacción por los resultados, comprometidos ante los nuevos retos. *El Cafetal (GT)* no. 12 (diciembre):12-13.
6. Avelino, J; Toledo, JC; Medina, B. 1992. Desarrollo del ojo de gallo (*Mycena citricolor*) y evaluación de daños en el norte de Guatemala. Guatemala, ANACAFÉ. p. 33-39.
7. Barquero Miranda, M. 2004. Algunas consideraciones sobre el ojo de gallo. *Revista Informativa ICAFE* 2(43):11-15.
8. Bonilla, JC. 1979. Estudio de la epifitología del ojo de gallo causada por el hongo *Omphalia flavida*. El Salvador, ISIC. 25 p.
9. Borbón, O. 1999. Consideraciones sobre la problemática del ojo de gallo en Costa Rica. *In* Congreso Nacional Agronómico (11, 1999, CR); Congreso Nacional de Fitopatología 1999, (CR). San José, Costa Rica, CICAPE. p. 5.
10. Braga, A; Gontijo, P. 2000. Sistema radicular do cafeeiro: estrutura, distribuição, atividade e fatores que o influenciam. Brasil, Empresa de Pesquisa Agropecuaria de Minas Gerais. 79 p. (Serie Documentos no. 37).
11. Buller, AHR. 1934. *Omphalia flavida*, a gemmiferous and luminous leaf-spot fungus. *Researches on Fungi* 6:397-443.
12. Flores Vindas, E. 1999. La planta: estructura y función. Cartago, Costa Rica, Editorial Tecnológica de Costa Rica. 365 p. (Libro Universitario Regional).
13. González Vargas, M. 2003. Cultivo *in vitro* de ojo de gallo. Costa Rica, CATIE, Hoja Técnica no. 44. *In* Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (CR) no. 67:91-93.
14. Guharay, F; Monterrey, J; Monterroso, D; Staver, C. 2000. Manejo integrado de plagas en el cultivo de café. Managua, Nicaragua, CATIE. 267 p. (Manual Técnico no. 44).
15. Haarer, AE. 1977. Producción moderna de café. 2 ed. México, CECOSA. 625 p.
16. Jones, S. 1987. Sistemática vegetal. 2 ed. México, McGraw Hill. 527 p.

17. Kirk, PM; Cannon, JC; Stalpers, JA. 2008. Ainsworth & Bisbys dictionary of the fungi. Great Britain, CAB. 771 p.
18. Kuc, J. 1966. Resistance of plants to infectious agentes. Annual Review of Microbiology 20:337-370. Citado por: Tewari, JP; Rao, DV; Vargas, E. 1986. Estudio preliminar sobre el modo de penetración de *Mycena citricolor* en la hoja de cafeto. Agronomía Costarricense 10(1/2):199-202.
19. López, AA. 2001. Caracterización molecular y morfológica de aislamientos del hongo *Mycena citricolor* colectados en diferentes zonas cafetaleras de Costa Rica. Tesis MSc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 103 p.
20. López, R. 2010. Determinación taxonómica de macrohongos. Guatemala, USAC, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 60 p.
21. Maublanc, A; Rangel, E. 1914. Le *Stilbum flavidum* Cooke, forme avorté de *Omphalia flavida* n.sp. Bulletin de la Sociedad Mycológica (FR) 30:41-47.
22. Medina, BY. 2001. Manejo integrado del ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en el cultivo del cafeto (*Coffea arabica*) base para la elaboración de un manual técnico. Guatemala, ANACAFÉ. 39 p.
23. Mondadori, A.1977. Simon & Schuster's guide to trees. New York. Estados Unidos. Simon & Schuster. 299 p.
24. Morales R, RA. 2001. Ciclo biológico y control químico del ojo de gallo (*Mycena citricolor* Berk & Curt) en el cultivo de café, finca Patio de Bolas, San Felipe, Retalhuleu, Guatemala. Tesis Ing. Agr. Mazatenango, Guatemala, USAC. 73 p.
25. Núñez, C; Bertrand, B; Vargas, L; Avelino, J. 1995. Estudio preliminar sobre el modo de inoculación del hongo *Mycena citricolor* (ojo de gallo) sin heridas en la hoja del cafeto: importancia de diferentes factores que intervienen en la penetración. In Simposio de Caficultura Latinoamericana (16, 1995, CR). Costa Rica, IICA. s.p.
26. Oliva, CA. 2009. Caracterización morfológica, patogénica, y bioquímica de aislamiento de *Colletotrichum* spp. asociado al cultivo de café (*Coffea arabica*) en Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 43 p.
27. Oliveira, JA. 1991. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentao (*Capsicum annum* L.). Tese MSc. Lavras, Brasil, Universidade Federal de Lavras. p. 111. Citado por: Oliva, CA. 2009. Caracterización morfológica, patogénica y bioquímica de aislamiento de *Colletotrichum* spp. asociado al cultivo de café (*Coffea arabica*) en Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 43 p.
28. Orozco M, EF. 2003. Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogénica de isolados de *Colletotrichum* spp. associadis ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae*. Tese PhD. Minas Gerais, Brasil, UFLA. 147 p.
29. _____. 2008. Enfermedades del cultivo de café. El Cafetal (GT) no. 7 (julio):7.

30. Orozco, E; Calderón, G. 2010. Biología de *Mycena citricolor* y su asociación en café para Guatemala. Guatemala, ANACAFÉ. 14 diapositivas.
31. Orozco, E; Figueroa, P; García, J; Peñate, L; Pacheco, A; Calderón, G. 2010. Características de la enfermedad ojo de gallo: causa daños durante la época lluviosa pero se puede prevenir durante la época seca. El Cafetal (GT) no. 3 (marzo):3-7.
32. Orozco, E; Leal, S. 2009. Evaluación de productos biológicos y químicos en el manejo de ojo de gallo, en finca La Soledad, Acatenango, Chimaltenango. Guatemala, ANACAFE. 1 CD.
33. Orozco, E; Pacheco S, AR. 2009. Estudio temporal y espacial de ojo de gallo en fincas de la costa sur, Sacatepéquez y Chimaltenango, 2009. Guatemala, ANACAFE. 1 CD.
34. Pliakhnevich, M; Ivaniuk, V. 2008. Agressiveness and Metalaxyl sensitivity of *Phytophthora infestans* strains in Belarus. Zemdirbyste-Agriculture 95(3):379-387.
35. Rao, D; Tewari, JP. 1987. Production of oxalic acid by *Mycena citricolor*, causal agent of the american leaf spot of coffee. Phytopathology 75:1374.
36. Rodríguez, CJ. 1965. Physiological studies on the american leaf spot of coffee and on its causal agent *Mycena citricolor*. Thesis PhD. Madison, US, University of Wisconsin, 71 p.
37. Romero, CS. 1988. Hongos fitopatógenos. México, Universidad Autónoma de Chapingo. 347 p.
38. Salas, JA; Hancock, JG. 1972. Production of the perfect stage of *Mycena citricolor* (Berk. & Curt.) Sacc. Hilgardia 41:213-234.
39. Sánchez C, JC. 1998. Caficultura moderna. 5 ed. Guatemala, s.e. 262 p. (Serie Comunicación Agrícola).
40. Sequeira, L. 1952. Studies on *Omphalia flavida*, the agent of the american leaf spot of coffee. Thesis PhD. Berkeley, US, University of California. 117 p. Citado por Wang A, AJ. s.f. Ojo de gallo del cafeto (*Mycena citricolor* Berk & Curt.), desafíos de la caficultura en Centroamérica. Costa Rica, IICA.
41. Tewari, JP; Rao, DV; Vargas, E. 1986. Estudio preliminar sobre el modo de penetración de *Mycena citricolor* en la hoja de cafeto. Agronomía Costarricense 10(1/2):199-202.
42. Vargas, CL. 2000. Determinación de la enzima trehalasa en el hongo *Mycena citricolor*. In Simposio Latinoamericano de Caficultura (19, 2000, San José, Costa Rica). Memorias. San José, Costa Rica, IICA / Promecafé / ICAFE. p. 355-364.
43. Vargas, L; Sánchez, E; Iwasawa, H. 2000. Microscopía electrónica de barrido del ojo de gallo en el cultivo de café. In Simposio Latinoamericano de Caficultura (2000, CR). Memorias. San José, Costa Rica, IICA. p 27.

- 44. Wang, A. 1994. Aplicación de principios epidemiológicos para el combate de ojo de gallo en cafeto. Costa Rica, Universidad de Costa Rica, Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos. 25 p.
- 45. Wang, A; Avelino, J. 1999. Ojo de gallo del cafeto (*Mycena citricolor* Berk & Curt.) en desafíos de la caficultura en centroamérica. In Bertrand, B; Rapidel, B. 1999. Desafíos de la caficultura en Centroamérica. San José, Costa Rica, IICA / PROMECAFE / CIRAD. p. 243-260.
- 46. Wellman, FL. 1950. Dissemination of *Omphalia* leaf spot of coffee. Turrialba 1(1):12-27.



No. 130. Rolando Barríos.

- 35. Rao, D; Tewari, JP. 1987. Production of oxalic acid by *Mycena citricolor*, causal agent of the american leaf spot of coffee. Phytopathology 75:1374
- 36. Rodriguez, CJ. 1985. Physiological studies on the american leaf spot of coffee and on its causal agent *Mycena citricolor*. Thesis PhD. Madison, US, University of Wisconsin, 71 p.
- 37. Romero, CS. 1988. Hongos fitopatógenos. México, Universidad Autónoma de Chapingo. 347 p.
- 38. Salas, JA; Hancock, JC. 1972. Production of the perfect stage of *Mycena citricolor* (Berk. & Curt.) Sacc. Hígeridia 41:213-234
- 39. Sánchez, C, JC. 1988. Caficultura moderna. 5 ed. Guatemala, s.e. 282 p. (Serie Comunicación Agrícola)
- 40. Seduira, L. 1982. Studies on *Omphalia flavida*, the agent of the american leaf spot of coffee. Thesis PhD. Berkeley, US, University of California. 117 p. Citado por Wang, A, AJ. s.t. Ojo de gallo del cafeto (*Mycena citricolor* Berk & Curt.), desafíos de la caficultura en Centroamérica. Costa Rica, IICA.
- 41. Tewari, JP; Rao, DV; Vargas, E. 1986. Estudio preliminar sobre el modo de penetración de *Mycena citricolor* en la hoja de cafeto. Agronomía Costarricense 10(1/2):199-202.
- 42. Vargas, CL. 2000. Determinación de la enzima trehalasa en el hongo *Mycena citricolor*. In Simposio Latinoamericano de Caficultura (19. 2000, San José, Costa Rica). Memorias. San José, Costa Rica, IICA \ Promecafé \ ICAFE. p. 355-364.
- 43. Vargas, L; Sánchez, E; Iwasawa, H. 2000. Microscopía electrónica de barrido del ojo de gallo en el cultivo de café. In Simposio Latinoamericano de Caficultura (2000, CR). Memorias. San José, Costa Rica, IICA. p. 27.

ANEXO 1**Composición de medios de cultivo utilizados para prueba de IVCM con diferentes medios de cultivo, 2011**

1. PDA (papa dextrosa agar)

39 gr de PDA marca Merk®

1000 ml de agua destilada

2. EHCA (Extracto de hojas de café)

15 gr de hojas sanas de café licuadas

20 gr Agar

1000 ml de agua destilada

3. Saburó

30 gr Glucosa ó maltosa

10 gr Peptona

20 gr Agar

1000 ml de agua destilada



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA -FAUSAC-
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS
Y AMBIENTALES -IIA-



REF. Sem. 03/2012

LA TESIS TITULADA:

"CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DEL HONGO *Mycena citricolor* Berk & Curt, CON AISLADOS OBTENIDOS DE CULTIVARES DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) PROVENIENTES DE LAS DIFERENTES ZONAS CAFETALERRAS DE GUATEMALA, C.A."

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE:

JORGE WALDEMAR GARCÍA TÚCHEZ


CARNE:

200530326

HA SIDO EVALUADO POR LOS PROFESIONALES:

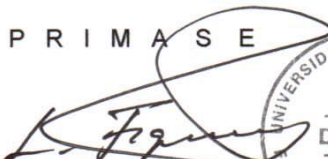
Ing. Agr. Manuel de Jesús Martínez Ovalle
Ing. Agr. Guillermo García

El Asesor y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha cumplido con las Normas Universitarias y Reglamentos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.


Dr. Edin Francisco Orozco Miranda
A S E S O R


MSc. Manuel de Jesús Martínez Ovalle
DIRECTOR DEL IIA

I M P R I M A S E


Dr. Lauriano Figueroa Quiñonez
D E C A N O



AGH/nm
c.c. Archivo