



Universidad Autónoma del Estado de México
UAEM



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Ciencias

Doctorado en Ciencias

(Biología)

“Caracterización del Complejo Parasítico Causante de la Corchosis de la Raíz del
Cafeto en México”,

T E S I S

Que para obtener el grado de doctor en ciencias

presenta:

José Daniel López Lima

Comité de tutores

Dra. Petra Sánchez Nava

Dra. Gloria Luz L. Carrión Villarnovo

Dr. Luc Villain

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Marzo 2017





Resumen. La corchosis de la raíz del café asociada a la infección de nematodos del género *Meloidogyne* en un importante problema para la producción de café en México, particularmente en el estado de Veracruz, donde anualmente se han registrado considerables pérdidas en las plantaciones de *Coffea arabica* a causa de esta enfermedad. En estudios anteriores donde se examinó el patrón perineal de las hembras de *Meloidogyne* se identificó a *Meloidogyne incognita* como la especie asociada a la corchosis de la raíz del café en Veracruz. Además otros estudios revelaron la incidencia de hongos en los tejidos afectados de las raíces que podrían interactuar con el nematodo en el desarrollo de la enfermedad, sin embargo, las especies de estos hongos no han sido determinadas. El objetivo de este trabajo fue identificar a nivel de especie los nematodos y hongos asociados a la corchosis de la raíz del café en Veracruz. Las muestras se colectaron de plantas de café con corchosis de la raíz en ocho sitios distribuidos a lo largo de la mayor zona de producción de café en el estado de Veracruz. Las poblaciones de *Meloidogyne* obtenidas de las raíces fueron caracterizadas mediante un PCR múltiple utilizando marcadores específicos para las tres especies de *Meloidogyne* más importantes en Latinoamérica: *M. exigua*, *M. incognita* y *M. paranaensis*. Además, se aislaron hongos de los tejidos con corchosis de los mismos sitios de muestreo y fueron determinados mediante técnicas moleculares. *Meloidogyne paranaensis* fue la única especie de nematodo encontrada en los ocho sitios de muestreo y se reporta por primera vez en México. En los tejidos con corchosis de la raíz del café se observó abundante micelio y conidios en contraste con las raíces sanas. En total se aislaron 49 hongos de los tejidos afectados, de los cuales *Fusarium oxysporum* fue la especie más frecuente y fue seleccionada para realizar los experimentos posteriores. Los diferentes aislamientos de *F. oxysporum* presentaron variación en sus características morfológicas pero no en el análisis genalógico. Todos los aislamientos de *F. oxysporum* lograron colonizar el sistema vascular de plantas de *C. arabica* pero no causaron síntomas de marchitamiento. El papel funcional de *F. oxysporum* en el desarrollo de la corchosis de la raíz del café debe ser más estudiado. La industria cafetera en México debería poner más atención en esta muy destructiva enfermedad, particularmente a nivel profiláctico para evitar su diseminación a través de las plantas de vivero.





Abstract. The coffee corky-root disease associated with root-knot nematode infection is a major concern for coffee production in Mexico, particularly in the Veracruz State where substantial losses from *Coffea arabica* plantations are reported annually due to this disease. Previous studies based on perineal patterns of *Meloidogyne* females identified *M. incognita* as the species responsible for coffee corky root disease in this state. Also, previous studies have revealed the incidence of fungi in the tissues of the affected roots that could interact with the nematode to origin the development of the disease, although the species of fungi associated with plants with the coffee corky-root disease are not known. The objective of this work was to isolate and identify to a specie level the nematode and the fungi associated to coffee roots with the corky-root disease in Veracruz. The samples were collected from coffee plants with corky root symptoms in eight sites distributed through the major coffee growing region of Veracruz State. *Meloidogyne* populations were characterized by multiplex PCR using sequence-characterized amplified region (SCAR) markers for the three major coffee *Meloidogyne* species in Latin America: *M. exigua*, *M. incognita* and *M. paranaensis*. Likewise, fungi were isolated from the corky tissues from the same sampling sites and were determined by molecular techniques. *M. paranaensis* was the only species present on all eight coffee samples and is reported here for the first time in Mexico. In the tissues with the coffee corky-root disease was observed abundant mycelium and conidia in contrast with healthy roots. From the samples 49 isolations were obtained, which *Fusarium oxysporum* was the most frequent specie, so it was selected for the posterior experiments. The different strains of *F. oxysporum* presented a variation in the morphological characteristics but none in the genealogical analysis. All the strains of *F. oxysporum* achieved to colonize the vascular system of the plants even thought none caused wilt symptoms. The functional role of *F. oxysporum* in the development of coffee corky-root disease should be further studied. The coffee industry in Mexico should focus more attention to this very destructive disease, particularly at the prophylactic level to avoid its dissemination via nursery seedlings.





CONTENIDO	Página
1 Introducción General.....	1
2 Antecedentes.....	2
3 Justificación.....	5
4 Hipótesis.....	6
5 Objetivos.....	6
5.1 Objetivo general.....	6
5.2 Objetivos específicos.....	6
6 Metodología general.....	6
6.1 Toma de muestras.....	6
6.2 Extracción y determinación de nematodos.....	7
6.3 Aislamiento y determinación de hongos.....	7
6.4 Prueba de resistencia de siete híbridos de <i>Coffea arabica</i> a <i>Meloidogyne paranaensis</i>	7
7 Resultados.....	8
7.1 Corky-root symptoms for coffee in central Veracruz are linked to the root-knot nematode <i>Meloidogyne paranaensis</i> , a new report for México.....	8
7.2 Description of coffee tissues infested by <i>Meloidogyne paranaensis</i> , and characterization of associated fungi potentially involved in the coffee corky-root disease in Mexico.....	20





7.3 Colonización vascular de <i>Fusarium oxysporum</i> en plantas de <i>Coffea arabica</i>	39
7.4 Validación de variedades resistentes al nematodo <i>M. paranaensis</i> responsable de la corchosis de la raíz del café.....	48
8 Discusión general	56
9 Conclusiones	57
10. Bibliografía general	58



1 Introducción general

El café es una planta perteneciente a la familia de las Rubiáceas, el género *Coffea* L. tiene mas de 100 especies registradas siendo las más conocidas *C. arabica* y *C. canephora*. La especie arábica es un alotetraploide con 44 cromosomas, auto-fértil con cerca de 10% de polinización cruzada. Es originario del centro-este de África y actualmente se cultiva en zonas de clima tropical, cuya temperatura va de cálido-húmedo a templado-húmedo por la altitud de las plantaciones, situadas generalmente entre 900 y 2.000 metros sobre el nivel del mar. *C. canephora* es un diploide con 22 cromosomas, es originario de una amplia región cálida, húmeda y de baja altitud que se extiende desde Guinea hasta el Congo también en África. Se le conoce popularmente como “Robusta” por su resistencia a las enfermedades y menor exigencia en requerimientos ecológicos que *C. arabica*.

Actualmente, el café es producido en más de 40 países tropicales que en conjunto exportan más de 110 millones de sacos de 60 kg cada año (ICO, 2016). En términos de importancia económica, el café es el segundo producto mas comercializado a nivel internacional después del petróleo, con ganancias arriba de los \$ 10,000 millones de dólares por año (ICO 2016). *C. arabica* aporta el 65% de la producción mundial de café mientras *C. canephora* aporta el 35% restante (ICO 2016).

México es el noveno productor a nivel mundial, con más de 700,000 ha cultivadas distribuidas entre más de 500,000 agricultores. La producción anual es de aproximadamente un millón de toneladas de café cereza (SAGARPA, 2016), lo que representa 4 millones de sacos de 60 kg de café verde equivalentes al 2.7% de la producción mundial (ICO, 2016). Según datos oficiales, aproximadamente el 80% de la producción de café es exportada y el resto se comercializa en el país (SAGARPA 2016). Los mayores estados productores de café en orden de importancia son Chiapas, Veracruz, Puebla, Oaxaca, Guerrero e Hidalgo (SAGARPA, 2016). En México los cultivos de café se encuentran en diferentes rangos altitudinales desde 300 hasta 2000 msnm con una amplia diversidad de climas y suelos. Sin embargo, la producción es más exitosa entre los 600 y 1200 msnm. Los agroecosistemas cafetaleros en México comúnmente se encuentran en el sotobosque, con una amplia variedad de vegetación arbórea que sirve de sombra a los cafetos y, que en muchos casos proporcionan ingresos adicionales para los productores (Moguel y Toledo 1999; Licona-Vargas et al. 2006;

Hernández-Martínez et al. 2009). Debido a la estructura y diversidad de la vegetación, funcionan como refugio para muchas especies de animales y además contribuyen a la recarga de los mantos freáticos. Por lo que se consideran como proveedores importantes de servicios ambientales (Gordon et al. 2007, López-Gómez et al. 2008).

2 Antecedentes

Entre los problemas fitosanitarios que afectan las plantaciones de café se encuentran los nematodos agalladores del género *Meloidogyne* y los nematodos lesionadores del género *Pratylenchus*, considerados los más dañinos para los cafetos (Campos y Silva 2008; Villain 2008). En particular, se tienen registros de 18 especies de *Meloidogyne* asociadas con plantas de café en el mundo entre las cuales se encuentran *M. arabicida* y *M. paranaensis* (Cuadro 1). Estas dos especies presentes únicamente en el continente Americano, están asociadas un síndrome devastador denominado corchosis de la raíz del cafeto (López y Salazar 1989; Carneiro et al. 1996). El sistema radical de las plantas enfermas presenta hipertrofia, con un desarrollo extensivo de tejido corchoso en las raíces principales y secundarias, llevando a una degradación progresiva del sistema radical. En consecuencia, las plantas muestran un progresivo decline empezando con clorosis seguido de la caída de hojas, flores y frutos, lo que termina en la muerte de la planta en un periodo entre dos y cuatro años (Bertrand et al. 2000). La corchosis de la raíz del cafeto esta presente en Brasil (Carneiro et al. 1996), Guatemala (Hernández et al. 2004; Villain et al. 2013) y Hawái (Carneiro y Cofcewicz 2008) en numerosas plantaciones asociada al nematodo *Meloidogyne paranaensis*. Esta enfermedad se ha registrado también en Costa Rica y se encuentra localizada en una pequeña área de la provincia de Cartago asociada al nematodo *Meloidogyne arabicida* (López y Salazar 1989). En Costa Rica, el desarrollo de los síntomas de esta enfermedad se ha asociado a la interacción de *M. arabicida* y *Fusarium oxysporum* f. Sp. *coffae*, (Marbán-Mendoza y Flores 1991) supuesto parásito vascular de las plantas de café, el cual se ha registrado anteriormente causando marchitamiento en el estado brasileño de Paraná y en Puerto Rico, en este último país asociado con el nematodo *M. incognita* (Cardoso 1986; Negrón y Acosta 1989). Posteriormente se realizaron diversos estudios y se demostró bajo condiciones controladas que para producir los síntomas de corchosis es necesaria la inoculación de ambos parásitos *M. arabicida* y *Fusarium oxysporum* en *Coffea arabica*

cv. Caturra o Catuai. *Fusarium oxysporum* inoculado solo no es patogénico y *Meloidogyne arabicida* solo causa agallas y reducción de brotes, pero no síntomas de corchosis, asimismo, en condiciones de campo, cultivares con resistencia a *M. arabicida* no mostraron corchosis (Bertrand et al. 2000). Estas observaciones indican que la corchosis del café es un complejo etiológico y, que *M. arabicida* juega un rol dominante como el principal agente predisponente para la subsecuente invasión por *F. oxysporum*, sin embargo, aún se desconocen los mecanismos de patogénesis que originan el desarrollo de esta enfermedad.

Cuadro 1 Especies de *Meloidogyne* asociadas a plantas de *Coffea arabica* en el mundo

Especies	Distribución	Referencias
<i>M. africana</i>	Kenia, Zaire	Campos y Villain, 2005
<i>M. arabicida</i>	Costa Rica	Villain et al 2013
<i>M. arenaria</i>	Cuba, El Salvador, Guatemala, Jamaica,	Campos y Villain, 2005; Villain et al 2013
<i>M. coffeicola</i>	Brasil	Campos y Villain, 2005
<i>M. decalineata</i>	Santo Tome y Príncipe, Tanzania	Campos y Villain, 2005
<i>M. enterolobii</i>	Costa Rica, Cuba, Guatemala	Campos y Villain, 2005; Villain et al 2013
<i>M. exigua</i>	Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá, Perú, Puerto Rico, Republica Dominicana, Venezuela.	Campos y Villain, 2005; Villain et al 2013
<i>M. hapla</i>	Brasil, Congo, El Salvador, Guatemala, India, Kenia, Tanzania, Zaire	Campos y Villain, 2005; Villain et al 2013
<i>M. incognita</i>	Brasil, Costa de Marfil, Costa Rica, Cuba, El Salvador, Estados Unidos (Hawái), Guatemala, India, Jamaica, México, Nicaragua, Tanzania, Venezuela	Cid del Prado-Vera et al 2001; Campos y Villain, 2005; Villain et al 2013
<i>M. inornata</i>	Guatemala	Campos y Villain, 2005
<i>M. izalcoensis</i>	El Salvador	Villain et al 2013
<i>M. kikuyensis</i>	Kenia	Campos y Villain 2005
<i>M. konaensis</i>	Estados Unidos (Hawái)	Campos y Villain 2005
<i>M. lopezi</i>	Costa Rica	Humphreys-Pereira et al 2014
<i>M. megadora</i>	Angola, Santo Tome y Príncipe, Uganda	Almeida y Santos, 2002; Campos y Villain, 2005
<i>M. morocciensis</i>	El Salvador	Villain et al 2013
<i>M. oteifae</i>	Zaire	Campos y Villain, 2005
<i>M. paranaensis</i>	Brasil, Estados Unidos (Hawái), Guatemala	(Carneiro et al. 2004; Campos y Villain, 2005; Villain et al 2013

En la zona de producción de café del estado de Veracruz, en las regiones de Huatusco y Coatepec desde la década de 1960 se ha reportado la presencia de *Meloidogyne* asociado con cafetos que presentaban síntomas de corchosis de la raíz (Vázquez 1963; Topete 1966). En los años 1970's se reportó la presencia de *M. incognita* (identificación basada en características del patrón perineal) en plantaciones de café en el municipio de Tlaltetela, Veracruz y se observó que las variedades comerciales de *C. arabica* son muy susceptibles al ataque de éste nematodo (Castillo 1977). En los años 1980's se registró la presencia de otros nematodos asociados a plantas de café con corchosis como *Aphelenchoides* spp., *Aphelenchus* spp., *Criconemoides* spp., *Helicotylenchus* spp., *Pratylenchus* spp. y *Tylenchus* spp. Asimismo se calculó que los nematodos estaban dispersos en 56,000 ha sembradas con café en Veracruz, con *M. incognita* como la especie más frecuente y abundante (Neri 1981; Regalado 1986). En los años 1990's se formuló la hipótesis de que el síntoma de corchosis en México podría estar relacionado a organismos adicionales que agravan el efecto de la infestación por nematodos (Hernández et al. 1991; Téliz-Ortíz et al. 1991). En la misma década, en el municipio de Huatusco se registró nuevamente la presencia de *M. incognita* en plantas de café con corchosis y se aislaron los hongos *Cylindrocladium* sp., *Fusarium* sp., *Fusarium solani*, *Verticillium* sp. y *Trichoderma* sp. (Sánchez 1990; Teliz-Ortíz et al. 1993). En un estudio realizado para identificar especies y razas de *Meloidogyne* se determinó a *Meloidogyne incognita* raza 2 de acuerdo a las características morfológicas del patrón perineal del las hembras, la forma del estilete de hembras y machos, así como la forma de la región labial y la prueba de hospederos diferenciales asociado a cafetos en el municipio de Atoyac, Veracruz. En este mismo municipio se registró a *Fusarium oxysporum* asociado a cafetos con corchosis infestados con *M. incognita* (García et al. 1997; Cid del Prado et al. 2001). En 2013 se realizó un estudio morfométrico de hembras de *Meloidogyne* extraídas de raíces de cafetos con corchosis de tres localidades de la zona de producción del estado de Veracruz donde se determinó la especie *M. incognita* a través de la comparación morfométrica de los patrones perineales de las hembras, aunque se concluyó que los ejemplares examinados tenían ciertas características similares a otras especies como *M. paranaensis* y *M. arabicida* (Cruz 2013). En 2015 el hongo *F. oxysporum* f. Sp. *coffae* fue registrado asociado a cafetos con corchosis en Veracruz (Alanís-Martínez et al 2015).

Este problema es una seria amenaza para la producción cafetalera en México, ya

que se estima que cada año se pierden hasta 35% de plantas resembradas de *Coffea arabica* en muchos municipios de Veracruz y Chiapas, obligando a los productores a remplazar año con año las plantas afectadas (Hernández et al. 1991; Téliz-Ortíz et al. 1991; INIFAP 2005). Un ejemplo del impacto sobre los cafetales, según información de diarios locales, en el municipio veracruzano de Atzalan en 2012 se perdieron 400 ha de plantaciones de café debido a la corchosis (Castaneyra 2012).

3 Justificación

En México, la corchosis del cafeto ha sido atribuida, en plantaciones de café en el estado de Veracruz, al nematodo *Meloidogyne incognita*, única especie de nematodo agallador reportada en México sobre café hasta la fecha. Asimismo se han encontrado algunos géneros de hongos asociados a raíces afectadas. Recientemente, se registró la presencia del fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. Sp. *coffeeae* asociado a plantas con corchosis en el estado de Veracruz (Alanís-Martínez et al. 2015). Las identificaciones previas de *Meloidogyne incognita* presentes en café en México se basaron en observaciones de los patrones perineales. Sin embargo, la identificación taxonómica de las especies de *Meloidogyne* presentes en los cafetos (18 especies registradas) es controversial debido a la similitud entre estas, en particular las asociadas a la corchosis de la raíz (Randing et al. 2002; Carneiro y Cofcewicz 2008). Actualmente existen métodos para una identificación más certera de las especies del género *Meloidogyne*, por ejemplo, se han desarrollado técnicas para determinar sus fenotipos bioquímicos (isoenzimas) y las características moleculares. De igual manera, para la determinación de los hongos asociados a las raíces afectadas, únicamente se han realizado muestreos puntuales y determinado las especies de acuerdo a sus características macroscópicas, sin realizar caracterizaciones morfológicas y/o moleculares para confirmar la identidad de estos aislamientos. Asimismo, la identificación de *F. oxysporum* f. Sp. *coffeeae*, fue realizada únicamente por el hecho de aislarse de cafetos sin comprobar su patogenicidad sobre estas plantas. La certera identificación de los agentes causales y el estudio del papel funcional de los organismos involucrados en la corchosis de la raíz del cafeto es esencial para generar conocimiento básico y así contribuir al desarrollo de estrategias de manejo integrado para este problema.

4 Hipótesis

En el presente trabajo se formularon dos hipótesis: *i)* La corchosis de la raíz del café es un patobioma causado por la interacción de *Meloidogyne* sp. y hongos fitoparásitos asociados, *ii)* algunas variedades híbridas de *Coffea arabica* pueden tener resistencia a la corchosis de la raíz del café.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Caracterizar el complejo parasítico causante de la corchosis de la raíz del café.

5.2 Objetivos específicos

- Identificar a nivel de especie a los patógenos causantes de la corchosis de la raíz del café.
- Caracterizar la patogenicidad de los organismos involucrados en la formación de la corchosis de la raíz del café.
- Evaluar los niveles de resistencia al nematodo responsable de la corchosis en una familia de híbridos F1 de *Coffea arabica*.

6 Metodología general

6.1 Toma de muestras

La toma de muestras se llevo a cabo en ocho plantaciones de café distribuidas en la principal zona de producción del Estado de Veracruz ubicada en la parte central del Estado. Las fincas fueron seleccionadas con base a estudios previos que registran la presencia de la enfermedad, o afectaciones en las raíces de las plantas, además de síntomas aéreos. En cada finca se tomó una muestra compuesta por 8-10 raíces de cafetos con síntomas. Además, se tomaron el mismo número de muestras de raíces de plantas de *Musa* spp. en los cafetales donde se encontraban como cultivo asociado.

6.2 Extracción y determinación de nematodos

Para la identificación de las poblaciones de *Meloidogyne* spp. se extrajeron huevos y juveniles J2 de las raíces infectadas de café mediante la técnica de triturado en solución de hipoclorito de sodio al 2% (Carneiro et al. 2004). Las muestras se colocaron en crioviales y se depositaron en ultracongelador a -80°C. Una vez obtenidas todas las muestras se extrajo el ADN de 200-300 µl de huevos y J2 de cada uno de poblaciones utilizando un kit de extracción (Tissue and Insect MiniPrep ADN, Zymo Research). Se llevó a cabo un PCR múltiple usando el ADN de los nematodos de cada población y tres primer SCAR específicos para *M. exigua*, *M. incognita* y *M. paranaensis* (Randig et al. 2002), las tres especies más distribuidas en café en Latinoamérica (Villain et al. 2013). Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV.

6.3 Aislamiento y determinación de hongos

Para aislar los hongos se seleccionaron raíces de café con formación reciente del tejido corchoso, se desinfectó la superficie de estas con hipoclorito de sodio al 3% y alcohol al 70% y 90% seguido de agua destilada estéril. Posteriormente se realizó un corte transversal sobre el tejido afectado y se colocaron fragmentos del mismo en cajas de Petri con agar dextrosa y papa (PDA). Los hongos que crecieron a partir del tejido corchoso se sembraron en cajas de Petri con PDA hasta obtener cultivos puros de cada aislamiento. El ADN se extrajo a partir de 25 µg de micelio usando un kit de extracción (Fungal/Bacterial DNA MiniPrep Zymo Research). Las amplificaciones se realizaron utilizando primers pre-diseñados y ADN de cada aislamiento, los productos de las amplificaciones se enviaron a la compañía MacroGen para obtener la secuencia de cada aislamiento y éstas se compararon con la base de datos GeneBank. Los hongos de interés fueron caracterizados morfológicamente y se realizó una prueba de colonización vascular en plantas de *C. arabica*.

6.4 Prueba de resistencia de siete híbridos de *Coffea arabica* a *Meloidogyne paranaensis*

Bajo condiciones semi-controladas (invernadero) se probó la resistencia de 7 híbridos F1 (provenientes de accesiones colectadas en Etiopía con resistencia a *Meloidogyne* spp. y una variedad comercial de *C. arabica* susceptible). El experimento se instaló en un

diseño de bloques al azar (10 repeticiones) donde se realizaron inoculaciones de *Meloidogyne paranaensis* (18,000 huevos planta⁻¹) en macetas de 900 ml con un sustrato esfango-arena 2:1 desinfectada previamente. Se incluyó *C. arabica* var. Caturra como testigo susceptible y *C. canephora* como testigo resistente. Quince meses después de la inoculación se extrajeron los nematodos de las raíces de los cafetos con el fin de evaluar la tasa de multiplicación en cada uno.

7 Resultados

7.1 Corky-root symptoms for coffee in central Veracruz are linked to the root-knot nematode *Meloidogyne paranaensis*, a new report for Mexico.

(Artículo publicado en European Journal of Plant Pathology)

Lopez-Lima D, Sánchez-Nava P, Carrion G, Espinosa de los Monteros AE, Villain L (2015) Corky-root symptoms for coffee in central Veracruz are linked to the root-knot nematode *Meloidogyne paranaensis*, a new report for México. European Journal of Plant Pathology 141:623–629

Abstract The coffee corky-root disease associated with root-knot nematode infection is a major concern for coffee production in Mexico, particularly in the Veracruz State where substantial losses from *Coffea arabica* plantations are reported annually due to this disease. Previous studies based on perineal patterns of *Meloidogyne* females identified *M. incognita* as the species responsible for coffee corky root disease in this state. Populations of *Meloidogyne* were collected from coffee plants with corky root symptoms and from intercropped banana plants, when present, in eight sites distributed through the major coffee growing region of Veracruz State. These populations were characterized by multiplex PCR using sequence-characterized amplified region (SCAR) markers for the three major coffee *Meloidogyne* species in Latin America: *M. exigua*, *M. incognita* and *M. paranaensis*. *M. paranaensis* was the only species present on all eight coffee samples and is reported here for the first time in Mexico. Consequently, the coffee industry in Mexico should focus more attention to this very destructive root-knot nematode, particularly at the prophylactic level to avoid its dissemination via nursery seedlings. Additionally, *M. paranaensis* was found in the five samples of intercropped *Musa* AAA and AA plants suggesting that this crop is a good host and a potentially important way of dispersal of this very pathogenic root-knot nematode since banana

suckers are frequently used by growers for plantation renovations. Additionally, *M. incognita* was detected on *Musa* AAA and AA plants in three of the five studied sites with intercropped banana but never on the coffee plants even those sampled nearby banana plants.

Keywords *Coffea* spp.; Molecular diagnostic; *Musa* spp.; PCR; root-knot nematode; SCAR.

Coffee production is economically and environmentally important for Mexico with 748,284 planted ha generating 1,336,882 t and more than 600 million US\$ trading per year (SAGARPA 2012). In Mexico, and particularly in the state of Veracruz, coffee is commonly cultivated under shade of a wide variety of trees, which provide an additional source of income for many producers (Licona-Vargas et al. 2006; Hernández-Martínez et al. 2009). This kind of shade coffee agro-ecosystems, with both structural and species diversity, also affords a refuge for many animal species and contributes to groundwater recharge and to carbon capture, thus providing important environmental services (Beer et al. 2003; Gordon et al. 2007; López-Gómez et al. 2008; Manson et al. 2008; Jha et al. 2011). However many of these environment friendly coffee agro-ecosystems are threatened in Veracruz by a syndrome called coffee corky-root disease (locally named “corchosis”) linked to the presence of *Meloidogyne* spp. according to reports from the 1960’s (Teliz-Ortiz et al. 1993). Coffee corky-root disease has been expanding and is now considered a severe threat to coffee production in Mexico, since up to 35% of the annual *Coffea arabica* plant losses in Veracruz and Chiapas, the main coffee producing States of Mexico, are attributed to this disease (INIFAP 2005).

In Veracruz this disease in coffee plantations has been attributed to *M. incognita*, the only species reported to date on coffee in Mexico (Teliz-Ortiz et al. 1993; Garcia et al. 1997). These previous identifications of root-knot nematode (RKN) populations found in coffee in Mexico were based on perineal pattern observations. However, recent studies have shown that identification of *Meloidogyne* based on such morphological characters is unreliable for some species such as in the case of *M. incognita* and *M. paranaensis* which both exhibit a similar perineal pattern (Carneiro and Cofcewicz 2008). Actually, *M. paranaensis* is associated with similar symptoms of corky-root disease in coffee plantations in Brazil and Guatemala (Carneiro et al. 1996, 2004;

Campos and Villain 2005; Villain et al. 2013). Accurate identification of the causative species of coffee corky-root disease is essential for designing efficient control strategies especially when using plant resistances and biological control agents with some grade of specificity. Currently more reliable identification methods of *Meloidogyne* species have been developed based on isoenzyme phenotypes or molecular markers (Carneiro and Cofcewicz 2008). Species-specific SCAR (sequence-characterized amplified region) markers have been developed for the identification of main *Meloidogyne* species detected in coffee in Latin America: *M. exigua*, *M. incognita*, *M. paranaensis*, *M. enterolobii*, *M. arabicida* and *M. izalcoensis* (Randig et al. 2002; Tigano et al. 2010; Correa et al. 2013). This study sought to use SCAR marker identification of *Meloidogyne* populations associated with symptoms of corky-roots through the coffee production region of Veracruz, Mexico. We used primers of the three major and most distributed species on coffee in Latin America: *M. exigua*, *M. incognita* and *M. paranaensis*, since the three other species, *M. enterolobii*, *M. arabicida* and *M. izalcoensis* are marginal or present a very limited distribution area (Carneiro and Cofcewicz 2008; Villain et al. 2013). Populations of *Meloidogyne* from intercropped banana plants were also studied since this agronomic practice is very common in this region.

Sample collection was carried out on eight farms distributed in central Veracruz, which is the major coffee producing area of the state (more than 95% of production) and the second most important in Mexico (Fig. 1). These farms on the southern slopes of the Sierra Madre Oriental and the eastern slopes of the Mexican Transvolcanic Belt, were identified from previous studies reporting the presence of corky-root disease or reports of some unidentified root problems by coffee growers and field technicians.

On each farm a composite sample of roots with corky-root symptoms was taken from 6-8 coffee plants distributed in the field and chosen by their chlorosis and/or decline aerial symptoms. In sites where banana was intercropped with coffee, roots of 6-8 *Musa* spp. plants closer to sampled coffee plants were also collected. Data of the geographical location, altitude, and host plants of each of the sampling sites are summarized in Table 1. *Meloidogyne* spp. eggs and 2nd stage juveniles (J2) were extracted from coffee and banana infested roots according to the methodology of blending in a 2% chlorine solution described by Carneiro et al. (2004). For each population, DNA was extracted from 200-300 μ L of eggs and J2 following the DNA

Tissue and Insect MiniPrep Isolation Kit protocols (Zymo Research). Multiplex polymerase chain reaction (PCR) was performed using DNA extracted from each collected nematode population and three SCAR (Sigma-Aldrich) primers specific for *M. exigua*, *M. incognita*, and *M. paranaensis* (Randig et al. 2002), the three major species on coffee in Latin America (Campos and Villain 2005; Cofcewicz and Carneiro 2008; Villain et al. 2013).

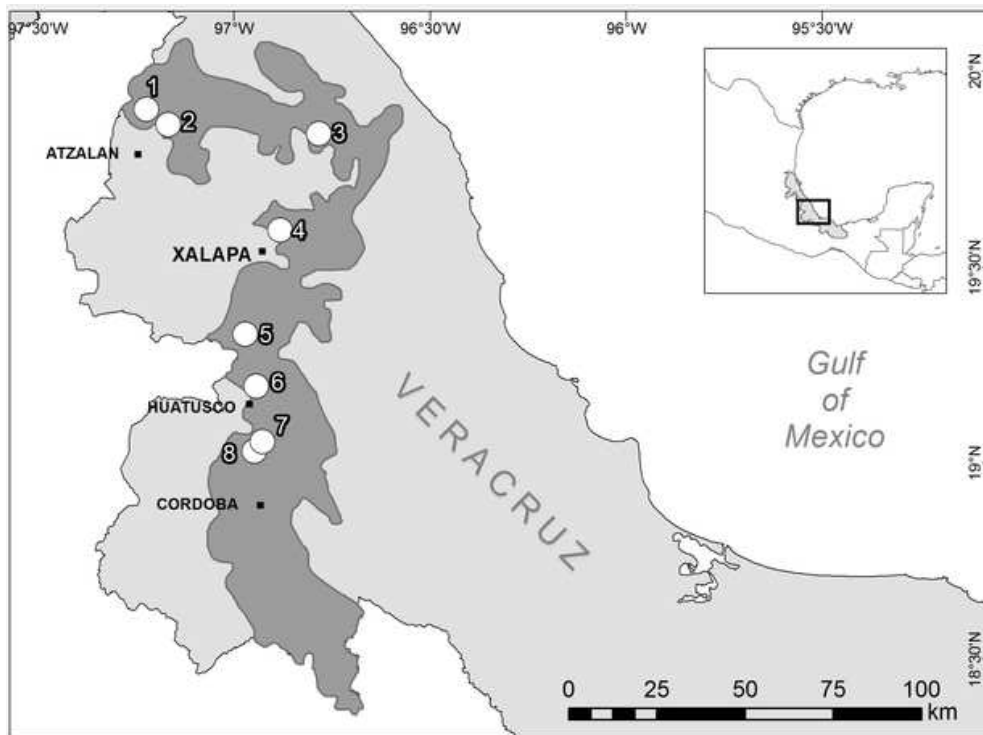


Fig. 1 Map of the major coffee cropping region of the State of Veracruz with location of the eight sampling sites. Code numbers of sampling sites are reported in Table 1 with their respective characteristics

A positive control with reference DNAs of these same three species provided by the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) was included as well as a negative control without DNA. The cycling program was as follows: 5 minutes at 94 °C, 30 cycles of 30 s at 94 °C, 45 s at 64 °C, and 1 min at 70 °C; and a final extension of 8 min at 70 °C according to Randig et al. (2002). The amplification products were separated by electrophoresis on a 3% agarose gel stained with ethidium bromide (0.02 %) and visualized under UV light.

In the study sites, coffee plants presented different levels of decay from nutritional deficiency symptoms to chlorotic, defoliated, and dead stages (Fig. 2.a) in agreement with previous observations (Téliz-Ortiz et al. 1993). In all sampling sites,

these affected plants presented the same corky-root symptoms *i.e.* swellings with a corky and cracking aspect on the main roots including the tap root as far as the root collar (Fig. 2.b, c). Cuttings of these root corky swellings showed the presence of numerous RKN females (Fig. 2.d). On the sampled intercropped banana plants, we observed common root swelling with even some cortex cracking (not illustrated).



Fig.2 Symptoms of the corky-root disease on coffee plants; a. Rachitic and chlorotic three years old coffee plants with intercropped *Musa* AAA plants both infested by *M. paranaensis*; b. Root symptoms with corky swelling; c. Detail of corky and cracking aspect of a coffee root infested by *M. paranaensis*; d. Longitudinal cutting of a root corky swelling showing numerous females

The SCAR-Multiplex-PCR analysis showed that neither of *M. incognita* and *M. exigua* was present in these eight coffee root samples even at sites 2, 4 and 6 where *M. incognita* was detected on intercropped banana plants (Fig. 3; Table 1). On contrary, *M. paranaensis* was present in all eight root samples collected from coffee trees presenting corky-root symptoms (Fig. 3, Table 1). Since the eight sampling sites were covering most of the coffee cropping area of Veracruz State (Fig. 1), these results suggest that corky-root symptoms on coffee seem to be linked exclusively with the RKN species, *M. paranaensis*, in this State. These results are in agreement with the identifications of RKN related to corky-root symptoms on coffee in the adjacent country of Guatemala

and in various states of Brazil where this species was first described (Carneiro et al. 1996; Carneiro et al. 2004, 2005; Campos and Villain 2005; Ferraz 2008; Villain et al. 2008; Barros et al. 2011; Villain et al. 2013). As far as we know, this is the first report of *M. paranaensis* in Mexico. Previous studies reported *M. incognita* as the causative RKN species of corky-root symptoms on coffee in Veracruz state (Teliz-Ortiz et al. 1993; Garcia et al. 1997; Marbán-Mendoza 2009). However these previous identifications were based on perineal patterns which do not allow a reliable species distinction between *M. incognita* and *M. paranaensis* such as mentioned before. These results reinforce the fact that particular attention should be focused on detection of this very pathogenic RKN on coffee throughout Latin America because of likely misidentifications (Campos and Villain 2005; Carneiro and Cofcewicz 2008; Elling 2013; Villain et al. 2013). Locally, the coffee industry of Mexico should be concerned by the presence of this very destructive RKN particularly at a prophylactic level, taking action in order to avoid more dissemination of this nematode through the distribution of contaminated nursery seedlings and soils.

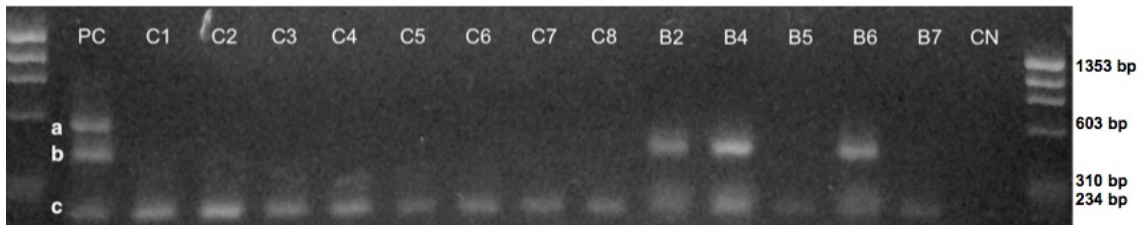


Fig. 3 Amplification test for the three RKN species: *M. exigua*; *M. incognita* and *M. paranaensis* from corky-root of coffee plants (C coded populations) and from roots of intercropped *Musa* plants (B coded populations). Numbers of population codes refer to geographical sampling sites resumed in Fig. 1. PC is the positive control [a = *M. exigua* (562 bp), b = *M. incognita* (399 bp), and c = *M. paranaensis* (208 bp)], whereas NC is the negative control for the PCR. Flanking lines are the PhyX-174 DNA/Hae III molecular weight marker (Promega Corp.)

The determination of *M. paranaensis* as the causative RKN of corky-root disease in the study region is also of primordial importance for establishing control strategies. Actually, sources of resistance to *M. paranaensis* have already been identified among coffee germplasm and used for breeding of cultivars resistant to *M. paranaensis*. Especially, some new selected hybrid F1 of *C. arabica* inherit resistance to *M. paranaensis* from parent wild Ethiopian accessions (Anzueto et al. 2001; Bertrand and Anthony 2008).

Table 1 Geographical data of collecting sites in coffee plantations of Veracruz State and SCAR-PCR diagnosed species from *Coffea* and *Musa* plants

Collecting site	Location	Municipality/	Altitude m.s.l.	Population code	Host			Diagnosed species
		Locality			Species, cultivar	group	and/or	
1	N 19°54'13.1''	Atzalan,	689	C1	<i>Coffea arabica</i> ^a Rica 95	cv. Costa		<i>M. paranaensis</i>
	W 97°13'28.4''	Napuala						
2	N 19°51'50.8''	Atzalan,	664	C2	<i>Coffea canephora</i> ^b unknown	cv.		<i>M. paranaensis</i>
	W 97°10'06.8''	Chachalacas		B2				
3	N 19°50'27.6''	Yecuatla,	559	C3	<i>Coffea arabica</i>	cv. Typica		<i>M. paranaensis</i>
	W 96°47'05.8''	La Victoria						
4	N 19°35'42.2''	Jilotepec,	996	C4	<i>Coffea arabica</i> Rica 95	cv. Costa		<i>M. paranaensis</i>
	W 96°53'01.4''	Paso San Juan		B4				
5	N 19°19'45.4''	Cosautlan,	1152	C5	<i>Coffea canephora</i> ^b unknown	cv.		<i>M. paranaensis</i>
	W 96°58'20.1''	La Lagunilla		B5				
6	N 19°11'44.5''	Sochiapa,	1361	C6	<i>Coffea arabica</i>	cv. Caturra		<i>M. paranaensis</i>
	W 96°56'38.1''	Sochiapa		B6				
7	N 19°03'16.5''	Ixhuatlan del Café,	1186	C7	<i>Coffea arabica</i> and Pacamara	cv. Garnica		<i>M. paranaensis</i>
	W 96°55'41.3''	Moctezuma		B7				
8	N 19°01'50.7''	Ixhuatlan del Café,	1219	C8	<i>Coffea arabica</i> and Caturra	cv. Bourbon		<i>M. paranaensis</i>
	W 96°56'58.0''	Nevería						

a: nursery seedlings b: rootstock

One *C. canephora* rootstock cv. Nemaya has also been selected for its resistance to the major RKN found in Central America including *M. paranaensis* (Anzueto et al. 2001; Bertrand et al. 2002). Indeed, two of the collected populations (C2 and C5) were

collected on non-selected *C. canephora* rootstocks which presented serious corky-root symptoms in agreement with previous studies showing the susceptibility of most *C. canephora* accessions to *M. paranaensis* (Anzueto et al. 2001; Bertrand et al. 2002) and some similar observations in the field in Guatemala and Brazil (Villain et al. 2013; Barros et al. 2014). These results prove again the need to use selected resistant rootstocks such as cv. Nemaya in order to control this very pathogenic RKN. As observed previously in Guatemala (Villain et al. 2013), *M. paranaensis* proved to be able to parasitize coffee on a wide range of altitudes in Veracruz state from 660 to 1360 m and including the major part of the altitudinal range of coffee production (Table 1).

M. paranaensis was also detected in the five samples collected on intercropped banana plants from the sampled coffee plantations (Table 1). These infested banana plants all belong to *Musa acuminata*, some are AA diploids of the Pisang Mas subgroup, locally called “dominico” (sample B2) and others are AAA triploids cv. “Roatan” - Gros Michel subgroup - (samples B4, B5 and B6) and cv. “morado” - Red subgroup - (sample B7). The presence of *M. paranaensis* in all these AA and AAA *Musa* root samples indicates there are good hosts for this RKN. Thus bananas represent potentially important ways for dissemination of *M. paranaensis* since they are frequently vegetatively propagated by growers using banana suckers for plantation renovations.

Another interesting result is that *M. incognita* was detected in intercropped *Musa* AAA (B4 and B6) and *Musa* AA (B2) root samples from three plots, but not in the corresponding coffee root samples from the same sampling sites despite the already mentioned high sensitivity of the SCAR Multiplex-PCR analysis used in this study and despite the age of the plantations (more than three years old). Though *M. incognita* is reported as a very pathogenic RKN on coffee, particularly in Brazil (Campos and Villain 2005), these populations of *M. incognita* could not be pathogenic for coffee plants but this hypothesis must be confirmed. A similar observation was made in Guatemala in a coffee plantation where *M. incognita* was detected on the associated *Musa* AAB plants but not in the closer coffee plants furthermore infested by *M. paranaensis* (Villain et al. 2013).

Phylogeny and crossed pathogenicity studies for *Coffea* spp. and *Musa* spp. with populations of *M. paranaensis* collected in different states of Mexico from both crops will be carried on in order to characterize the intraspecific diversity among these

populations and in relation to populations from other countries. Current studies are also being carried out to identify the fungi associated with these symptoms of corky-roots disease and determine their role in the etiology of the disease. In the case of coffee corky-root symptoms observed in Costa Rica, it was demonstrated that the presence of both pathogens *M. arabicida* and a non-identified f.sp of *Fusarium oxysporum* was necessary to induce such symptoms (Bertrand et al. 2000). In the case of the coffee corky-root disease observed in Veracruz State, various fungi such as *Fusarium* spp., *Cylindrocladium*, and *Trichoderma* have been observed in coffee roots presenting symptoms of the disease (Teliz-Ortiz et al. 1993). The role of these and other species of fungi in the etiology of this disease has to be clarified.

Acknowledgments. This study was partially funded by project 0174936 supported by the Fondo Sectorial de Innovación (FINNOVA) of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). The authors thank Dr. Regina Carneiro for providing DNA of *Meloidogyne* spp. used in this study. We thank Rosario Landgrave for the elaboration of the map included in this work. We thank the field staff of Agroindustrias Unidas de México, SA for facilitating contact with coffee growers. We thank all coffee growers who gave us free access to their plantation. The first author is grateful to CONACyT for the scholarship granted to carry out his postgraduate studies. We finally thank Dr. Robert Manson for reviewing the manuscript.

References

- Anzueto, F., Bertrand, B., Sarah, J. L., Eskes, A. B., & Decazy, B. (2001). Resistance to *Meloidogyne incognita* in Ethiopian *Coffea arabica* accessions. *Euphytica*, 118, 1-8.
- Barros, A. F., Oliveira, R. D. L., Lima, I. M., Coutinho, R. R., Ferreira, A. O., & Costa, A. (2014). Root-knot nematodes, a growing problem for Conilon coffee in Espírito Santo state, Brazil. *Crop Protection*, 55, 74-79.
- Barros, A. F., Oliveira, R. D. L., Zambolim, L., Ferreira, a A. O., & Coutinho, R. R. (2011). *Meloidogyne paranaensis* attacking coffee trees in Espírito Santo State, Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 6, 43-45.

- Beer, J., Harvey, C., Ibrahim, M., Harmand, J. M., Somarriba, E., & Jiménez, F. (2003). Servicios ambientales de los sistemas agroforestales. *Agroforestería en las Américas*, 10, 80-87.
- Bertrand, B., & Anthony, F. (2008). Genetics of Resistance to Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.) and Breeding. In R. Souza (Ed.), *Plant-Parasitic Nematodes of Coffee* (pp. 165-190). Houten: Springer Netherlands.
- Bertrand, B., Nuñez, C., & Sarah, J. L. (2000). Disease complex in coffee involving *Meloidogyne arabicida* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology*, 49, 383-388.
- Bertrand, B., Ramirez, G., Topart, P., & Anthony, F. (2002). Resistance of cultivated coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*) trees to corky-root caused by *Meloidogyne arabicida* and *Fusarium oxysporum*, under controlled and field conditions. *Crop Protection*, 21, 713-719.
- Campos, V. P., & Villain, L. (2005). Nematode parasite of coffee and cocoa. In M. Luc, R. A. Sikora & J. Bridge (Eds.) 2nd ed. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (pp. 529-579). Wallingford: CABI Publishing.
- Carneiro, R. M. D. G., Carneiro, R. G., Abrantes, I. M. O., Santos, M., & Almeida, M. R. A. (1996). *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. *Journal of Nematology*, 28, 177-189.
- Carneiro, R. M. D. G., & Cofcewicz, E. (2008). Taxonomy of coffee-parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. In R. Souza (Ed.), *Plant-parasitic nematodes of coffee* (pp. 87-122). Houten: Springer Netherlands.
- Carneiro, R. M. D. G., Tigano, M., Randig, O., Almeida, M. R., & Sarah, J.-L. (2004). Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology*, 6, 287-298.
- Carneiro, R. M. D. G., Randig, O., Almeida, M. R. A., & Gonçalves, W. (2005). Identificação e caracterização de *Meloidogyne* em cafeeiro nos estados de São Paulo e Minas Gerais através dos fenótipos de esterase e SCAR-Multiplex-PCR. *Nematologia Brasileira*, 29, 233-241.
- Correa, V., Santos, M., Almeida, M., Peixoto, J., Castagnone-Sereno, P., & Carneiro, R. (2013). Species-specific DNA markers for identification of two root-knot nematodes of coffee: *Meloidogyne arabicida* and *M. izalcoensis*. *European Journal of Plant Pathology*, 137, 305-313.

- Elling, A. A. (2013). Major Emerging Problems with Minor Meloidogyne Species. *Phytopathology*, 103, 1092-1102.
- Ferraz, L. C. B. (2008). Brazil. In R. Souza (Ed.), *Plant-Parasitic Nematodes of Coffee* (pp. 225-248). Houten: Springer Netherlands.
- García P. P., Cid del Prado I., Zavaleta-Mejía E., & Téliz D. (1997). La corchosis del caféto (*Coffea arabica* L.) y alternativas de su manejo. *Nematropica*, 27, 111.
- Gordon C., Manson R., Sundberg J., & Cruz-Angón, A. (2007). Biodiversity, profitability, and vegetation structure in a Mexican coffee agroecosystem. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 118, 256-266.
- Hernández-Martínez G., Manson R., & Contreras-Hernández, A. (2009). Quantitative classification of coffee agroecosystems spanning a range of production intensities in central Veracruz, Mexico. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 134, 89-98.
- INIFAP, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (2005) Clones de *Coffea canephora* como patrones para injertos con tolerancia a la corchosis de la raíz del café. Folleto técnico no. 3. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. http://www.inifap.gob.mx/Documents/reportes/reporte_anual2004.pdf Accessed 25 April 2014.
- Jha, S., Bacon, C. M., Philpott, S. M., Rice, R. A., Mendez, V. E., & Laderach, P. (2011). A Review of Ecosystem Services, Farmer Livelihoods, and Value Chains in Shade Coffee Agroecosystems. In W. B. Campbell, & S. L. Ortiz (Eds.), *Integrating Agriculture, Conservation and Ecotourism: Examples from the Field*, Vol. 1, *Issues in Agroecology-Present Status and Future Prospectus* (pp. 141-208). Berlin: Springer-Verlag.
- Licona-Vargas A. L., Ortíz-Solorio C. A., Gutiérrez-Castorena M. C., & Manzo-Ramos F. (2006). Clasificación local de tierras y tecnología del policultivo café-plátano para velillo-sombra en comunidades cafetaleras. *Terra Latinoamericana*, 24, 1-7.
- López-Gómez A. M., Williams-Linera G., & Manson R. H. (2008). Tree species diversity and vegetation structure in shade coffee farms in Veracruz, Mexico. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 124, 160-172.
- Manson, R. H., Hernández-Ortiz, V., Gallina, S., & Mehlreter, K. (eds.). (2008). *Agroecosistemas cafetaleros de Veracruz: biodiversidad, manejo y conservación*.

- México, DF: Instituto de Ecología A.C. and Instituto Nacional de Ecología.
- Marbán-Mendoza, N. (2009). Nematodes management in coffee production systems. In A. Ciancio, & K. G. Mukerji (Eds.), *Integrated Management of Fruit Crops Nematodes Vol. 4, Integrated Management of Plant Pests and Diseases* (pp. 101-118). Houten: Springer Netherlands.
- Randig, O., Bongiovanni, M., Carneiro, R., & Castagnone-Sereno, P. (2002). Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome*, 45, 862-870.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2012). Servicio de información agroalimentaria y pesquera, producción agrícola 2012. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>. Accessed 12 may 2014
- Téliz-Ortiz, D., Castillo-Ponce, G., & Nieto-Angel, D. (1993). La corchosis del cafeto en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 11, 5-12.
- Tigano, M., De Siqueira, K., Castagnone-Sereno, P., Mulet, K., Queiroz, P., Dos Santos, M., et al. (2010). Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* and development of a SCAR marker for this guava-damaging species. *Plant Pathology*, 59, 1054-1061.
- Villain, L., Hernández, A., & Anzueto, F. (2008). Central America. In R. Souza (Ed.), *Plant-parasitic nematodes of coffee* (pp. 261-275). Houten: Springer Netherlands.
- Villain, L., Sarah, J. L., Hernandez, A., Bertrand, B., Anthony, F., Lashermes, P., et al. (2013). Diversity of root-knot nematodes parasitizing coffee in Central America. *Nematropica*, 43, 194-206.

7.2 Description of coffee tissues infested by *Meloidogyne paranaensis*, and characterization of associated fungi potentially involved in the coffee corky-root disease in Mexico.

(Artículo enviado a European Journal of Plant Pathology)

Daniel López-Lima¹, Petra Sánchez-Nava¹, Gloria Carrion^{2*}, Damaris Desgarenes², Alejandro Espinosa de los Monteros², Luc Villain^{2,3}

1: Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias, Campus Cerrillo Piedras Blancas, Carretera a Tlachaloya s/n, Toluca 50090, Estado de México, México.

2: Instituto de Ecología, A.C., Carretera antigua a Coatepec 351, Xalapa 91070, Veracruz, México.

3: Cirad, UMR RPB, F- 34394 Montpellier, France

*: (✉) e-mail: gloria.carrion@inecol.mx; tel.: (52) 228.842.18.00

Keywords: Coffee, *Meloidogyne paranaensis*, *Fusarium* spp, corky-root disease

Abstract The disease known as coffee corky-roots associated to the infection by the root-knot nematode *M. paranaensis* is an important issue for coffee crop in several countries: Brazil, Guatemala and Mexico, particularly in the Veracruz state where considerable losses are annually registered in *Coffea arabica* plantations. Previous studies have revealed the presence of fungi in coffee corky-root tissues. However these fungi have not been yet identified at species level. This work aimed to characterize the fungi associated to the coffee corky-root symptoms in Veracruz. Coffee roots with corky-root symptoms were collected in eight sites distributed through the major coffee growing region of Veracruz. Observations of inside cortical root tissues under scanning electron microscope revealed abundant mycelium and conidia in corky-root samples in contrast with absence of every fungi development stage in healthy roots. Fungi were isolated from the internal corky-root tissues and then morphologically characterized and identified at species level by ITS sequences which were also used for a phylogenic study. Among the 49 isolated strains the most frequent and potentially plant pathogenic were *Fusarium oxysporum* and *F. solani*, the latter being the only one present in all corky-root samples. The 27 strains of *F. oxysporum* presented a wide variation of morphological characteristics but none for the

genealogical analysis. Though *F. oxysporum* seems to play an important role in the corky-root disease etiology, it is necessary to determine the real function of *F. oxysporum* in the development of this severe coffee disease. It will be also necessary to confirm if *F. solani* can be involved in the development or the intensity of the coffee corky-root disease.

Aknowledgements:

The authors of this study acknowledge: *i*) Greta Hanako Rosas Saito for the coffee root observations under the scanning electron microscope at the microscopy unit of the cluster Biomimic; *ii*) the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) and the Instituto de Ecología, A.C. for founding part of this study *iii*) The first author is grateful to CONACyT for the scholarship granted to carry out his postgraduate studies.

Introduction

Coffee is an important crop since it takes the second place among the most worldwide traded products (just after oil) providing economic livelihood to more than 125 million people. During the coffee cycle 2015/2016 the coffee producing countries all together exported more than 110 million of 60kg bags (ICO, 2016). For Mexico, with Arabica representing almost 90% of its coffee production, this crop still plays an important socio economic role in many rural areas of high level of poverty. Additionally, Arabica plantations provide many important ecosystemic services to the country, since this crop is predominantly grown in agroforestry systems and in ecologically sensible mountainous areas (Hernández-Martínez et al. 2009). However, coffee exportable production of Mexico decreased almost constantly since the end of the 90's falling from around 4 million to less than half million of 60kg bags for the last harvest 2015/2016 (ICO, 2016). This dramatic production decrease is caused by different reasons like the aging of most coffee plantations without renovation but also because of biotic stresses especially the coffee leaf rust which affected Mexican coffee crop mainly during the last three years and also because of nematodes which have long been widely distributed in all coffee growing regions of Mexico (INIFAP, 2005).

Actually, coffee leaf rust and nematodes are also the two major phytosanitary problems affecting Arabica coffee crop through all Latin America: (Villain et al. 2013; Avelino et al. 2015). However while coffee leaf rust occurs cyclically during epidemics

caused by many factors such as micro and macroclimate conditions and agronomic practices, nematodes represent a continued threat for any kind of coffee cropping system and for both Arabica and Robusta crops. In absence of official phytosanitary monitoring of coffee nurseries and coffee seedling transport in all these countries, field nematode infestations continue to expand. Moreover when present in plantations and because its eradication is not possible, phytoparasitic nematodes create a continued stress during the entire lifetime of the plantation when non-grafted susceptible germplasm has been used (Lambert and Bekal 2002; Villain et al. 2000, 2002; Bertrand and Anthony 2008). The major nematode damages in Latin America are caused by root-knot nematodes (RKN), *Meloidogyne* spp. (Campos and Villain 2005) and particularly by two RKN species associated with a devastating syndrome called coffee corky-root disease: *Meloidogyne arabicida*, only detected in Costa Rica to date (López and Salazar 1989; Marbán-Mendoza et al. 1989; Bertrand et al. 2000) and *M. paranaensis*, with a wider distribution, in Brasil (Carneiro et al. 1996; Ferraz 2008); in Guatemala (Hernández et al. 2004; Villain et al. 2013), in Hawaii (Carneiro and Cofcewicz 2008) and probably in Peru (Esbenshade and Triantaphyllou 1985; Villain et al. 2013). In Mexico, coffee corky-root disease has been detected since the 1960s in the state of Veracruz (the second national coffee producing state) and *M. paranaensis* has been confirmed by using specific SCAR molecular markers as the RKN species linked to coffee corky-root symptoms (López-Lima et al. 2015). The affected coffee trees show a progressive decline, starting with chlorosis followed by fall of flowers, leaves and fruits until the death of plants which occurs in a period between 2 to 4 years depending on agro-ecological conditions and mainly when plant begin to produce (Bertrand et al. 2002; Ferraz 2008; Villain et al. 2013). The root system of infested plants shows numerous small elongated galls on young white roots and large swelling on older and more lignified roots with occurrence of large, deep and cracked cortical tissues with an aspect of cork (Bertrand et al. 2002). These corky symptoms can affect the primary roots including the tap root up to the plant crown and even sometimes reach the first centimeters of the stem as observed in this work. Cuttings of these corky root swellings reveal numerous *M. paranaensis* females with their egg masses (López-Lima et al. 2015). In Mexico, *F. oxysporum* has been associated to coffee plants with corky-root symptoms (García et al. 1997) along with other fungi like *Cylindrocladium* sp., *Fusarium solani*, *Trichoderma* sp. and *Verticillium* sp. (Téliz-Ortíz et al. 1993). Nevertheless, these different studies were all punctual and any real survey has been

done to identify the diversity of fungi linked to this disease by collecting strains from the inside tissues of coffee corky-roots in multiple sites. In Costa Rica, the presence of both *M. arabicida* and *Fusarium oxysporum* has been systematically detected in coffee corky roots (Bertrand et al. 2000). Moreover, the auteurs demonstrated under controlled inoculation conditions that the corky root symptoms of the disease were only observed when both organisms were inoculated. The coffee corky-root could be an interesting example of the pathobioma concept when the postulates of Koch and Hill, one microbe – one disease, shows its limits (Vayssier-Taussat et al. 2014). The objectives of this work were to: *i*) observe the presence of fungi in the affected tissues, *ii*) characterize morphologically and molecularly the fungal community associated to the coffee corky-root disease.

Materials and methods

The sampling of coffee corky-roots was done on eight coffee plantations distributed in the main coffee cropping area of the Veracruz state, located between the eastern slope of the Mexican Trans Volcanic Belt and the southern slope of the Sierra Madre Oriental. The sampled coffee plantations were selected based on field technicians information and on previous studies that registered the presence of the corky-root disease or of symptom spots in coffee plantations with affectations in the roots and aerial symptoms such as chlorosis, deficient growth, defoliation and premature death of plants. On each studied plantation, roots were sampled on 8-9 coffee plants presenting corky-root symptoms and brought together to form one composite sample of each sampling site. In a previous study of the collected coffee corky-root samples, it was determined that for all root samples the only present root-knot nematode was *Meloidogyne paranaensis* (López-Lima et al. 2015).

For the scanning electron microscope (SEM) observations, 3 month aged seedlings of an *in vitro* propagated F1 intraspecific hybrid line of *C. arabica* (Bertrand et al. 2011) cultivated in 6 lt. pots filled with previously sterilized substrate were infested with a population of *M. paranaensis* reared on tomato plants in greenhouse. This population was initially collected on coffee at one of the eight sampling sites of this study, Jilotepec site (Table 1; López-Lima et al. 2015). The plants were kept in a greenhouse for one year in order to obtain numerous corky-roots. The roots were washed with tap water to remove the excess of soil. Longitudinal cuts of corky-roots were made with scalpel and

1 mm thickness rectangular sections (2mm x 5mm) of inner tissues of the corky-root parts were collected and fixed in glutaraldehyde at 2% to preserve the structural integrity. The samples remained in glutaraldehyde for 5 days and subsequently were submitted to a dehydration process with increasing concentrations of ethanol (10, 30, 50, 70 and 90% from 15 to 25 min. in each concentration) until conserving the tissue root sections in absolute alcohol. The samples were placed in a filter paper bag and dehydrated in a critical point camera. Then the samples were mounted on aluminum cylindrical stubs and coated with gold-palladium for its further observation under SEM. Root sections of a same aged healthy plant were collected and processed in the same way as control for comparison.

In order to avoid saprophytic fungi that may be widely present in old corky-root formations, apparently recently formed corky swelling on young coffee roots were selected for the isolation of fungi. Roots were carefully washed with tap water to remove adhered soil, then disinfected by soaking it consecutively in 70% alcohol (during 1 minute), 3% NaClO (1 min), 96% alcohol (30 seconds); and then rinsed three times with distilled sterile water.

Longitudinal cuts of the of corky-root tissues were made and fragments of the inner tissues were extracted and placed in Petri dishes prepared with potato dextrose agar (PDA) and chloramphenicol (1mg mL^{-1}). Fungi mycelia that grew from the extracted inner part corky-root tissue fragments were transferred to other Petri dishes with PDA, until obtaining pure cultures from each isolate. The fungi were observed and identified to a genus level according to their morphological characteristics like colony coloration and shape of reproductive structures.

In order to identify the fungi at species level, DNA was extracted from 25 μg of mycelia of each strain using the extraction kit: Fungal/Bacterial DNA MiniPrep Zymo Research. A sequence of 500 bp, that encompasses the Internal Transcriber Spacer (ITS) 1, the 5.8 rDNA, and the ITS2 molecular markers, was used and amplified by PCR (Schoch et al. 2012). The PCR products were analyzed on a 1.2% agarose gel; next the DNA was purified and sent to Macrogen INC for sequencing. The obtained sequences were edited in the e-BioX program and compared by BLAST analysis to the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

After identifying molecularly all the strains of the isolated fungi from the collected coffee corky-roots at species level, the 27 strains of *Fusarium oxysporum* and the five strains of *F. solani* (only species registered as pathogens of coffee) were morphologically characterized on PDA and oatmeal agar culture media (25 °C). Growth, development and size of the reproductive structures were measured. Colony coloration and coloring of culture medium were also observed.

For the genealogical analyses of *Fusarium* spp. strains, a molecular character matrix was analyzed to assess for potential genetic structure among the different populations. For rooting the genealogy, *Gliocladiopsis curvata* (1 individual) was used as outgroup. The matrix was assembled with the 500 bp fragment used to identify the fungi at species level along with a 600 pb sequence of the 28S rDNA gene. The final alignment of the molecular data produced a matrix of 1325 positions. The matrix was analyzed through Bayesian inference (BI) using a maximum likelihood criterion for selecting the optimal trees. To reconstruct the BI trees, the evolutionary model of each molecular partition as chosen by jMODELTEST v 2.0.2 (Guindon and Gascuel 2003; Darriba et al. 2012). The model parameters were used as prior [i.e., TIM1 (nst 6) + gamma, gamma shape = 0.364 for ITS; TIM3 (nst 6) + I, invariant sites = 0.829 for 28S rRNA]. To allow for differences in the evolutionary characteristics of each partition, substitution models were set as unlinked. Tree space was explored using MRBAYES v. 3.2.2 (Ronquist et al. 2012). For these data sets, two parallel Markov chain Monte Carlo (MCMC) analyses were run simultaneously, each for a minimum of 20 million generations, sampling every 1000 generations. A 25% burn-in value was set (Ronquist et al. 2012) to only include trees after the -lnL values reached an asymptote. Finally, a majority rule consensus tree was calculated, showing nodes with a posterior probability (*pp*) higher than 0.5. All trees were drawn using FIGTREE v 1.4.2 (Rambaud 2009).

Results and discussion

Many females, eggs and J2 stage juveniles of *M. paranaensis* were observed in the roots affected with the coffee corky-root disease (Figure 1a, b and c). Cell lesions caused by the displacement of the J2 through the root tissues were also observed (Figure 1b). Corky protrusions with presence of numerous *M. paranaensis* individuals (females, J2 and egg masses) have been even observed on the stem up to about 5 cm above ground (Figure 1d). As far as we know this the first report of RKN presence and

symptoms at a so high level in plant. The pericycle and cortical tissues of corky-roots and stem lower parts of infested coffee plants showed cell distortions and corrugations and also some cell wall thickenings (Figures 1, b,c and 2 a,b). No change in cortical cell volumes was observed in corky-root tissues compare to healthy tissues but hyperplasia like process were observed such as much more cortical cell layers leading to a lateral expansion of the root or stem cortex. The presence of many conidia was observed in the cells of the infested tissues so as abundant mycelium crossing the cell walls, even in tissue area where nematodes were not observed (Figure 2 c, d). In the vascular system healthy roots, it was possible to observe the presence of many organic particles which nature was confirmed by energy-dispersive X-ray spectroscopy (72,1% C and 27,9% O) (Figure 2 e, f), while this material was not observed at any time in the vascular systems of diseased roots, revealing a dysfunction in the vascular nutrient transport. Numerous bacteria were observed in the corky root tissues (Figure 3 a, b) while no bacteria was observed in healthy tissues. To date no bacteria has been reported as associated to the coffee corky root disease. However, by our observations it seems necessary to investigate if some of these bacteria detected in the inner corky-root tissues could be involved in the pathogenesis of the disease as being part of the corky-root pathobioma or if they just have an opportunistic role as saprophytes developing on decaying tissues. Studies realized in tomato indicates that the community of endophyte bacterias are significantly affected by the infection of the nematode *M. incognita* which brings some new groups of bacteria, particularly those that contributes to the nematode infection process by degrading the plant cellular walls in the feeding sites or allowing a mutualistic relation with the provision of nutrients (Tian et al. 2015). We are actually carrying out the taxonomic and functional characterization of the bacterial flora associated to the corky-root pathobioma in order to elucidate its role in the etiology of the coffee corky root disease.

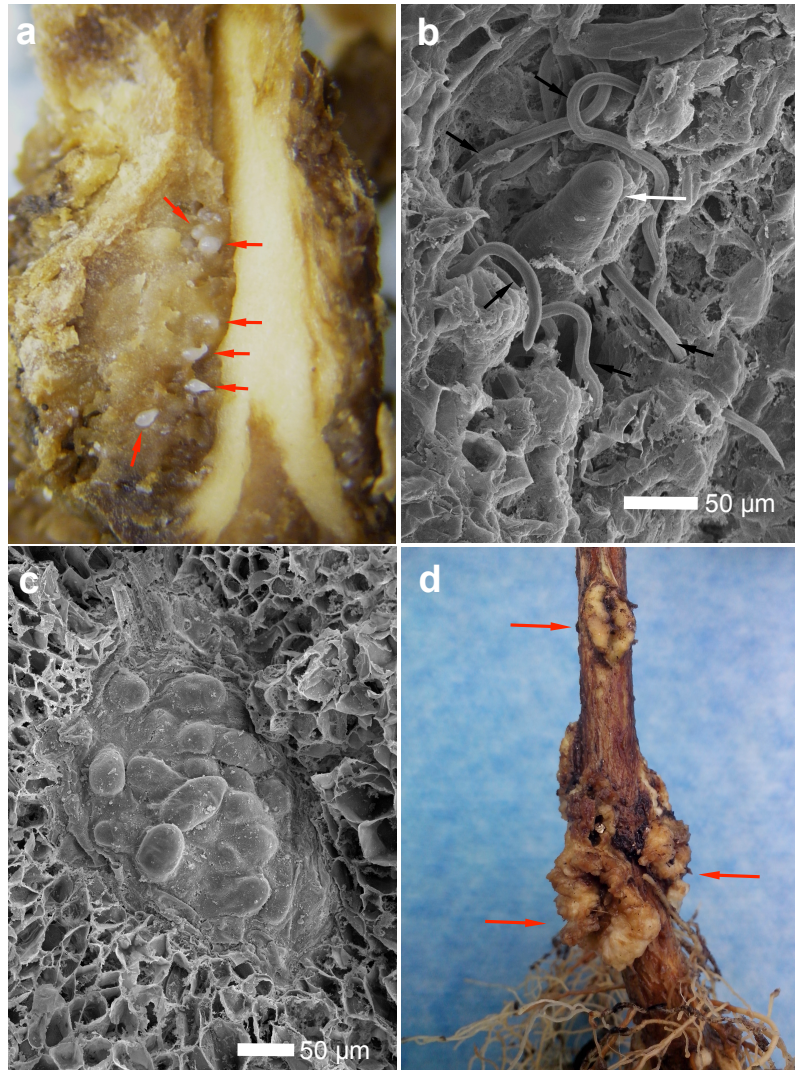


Fig. 1 Coffee corky-root disease symptoms associated to *Meloidogyne paranaensis* parasitism on *Coffea arabica*. a) Longitudinal section of an infested root showing numerous *M. paranaensis* females (red arrows) inside the corky tissues 10X; b) corky-root symptoms on the stem base of a 12 month aged coffee seedling; c) Detail of a root inside corky tissue with a female (white arrow) and J2 stage juveniles (black arrows) of *M. paranaensis* 350X; d) Egg mass of *M. paranaensis* (center of the picture) with the eggs already wrapped by the gelatinous matrix and surrounded by distorted and corrugated tissues 270X

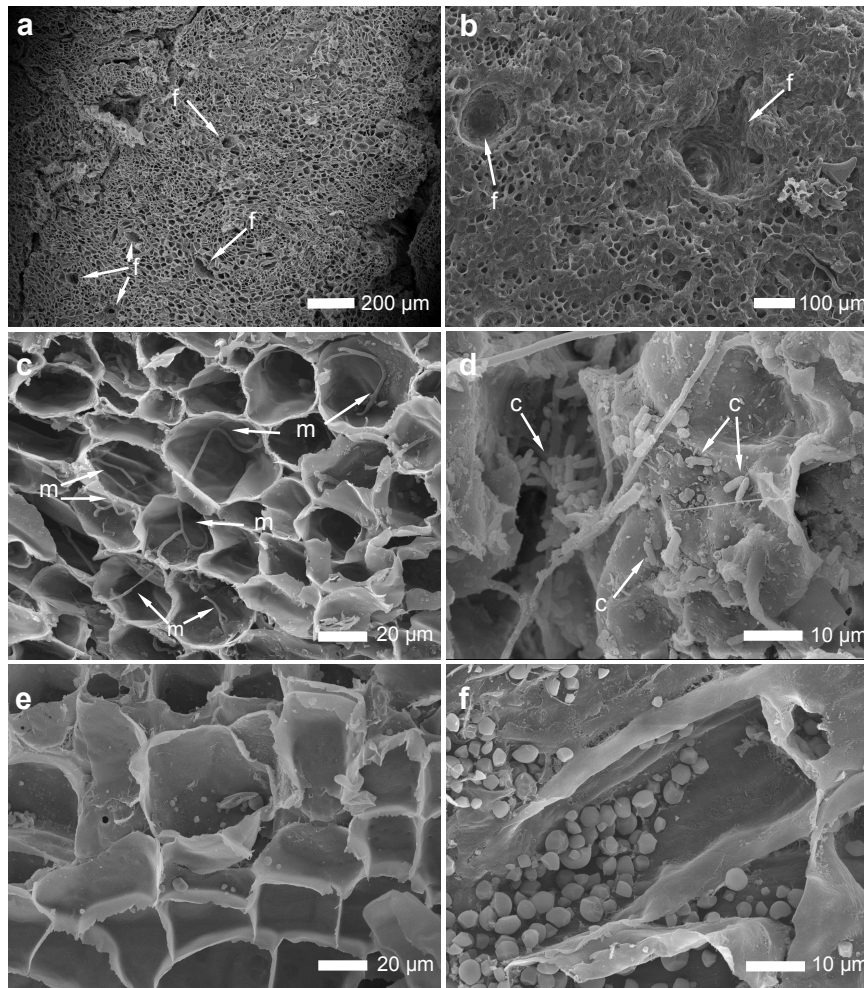


Fig. 2 Sections of healthy and infested coffee roots and stems observed under scanning electron microscope. a) Transversal section of a corky formation on the stem 60X; b) transversal section of a corky-root 120X; c) pericycle cells in an infected root with presence of mycelia 700X; d) transversal section of the vascular system of a coffee corky-root with presence of mycelium and conidia 1600X; e) pericycle cells in a healthy root 700X; f) longitudinal section of a vascular system of a healthy coffee root with presence of numerous sap organic particles 1600X. f= lesions left by the growth of females; m= mycelium; c = conidia

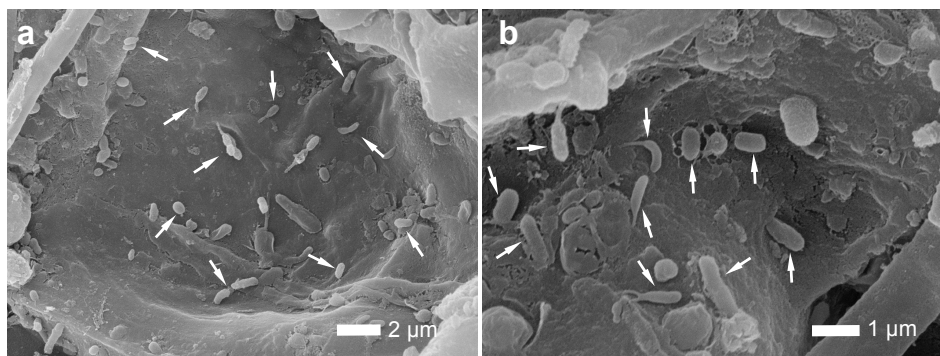


Fig. 3 Bacteria inside cells of coffee corky-root tissues (transversal section): a) 6000 and b) 13000X

Forty-nine fungi strains were obtained from the coffee corky-root inner tissues. According to the molecular identification, 55 % of the isolates correspond to *Fusarium oxysporum*; 12 % to *Penicillium citrinum*; 10 % to *F. solani*; 10 % to *Purpureocillium lilacinum*; 4% to *Alternaria longissima* and the remaining 8% to the following species: *Baeuveria bassiana*, *Gliocladiopsis curvata*, *Pochonia chlamidosporya* and *Stereum complicatum*. The isolation of every fungus in each sampling sites is summarized in the table 1. Except *F. oxysporum* and *F. solani*, all species of fungi found in this work are registered for the first time on coffee corky-roots. *Alternaria* sp., *Beauveria bassiana*, *F. oxysporum* and *Penicillium citrinum* have been registered as endophyte of healthy coffee plant roots (Vega et al. 2006; Posada et al. 2007; Vega et al. 2010). Some others like *Alternaria citri*, *Beauveria brongniartii*, and *Paecilomyces* sp., have been registered as endophyte of coffee leafs in central Veracruz (Saucedo-Garcia et al. 2014). *Gliocladiopsis curvata* is a fungus previously isolated from soil and plants debris, although its ecology or role as potential pathogen of plants is less known (Lombard and Crous 2012). *Stereum complicatum* is a saprophytic fungus commonly found in decaying wood tissues (Berry and Lombard 1978). *Purpureocillium lilacinus* and *Pochonia chlamydo-sporya* are fungi commonly associated to nematodes and they may be found parasitizing *Meloidogyne paranaensis* (Prasad et al. 2015). *F. oxysporum* was the only species found in all sampling sites of this study. In Costa Rica, the simultaneous role of *F. oxysporum* and the RKN *M. arabicida* as causal agents of a similar coffee corky-root disease was demonstrated (Bertrand et al. 2000). In Puerto Rico, strains identified as *F. oxysporum* f. sp. *coffeeae*, have been registered as pathogen on coffee, causing vascular wilting in coffee plants infested with the RKN *M. incognita*, however without mentioning corky-root symptoms (Negrón and Acosta 1989).

Table 1 Geographic data of coffee corky-root sampling sites and corresponding fungi species molecular diagnostic.

Location	Municipality/ Locality	Altitude m.s.l.	Host Species, and cultivar	Isolate code	Molecular species diagnostic	% identity	NCBI accession number
N 19°54'13.1'' W 97°13'28.4''	Atzalan, Napuala	689	<i>Coffea arabica</i> cv. Costa Rica 95	Na1	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	KU847855
				Na2	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	99	KC157741
				Na3	<i>Penicillium citrinum</i> *	99	KX090324
				Na4	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	KU847855
				Na5	<i>Stereum complicatum</i> *	99	KJ140584
				Na6	<i>Fusarium oxysporum</i>	94	KY073258
N 19°51'50.8'' W 97°10'06.8''	Atzalan, Chachalacas	664	<i>Coffea canephora</i> cv. unknown	Ch1	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	LT571434
				Ch2	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	KC304813
				Ch3	<i>Purpureocillium lilacinum</i> *	100	KM458848
				Ch4	<i>Purpureocillium lilacinum</i> *	99	KX347471
				Ch5	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KF718222
N 19°50'27.6'' W 96°47'05.8''	Yecuatla, La Victoria	559	<i>Coffea arabica</i> cv. Typica	Ye1	<i>Beauveria bassiana</i> *	99	KX219590
				Ye2	<i>Purpureocillium lilacinum</i> *	99	FJ765023
				Ye3	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KX196809
				Ye4	<i>Alternaria longissima</i> *	99	DQ865104
				Ye5	<i>Fusarium solani</i>	99	KU377471
				Ye6	<i>Alternaria longissima</i> *	96	DQ865104
				Ye7	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KC304807
				Ye8	<i>Fusarium solani</i>	98	KU878142
N 19°35'42.2'' W 96°53'01.4''	Jilotepec, Paso San Juan	996	<i>Coffea arabica</i> cv. Costa Rica 95	Ji1	<i>Penicillium citrinum</i> *	100	KX090324
				Ji2	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KU680363
				Ji3	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KX196807
				Ji4	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KX058057
				Ji5	<i>Fusarium solani</i>	100	HQ176441
				Ji6	<i>Penicillium citrinum</i>	100	KX090324
				Ji7	<i>Penicillium citrinum</i>	100	KX090324
N 19°19'45.4'' W 96°58'20.1''	Cosautlan, La Lagunilla	1152	<i>Coffea canephora</i> cv. unknown	Co1	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KT896661
				Co2	<i>Gliocladiopsis curvata</i> *	99	JX500723
				Co3	<i>Fusarium oxysporum</i>	96	KC282839
				Co4	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KC304799
				Co5	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KC304807
N 19°11'44.5'' W 96°56'38.1''	Sochiapa, Sochiapa	1361	<i>Coffea arabica</i> cv. Caturra	So1	<i>Fusarium oxysporum</i>	98	KY073257
				So2	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KJ699122
				So3	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KC304800
				So4	<i>Fusarium solani</i>	100	JQ676178
				So5	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KC787019
				So6	<i>Fusarium oxysporum</i>	98	XR001936475
				So7	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	KU847855
N 19°03'16.5'' W 96°55'41.3''	Ixhuatlan del Café, Moctezuma	1186	<i>Coffea arabica</i> cv. Garnica and Pacamara	Mo1	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	EU715659
				Mo2	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KC304813
				Mo3	<i>Penicillium citrinum</i> *	100	KX090324
				Mo4	<i>Penicillium citrinum</i> *	100	KX090324
N 19°01'50.7'' W 96°56'58.0''	Ixhuatlan del Café, Nevería	1219	<i>Coffea arabica</i> cv. Bourbon and Caturra	Ne1	<i>Fusarium solani</i>	99	JQ712137.1
				Ne2	<i>Purpureocillium lilacinum</i> *	99	KX347471
				Ne3	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	EF590327
				Ne4	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KX196809
				Ne5	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	KC304802
				Ne6	<i>Pochonia chlamydosporia</i> *	99	KT583165
				Ne7	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	KT896661

*Not associated with coffee corky-root before this work

In Brazil, this same *F. oxysporum* f. sp. *coffea* was reported as causing vascular wilting without pointing the presence of nematodes (Cardoso 1986). On the other hand, though *F. solani* has been only detected on four sampling sites, this fungus has also been previously detected in coffee corky-roots in the State of Veracruz (Téliz-Ortíz et al. 1993). However, the only report of *F. solani* as a confirmed causal agent of a coffee disease is from Kenya causing a coffee root rot (Baker 1972). For these reasons, the isolates of these two *Fusarium* species were used to perform the morphological characterization and genealogical analysis.

Twenty-seven strains of *F. oxysporum* were obtained in total, which, as described thereafter, showed the typical morphologic characteristics of the specie though some variation was found (Seifert 2001). The diameter of the colonies varied from 4 to 7.9 cm at the fifth day after inoculation in PDA medium. The mycelium of the strains was from scarce and attached to the culture medium to abundant and floccose. Mycelium was white or pale pink with some violet coloration and presented slightly lobed or smooth margins. Numerous individually formed microconidia were observed in all strains, with an oval shape and 1-2 septa produced in a monophialidic type conidiogenic cells. The size of the microconidia was of 2- 16 μ . The macroconidia were observed in six strains and were typically falcate, wider in the middle with pointed ends, with 3 to 5 thin wall septa. They were produced in sporodochia and masses of viscous conidia.

The length of the macroconidia was 14 - 42 μ m. Chlamydospores were observed in 25 strains and were formed individually or in chains of up to five elements with smooth or rough walls, 5 - 10.4 μ m in diameter. The morphological characteristics of each strain are summarized in table 2.

Five strains of *F. solani* were obtained in total, which showed the typical morphologic characteristics of the specie (Booth 1971). The diameter of the *F. solani* colonies varied from 5.35 to 6.42 cm on the fifth day of the inoculation in PDA. Mycelium was abundant cottony white yellowish with pale orange pigmentations and smooth margins. Oval microconidia with a septa of 4 to 16 μ m in length produced in a monophialidic type conidiogenic cells. No macroconidia or chlamydospores were observed in the five isolates of *F. solani*.

Table 2 *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* morphological characteristics.

Isolate	Species	Colony diameter (5 th day) cm	Color		Microconidia		Macroconidia		Chlamydoconidia	
			Anverse	Reverse	Shape	Size (µm)	Shape	Size (µm)	Shape	Diameter (µm)
Na1	<i>F. oxysporum</i>	5.03	Violet	Red and grey	Oval with one septa	4-8	NO	NO	Single smooth-walled intercalate or terminal	8.4-8.8
Na4	<i>F. oxysporum</i>	4.95	Violet	Red and grey	Oval with one septa	4-10	NO	NO	Single and paired smooth-walled intercalate or terminal	10-10.4
Na6	<i>F. oxysporum</i>	4.95	Violet	Violet and beige	Oval with one or two septa	4-10	NO	NO	Single and paired smooth-walled intercalate or terminal	7.2-8.1
Ch1	<i>F. oxysporum</i>	4.88	Violet	Violet and beige	Oval with one or two septa	2-10	NO	NO	Single smooth-walled or verrucose terminal or intercalate	9-9
Ch2	<i>F. oxysporum</i>	5.08	White	White	Oval with one or two septa	4-8	NO	NO	Single smooth-walled terminal or intercalate	6.2-6.2
Ch5	<i>F. oxysporum</i>	4.86	Violet	Violet and beige	Oval with one or two septa	4-10	NO	NO	Single and paired smooth-walled terminal	8.1-8.3
Ye3	<i>F. oxysporum</i>	5.85	Violet	Violet and white	Oval with one or two septa	2-10	Falcate two to five septa	18-38	NO	NO
Ye7	<i>F. oxysporum</i>	6.15	Violet	Violet and white	Oval with one or two septa	2-10	Falcate two to four septa	14-30	Chain 2 and 3 verrucose intercalate or terminal	8.8-9.2
Si 2	<i>F. oxysporum</i>	5.01	Violet	Violet and red	Oval with one or two septa	4-10	NO	NO	Single and chain 3 smooth-walled terminal	6.4-6.8
Si 3	<i>F. oxysporum</i>	6.0	Violet	Violet and red	Oval with one or two septa	4-10	NO	NO	Single smooth-walled terminal or intercalate	6.4-7.6
Si 4	<i>F. oxysporum</i>	5.33	Violet	Violet and white	Oval with one septa	4-10	Falcate three to six septa	16-32	Single smooth-walled terminal or intercalate	9.4-9.8
Co1	<i>F. oxysporum</i>	6.9	Violet	Violet	Oval with one septa	4-10	NO	NO	Single verrucose terminal or intercalate	7.6-8
Co3	<i>F. oxysporum</i>	5.91	Violet	Violet	Oval with one or two septa	3-10	NO	NO	Chain 2 and 3 verrucose terminal or intercalate	8.8-9
Co4	<i>F. oxysporum</i>	5.45	Violet	Violet	Oval with one septa	4-10	NO	NO	NO	NO
Co5	<i>F. oxysporum</i>	5.5	Violet	Violet	Oval with one or two septa	4-8	NO	NO	Chain 2, 3 and 4 verrucose terminal or intercalate	9.4-9.4
So1	<i>F. oxysporum</i>	6.53	White and violet	White	Oval with one or two septa	4-12	Falcate 3 to 5 septa	22-34	Single verrucose terminal or intercalate	9.4-9.8
So2	<i>F. oxysporum</i>	4.1	Red	Red	Oval with one or two septa	4-12	NO	NO	Single verrucose terminal	8.3-8.5
So3	<i>F. oxysporum</i>	5.83	Red and white	Red	Oval with one or two septa	5-13	NO	NO	Single verrucose terminal	8.1-8.5
So5	<i>F. oxysporum</i>	7.53	Red	Red	Oval with one or two septa	4-12	NO	NO	Single verrucose terminal	8.2-8.4
So6	<i>F. oxysporum</i>	7.55	Red	Red	Oval with one or two septa	4-12	NO	NO	Single verrucose terminal	8.1-8.3
So7	<i>F. oxysporum</i>	7.95	Red and grey	Grey	Oval with one or two septa	4-10	Falcate 3 to 4 septa	20-32	Chain 2 and 3 verrucose terminal or intercalate	9.6-9.8
Mo1	<i>F. oxysporum</i>	6.9	Red	Red	Oval with one septa	4-10	NO	NO	Single verrucose terminal or intercalate	5.2-5.4
Mo2	<i>F. oxysporum</i>	7.2	Red	Red	Oval with one septa	2-8	Falcate 3 to 5 septa	28-42	Chain 2, 3, 4 and 5 verrucose terminal	9-9.2
Ne3	<i>F. oxysporum</i>	6.31	Red	Red	Oval with one or two septa	4-10	NO	NO	Single verrucose terminal or intercalate	8.4-8.7
Ne4	<i>F. oxysporum</i>	7.38	Red	Red and grey	Oval with one or two septa	4-10	NO	NO	Single verrucose terminal or intercalate	8.2-8.5
Ne5	<i>F. oxysporum</i>	8.2	Violet	Violet	Oval with one septa	4-8	NO	NO	Chain 2, 3, 4 and 5 verrucose terminal or intercalate	8.6-8.8
Ne7	<i>F. oxysporum</i>	8.1	Violet	Violet	Oval with one septa	4-8	NO	NO	Chain 2, 3, 4 and 5 verrucose terminal or intercalate	8.6-8.9
Ye5	<i>F. solani</i>	5.52	White and orange	Orange	Oval with one septa	6-14	NO	NO	NO	NO
Ye8	<i>F. solani</i>	5.35	Orange	Orange	Oval with one septa	6-14	NO	NO	NO	NO
Si5	<i>F. solani</i>	6.42	Orange	Orange	Oval with one septa	4-14	NO	NO	NO	NO
So4	<i>F. solani</i>	5.48	Orange	Orange	Oval with one septa	4-16	NO	NO	NO	NO
Ne1	<i>F. solani</i>	5.62	Orange	Brown	Oval with one septa	4-14	NO	NO	NO	NO

The genealogical analysis was able to differentiate clearly *F. oxysporum* and *F. solani*. Both species were recovered in monophyletic trees supported by pp = 1, and a bootstrap value of at least 99% (Figure 4). Although some structure was observed within the *F. oxysporum* lineage, such structure did not show any relationship with the

geographic localities. Samples isolated from one place were genetically more related to samples isolated from other areas (e.g., Neveria to Sochiapa, Napuala to Cosautlan). The lack of geographic coherence could be the result of intensive gene flow among localities, or by cross infection in coffee-plant nurseries. The absence of structure, both genealogic and geographic, within *Fusarium oxysporum* and *F. solani* is strong evidence that these organisms represent well-defined taxonomic and phylogenetic species.

Additionally, the morphological characters observed in the isolations of *Fusarium* spp. were mapped on the genealogy to explore for possible fixations of trait. None of the few identified subclade forms within *F. oxysporum* lineage was characterized by exclusive morphological characters among those observed in this work like colony color, microconidia size or macroconidia production (Table 2). The presence of chlamydospores, however, was recovered at the based of this lineage. The *F. oxysporum* clade, therefore, could be differentiated from the *F. solani* clade by the presence of such structures. On the other hand, only the *F. solani* isolates showed orange coloration in their colonies. Further and more extensive studies are necessary to corroborate if those features could be considered as potential diagnostic morphological characters.

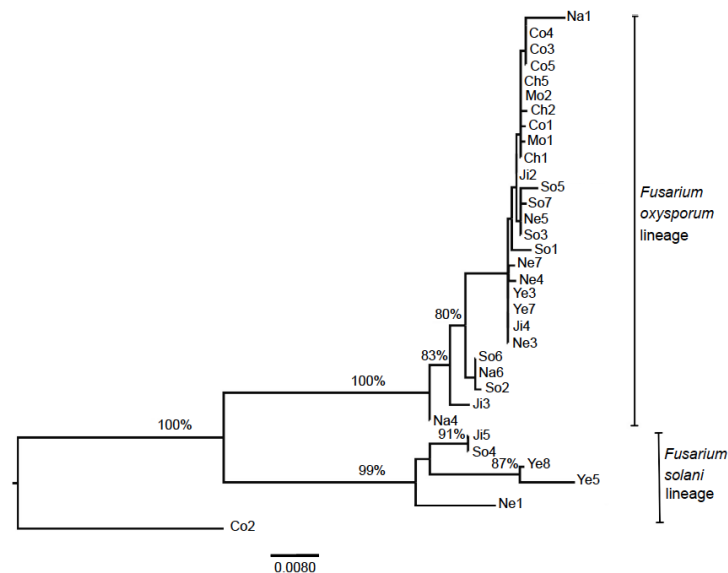


Fig. 4 Genealogical analysis between strains of *Fusarium oxysporum* and *F. solani* isolated from coffee corky-roots in the state of Veracruz, Mexico

Fusarium oxysporum and *F. solani* are considered as a complex of species which includes: numerous plant pathogenic strains referred as special forms related to some host plant(s); opportunistic strains that cause infections in humans and animals; saprophytic populations that are found commonly in soil, roots in senescence, vegetal debris (Chehri et al. 2015; van Diepeningen and de Hoog 2016). *F. oxysporum* also has been registered as endophytic, that in many cases are beneficial for plants by releasing growth promoting substances or as antagonists of different plant pathogens (Freire et al. 2012; Waweru et al. 2014).

So, it will be necessary to define the pathogenicity level of these collected *Fusarium oxysporum* and *F. solani* strains in absence and in presence of the RKN, *M. paranaensis* in order to clarify the role of these fungi in the etiology of the coffee corky-root disease.

References

- Avelino, J., Cristancho, M., Georgiou, S., Imbach, P., Aguilar, L., Bornemann, G., Läderach, P., Anzueto, F., Hruska, A.J., Morales, C. (2015). The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. Food Security, doi:10.1007/s12571-015-0446-9
- Baker, C.J. (1972). *Fusarium solani* associated with a wilt of *Coffea arabica* in Kenya. East African Agricultural and Forestry Journal, 38,137-140
- Bertrand, B., Anthony, F. (2008). Genetics of resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and breeding. In R. Souza (Ed.), Plant-Parasitic Nematodes of Coffee (pp. 165–190). Houten: Springer.
- Bertrand, B., Nuñez, C., Sarah, J.L. (2000). Disease complex in coffee involving *Meloidogyne arabicida* and *Fusarium oxysporum*. Plant Pathology, 49:383- 388.
- Bertrand, B., Ramirez, G., Topart, P., Anthony, F. (2002). Resistance of cultivated coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*) trees to corky-root caused by *Meloidogyne arabicida* and *Fusarium oxysporum*, undercontrolled and field conditions. Crop Protection, 21,713–719.
- Bertrand, B., Alpizar, E., Lara, L., SantaCreo, R., Hidalgo, M., Quijano, J.M., Montagnon, C., Georget, F., Etienne, H. (2011). Performance of *Coffea arabica*

- F1 hybrids in agroforestry and full-sun cropping systems in comparison with American pure line cultivars. *Euphytica*, 181,147–158.
- Berry, F.H., Lombard, F.F. (1978). Basidiomycetes associated with decay of living oak trees. Broomall, PE: USDA Forest Service Research Paper.
- Booth, C. (1971). The genus *Fusarium*. Surrey: Commonwealth Mycological Institute.
- Campos, V.P., Villain, L. (2005). Nematode parasite of coffee and cocoa. In M. Luc, R.A. Sikora, J. Bridge (Eds.), *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (2nd ed) (pp 529–579). Wallingford: CABI Publishing.
- Cardoso, R.M.L. (1986). A vascular wilt of coffee (*Coffea arabica*) in the state of Parana, Brasil, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *coffeeae*. *Fitopatologia Brasileira*, 11,753-760.
- Carneiro, R.M.D.G., Carneiro, R.G., Abrantes, I.M.O., Santos, M., Almeida, M.R.A. (1996). *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae) a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. *Journal of Nematology*, 28,177-189.
- Carneiro, R.M.D.G., Cofcewicz, E.T. (2008). Taxonomy of Coffee-Parasitic Root-Knot Nematodes, *Meloidogyne* spp. In R.M. Souza (ed.), *Plant-Parasitic Nematodes of Coffee* (pp. 87-122). Netherlands: Springer.
- Chehri, K., Salleh, B., Zakaria, L. (2015). Morphological and phylogenetic analysis of *Fusarium solani* species complex in Malaysia. *Microbial Ecology*, 69,457–471 DOI 10.1007/s00248-014-0494-2
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9,772.
- Esbenshade, P.R., Triantaphyllou, A.C. (1985), Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species (Nematoda: Tylenchida). *Journal of Nematology*, 17,6-20.
- Ferraz, L.C.C.B. (2008). Brazil In R.M. Souza (ed.), *Plant-Parasitic Nematodes of Coffee* (pp. 225-248). Netherlands: Springer.
- Freire, E.S., Campos, V.P., Pinho, R.S.C., Oliveira, D.F., Faira, M.R., Pohlit, A.M., Noberto, N.P., Rezende, E.L., Pfenning, L.H., Silva, J.R.C. (2012). Volatile substances produced by *Fusarium oxysporum* from coffee rhizosphere and other microbes affect *Meloidogyne incognita* and *Arthrobotrys conoides*. *Journal of Nematology*, 44,321–328.

- García, P.P., Cid del Prado, V.I., Zavaleta-Mejía, E., Téliz, O.D. (1997). La corchosis del cafeto (*Coffea arabica* L.) alternativas de su manejo. *Nematropica*, 27,111
- Guindon, S., Gascuel, O. (2003). A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". *Systematic Biology*, 52,696-704.
- Hernández, A., Fargette, M., Sarah, J.L. (2004). Characterisation of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) from coffee plantations in Central America and Brazil. *Nematology*, 6,193-204.
- Hernández-Martínez, G., Manson, R., Contreras-Hernández, A. (2009). Quantitative classification of coffee agroecosystems spanning a range of production intensities in central Veracruz, Mexico. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 134,89–98.
- INIFAP, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (2005). Clones de *Coffea canephora* como patrones para injertos con tolerancia a la corchosis de la raíz del café. Folleto técnico no. 3. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. http://www.inifap.gob.mx/Documents/reportes/reporte_anual2004.pdf Accessed 25 April 2016
- International Coffee Organization (ICO) (2016). Coffee trade statistics. <http://www.ico.org>
- Lambert, K. Bekal, S. (2002). Introduction to Plant-Parasitic Nematodes. The Plant Health Instructor. doi:10.1094/PHI-I-2002-1218-01
- Lombard, L., Crous, P.W. (2012). Phylogeny and taxonomy of the genus *Gliocladiopsis*. *Persoonia*, 28,25–33.
- López, R., Salazar, L. (1989). *Meloidogyne arabicida* n. sp. (Nemata: Heteroderidae) nativo de Costa Rica. Un nuevo y severo patógeno del cafeto. *Turrialba*, 39,313-323.
- López-Lima, D., Sánchez-Nava, P., Carrión, G., Espinosa de los Monteros, A., Villain, L. (2015). Corky-root symptoms for coffee in central Veracruz are linked to the root-knot nematode *Meloidogyne paranaensis*, a new report for Mexico. *European Journal of Plant Pathology*, 141,623-629.
- Marbán-Mendoza, N., Torres, O.M., Calderón, V. (1989). Etiología de la corchosis del cafeto en Costa Rica. In *Resúmenes del XII Simposio de Cafecultura*

- Latinoamericana. San Pedro Sula: IICA-PROMECAFE.
- Negrón, J.A., Acosta, N. (1989). The *Fusarium oxysporum* f. sp. *coffae*-*Meloidogyne incognita* complex in Bourbon Coffee. *Nematropica*, 19,161-168.
- Posada, F., Aime, M.C., Peterson, S.W., Rehner, S.A., Vega, F.E., (2007). Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Mycological Research*, 111,749–758.
- Prasad, P., Varshney, D., Adholeya, A. (2015). Whole genome annotation and comparative genomic analyses of bio-control fungus *Purpureocillium lilacinum*. *BMC Genomics*, doi:10.1186/s12864-015-2229-2
- Rambaud, A. (2009). FigTree, 1.4.2. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>. Accessed 25 March 2016.
- Romero, A., Carrion, G., Rico-Gray, V. (2001). Fungal latent pathogens and endophytes from leaves of *Parthenium hysterophorus* (Asteraceae). *Fungal Diversity*, 7,81-87.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna S., et al. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61,539–542.
- Saucedo-García, A., Anaya, A.L., Espinosa-García, F.J., González, M.C. (2014). Diversity and communities of foliar endophytic fungi from different agroecosystems of *Coffea arabica* L. in two regions of Veracruz, México. *PLoS ONE*, doi:10.1371/journal.pone.0098454
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., et al. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS*, 109,6241–6246.
- Seifert, K.A. (2001). *Fusarium* and anamorph generic concepts. In: B.A. Summerell, J.F. Leslie, D. Backhouse, W.L. Bryden, L.W. Burgess (eds.), *Fusarium* (pp. 15-28). St. Paul, Minnesota: APS Press.
- Téliz-Ortíz, D., Castillo-Ponce, G., Nieto-Angel, D. (1993). La corchosis del cafeto en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 11,5–12.
- Tian, B.Y., Cao, Y., Zhang, K.Q. (2015). Metagenomic insights into communities, functions of endophytes, and their associates with infection by root-knot

- nematode, *Meloidogyne incognita*, in tomato roots. Scientific reports, 5,17087.
- van Diepeningen, A.D., de Hoog, G.S. (2016). Challenges in *Fusarium*, a trans-kingdom pathogen. Mycopathologia, doi:10.1007/s11046-016-9993-7
- Vayssier-Taussat, M., Albina, E., Citti, C., Cosson, J-F., Jacques, M-A., Lebrun, M-H., et al. (2014). Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, doi: 10.3389/fcimb.2014.00029
- Vega, F.E., Posada, F., Peterson, S.W., Gianfagna, T.J., Chaves, F. (2006). *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. Mycologia, 98,31-42.
- Vega, F.E., Simpkins, A., Aime, M.C., Posada, F., Peterson, S.W., Rehner, S.A., Infante, F., Castillo, A., Arnold, E. (2010), Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawaii, Mexico and Puerto Rico. Fungal Ecology, 3,122-138.
- Villain, L., Baujard, P., Anzueto, F., Hernández, A., Sarah, J.L. (2002). Integrated protection of coffee plantings in Central America against nematodes. Plante Recherche Développement (Special issue: Research and coffee growing), 118-133.
- Villain, L., Molina, A., Sierra, S., Decazy, B., Sarah, J.L. (2000). Effect of grafting and nematicide treatments on damage by root-lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) to *Coffea arabica* L. in Guatemala. Nematropica, 30,87-100.
- Villain, L., Sarah, J.L., Hernández, A., Bertrand, B., Anthony, F., Lashermes, P., Charmetant, P., Anzueto, F., Carneiro, R.M.D.G. (2013). Diversity of root-knot nematodes parasitizing coffee in Central America. Nematropica, 43:194–206.
- Waweru, B., Turoop, L., Kahangi, E., Coyne, D., Dubois, T. (2014). Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* endophytes provide field control of nematodes, improving yield of banana (*Musa* sp.). Biological Control, 74,82–88.

7.3 Colonización vascular de *Fusarium oxysporum* en plantas de *Coffea arabica*

Introducción

Fusarium oxysporum es un parásito facultativo comúnmente presente en los suelos de todos el mundo (Herrera y Ulloa 1990). Dentro de esta especie se incluyen muchas cepas patógenas de plantas, cepas oportunistas que causan infecciones en humanos y animales y poblaciones saprófitas que se encuentran comúnmente en el suelo, en las raíces en senescencia y otros residuos vegetales. Las cepas patógenas de plantas causan marchitamiento vascular y necrosis de la raíz en muchos cultivos importantes (Haegi et al. 2013). Las infecciones causadas por *F. oxysporum* causan miles de millones de dólares de pérdidas y se necesitan grandes inversiones en plaguicidas y otras medidas para mantener las enfermedades bajo control (van Diepeningen y de Hoog). Las cepas patógenas de *F. oxysporum* están clasificadas en el grupo taxonómico denominado *forma specialis* (f. Sp.), que se refiere a los hongos parásitos que son morfológicamente similares al resto de las cepas de la especie pero están adaptados a un hospedero en particular (Ulloa y Hanlin 2002). A la fecha se conocen más de 100 formas especiales incluyendo a *Fusarium oxysporum* f. Sp. *coffeeae*, el cual se ha registrado como el agente causal del marchitamiento vascular de las plantas de café en Brasil y Puerto Rico, en este ultimo país en asociación con el nematodo *M. incognita* (Cardoso 1986; Negrón y Acosta 1989). En México, *F. oxysporum* f sp. *coffeeae* se ha determinado como uno de los patógenos involucrados en el desarrollo de la enfermedad conocida como corchosis de la raíz del cafeto junto con el nematodo *Meloidogyne* sp. (Teliz-Ortíz et al. 1993; Alanís-Martínez et al. 2015). Esta enfermedad es considerada un serio problema para la producción cafetalera en México debido a que esta presente en numerosas plantaciones (López-Lima et al. 2015) y a la falta de variedades resistentes. Recientemente se aislaron e identificaron los hongos asociados a cafetos con corchosis de la raíz infestados con el nematodo *Meloidogyne paranaensis* en ocho sitios de la principal zona de producción de café del estado de Veracruz. Dentro de estos aislamientos *F. oxysporum* fue la única especie aislada en todos los sitios de muestreo. El objetivo de este trabajo es determinar la capacidad de 27 cepas de *Fusarium oxysporum* aisladas de raíces de café con corchosis para i) causar síntomas de marchitamiento vascular y ii) colonizar el sistema vascular, esto en plantas de *Coffea arabica* con raíces lesionadas y sin lesiones.

Materiales y métodos

Plántulas *ex vitro* de *Coffea arabica* con dos a tres pares de hojas fueron usadas para probar la patogenicidad y la colonización vascular de las 27 cepas de *Fusarium oxysporum* previamente identificadas y caracterizadas. El híbrido F1 intraespecífico H18 (accesión silvestre Etíope ET06 x Cv. introgresado Naryelis) fue usado para este experimento. Además del hecho de que las plántulas *ex vitro* fueron aclimatadas en charolas hortícolas llenas de turba esterilizada, permitiendo trabajar con material vegetal libre de patógenos, este germoplasma micro-propagado por embriogénesis somática proporcionó plantas homogéneas (Bobadilla et al. 2013). Las plántulas se extrajeron de las charolas hortícolas y las raíces se lavaron cuidadosamente con agua destilada estéril. Dos diferentes grupos de plántulas fueron preparados para la inoculación con *F. oxysporum*. Las plántulas en el primer grupo fueron predisuestas para la infección del hongo cortando la raíz pivotante a un centímetro de su ápice con un bisturí estéril para exponer el haz vascular (Cumagun et al. 2010; Sestili et al. 2011). En el segundo grupo, las plántulas se mantuvieron con las raíces intactas.

Cada cepa de *F. oxysporum* fue inoculada en cinco plántulas de cada uno de los dos grupos sumergiendo las raíces en 75 mL de una suspensión de conidios por 20 min (Haegi et al. 2013).

Posteriormente, todas las plántulas de café fueron transferidas a macetas de 100 mL llenas con una mezcla de sustrato peat moss-arena 2:1 esterilizada en autoclave dos veces y colocadas en invernadero a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ con una humedad relativa de 80-90% y un fotoperiodo de 12 horas. El experimento se arregló en un diseño completamente al azar. Las plántulas fueron regadas manualmente cada 72 horas con agua estéril.

Preparación del inóculo

El inóculo se preparó cultivando el micelio de cada cepa en matraces con medio líquido de extracto de avena-levadura (10 g L^{-1} y 1 g L^{-1}). Los matraces se incubaron en un agitador orbital a 150 rpm y 25°C durante 5 días. La concentración de conidios se determinó con un hematocitometro y se ajustó a 1×10^6 esporas mL.

Evaluación

Las plantas se extrajeron de las macetas 45 días después de la inoculación. Las raíces se lavaron con agua destilada estéril para eliminar el exceso de sustrato. Los síntomas como lesiones, necrosis y marchitez se evaluaron mediante una escala de 1 a 5 para determinar la tasa de severidad de la enfermedad según Parke y Grau (1993) y Reis y Boiteux (2007) donde:

1 = Planta sin síntomas

2 = Plantas sin síntomas de marchitez, pero con manchas marrones claras en la raíz

3 = Plantas con síntomas de necrosis vascular y síntomas de marchitez, pero sin amarillamiento de las hojas

4 = Necrosis generalizada en la raíz, marchitez y clorosis severa

5 = Planta muerta

Con el fin de detectar la colonización vascular de las diferentes cepas de *Fusarium* a lo largo de la raíz y el tallo, la superficie de ambas partes de las plántulas se desinfectó con alcohol al 70% (durante 1 min), NaCl 3% (1 min) y 96% Alcohol (30 segundos); Posteriormente, se enjuagó tres veces con agua destilada estéril. Los primeros 3 mm al lado del corte en el cuello de la planta se retiraron de las partes de raíz y tallo. El resto de las partes de la raíz y del tallo se cortó hasta una altura de 50 mm desde la base en 10 secciones de igual longitud. Las secciones de raíz y tallos de cada plántula se colocaron horizontalmente en sentido horario en cajas de Petri de 90 mm con PDA-cloranfenicol. Las cajas de Petri con las secciones de raíz y tallos se incubaron en el laboratorio a 25 °C durante 8 días en un diseño completamente al azar y se examinaron todos los días para extraer los hongos que se desarrollaran en el cilindro vascular de cada sección de raíz o tallo. Los micelios que crecieron a partir de los fragmentos de plantas se transfirieron a placas Petri con PDA para obtener cultivos puros y para identificarlos molecularmente de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. La profundidad o altura alcanzada por el hongo en la raíz o tallo se determinó a partir de los datos de re-aislamiento en los fragmentos de raíz o tallo para cada planta (Sestili et al. 2011).

Los datos obtenidos de la frecuencia de re-aislamiento entre los dos grupos de plantas (raíz sana y raíz lesionada) y entre el compartimiento de la planta (raíz y tallo), se utilizaron para construir una matriz de distancia, calculando las distancias estadísticas con el método de Bray-Curtis. Para evaluar el efecto de los grupos de plantas y el compartimiento de las plantas sobre la frecuencia de re-aislamientos fúngicos, se analizó la matriz de distancia con un análisis de varianza de permutaciones (PERMANOVA). Para comparar la colonización vascular entre cada uno de los aislamientos, los datos se evaluaron en función de la frecuencia de re-aislamiento en los tallos y raíces en las diez secciones dispuestas desde la base del tallo o la raíz cada 5 mm hasta 50 mm. Los valores porcentuales de re-aislamientos se sometieron a un ANOVA de una vía.

Resultados y Discusión

Seis semanas después de la inoculación, las plantas con las raíces sanas y lesionadas se mantuvieron sin síntomas de marchitez. De los 1620 fragmentos examinados en cada grupo de plantas, se obtuvieron 354 re-aislamientos de *F. oxysporum* en plantas con raíces sanas y 288 en las plantas con raíces lesionadas ($F=0.06868$, $p = 0.001$). En ambos grupos de plantas, las cepas de hongos colonizaron la raíz, pero no todos los tallos ($F= 0.11666$ $p = 0.001$) y el aislamiento de las cepas fue discontinuo (Figura 2 y 3). En las raíces sanas, se re-aislaron todas las cepas de *F. oxysporum*, 330 (93,2%) re-aislamientos corresponden a raíz y 24 (6,8%) a tallos. Las cepas Co5, Na4 y Co3 presentaron la frecuencia más alta ($F = 7.8995$, $p = 0.00$) con 93, 83 y 80% de re-aislamientos respectivamente a lo largo de la raíz. Se re-aislaron diez cepas de *F. oxysporum* del tallo de las plantas con raíces sanas. La cepa So1 presentó la mayor frecuencia ($F = 3,0639$, $p = 0,00$) de re-aislamientos en el tallo (33%) hasta 30 mm de alto, aunque la cepa Ne 5 se aisló a 40 mm de la base del tallo pero presentó menor frecuencia. En las plantas con raíces lesionadas 26 de las 27 cepas de *F. oxysporum* fueron re-aisladas, 270 (93,75%) re-aislamientos corresponden a la raíz y 18 (6,25%) a tallos. Las cepas Ch1 y Na6 presentaron el mayor porcentaje ($F = 3.8618$, $p = 0.000$) de re-aislamientos en raíz con 80 y 67% respectivamente. Se logró re-aislar 11 cepas de *F. oxysporum* de los tallos de este grupo de plantas (raíz lesionada), la cepa Co5 presentó el mayor porcentaje de re-aislamientos (23%) hasta una altura de 40 mm ($F = 3,2517$, $p = 0,00$). Aunque la mayor altura se registró en las cepas Ch1 y Ch2 que se encontraron a 45 y 50 mm de la base del tallo, respectivamente pero con menor frecuencia total de re-aislamientos.

Las cepas de *F. oxysporum* evaluadas colonizaron las raíces de los cafetos con y sin heridas. En diferentes estudios se menciona que los hongos fitopatógenos que causan marchitamiento entran en las raíces por heridas mecánicas, como las causadas por la penetración de los nematodos (Francl y Wheeler 1993; Agrios 2002) y en el caso de los nematodos agalladores, por las heridas causadas por la expulsión de la masa de huevos (Haseeb et al. 2005), pero con nuestros resultados se demuestra que estas heridas no son necesarias para que *F. oxysporum* colonice los sistemas vasculares de las plantas de café.

Aunque muchas especies de *Fusarium* pueden penetrar en el tejido cortical de las raíces, sólo las cepas específicas del huésped pueden penetrar en los elementos vasculares mediante el crecimiento micelial y producir microconidios, los cuales son transportados por el flujo de nutrimentos hasta otras partes de la planta (Di Pietro et al. 2003). En nuestro estudio, todas las cepas estudiadas aquí colonizaron la raíz, pero sólo algunos lograron traslocarse al tallo, lo que puede considerarse como un indicador de patogenicidad (Rodríguez-Molina et al. 2003; Michielse y Rep 2009), aunque ninguno de los aislamientos de *F. oxysporum* causó síntomas de marchitez vascular en las plantas inoculadas. Debido a la capacidad de estos hongos para colonizar el tejido vascular de las plantas, es posible que estén presentes en esta como endófitos, y se expresan mayormente al entrar la raíz en senescencia debido al daño causado por la infección de nematodos o a condiciones ambientales adversas. Algunos estudios sugieren que ciertos hongos saprobios pueden ser parásitos facultativos y algunos endófitos pueden convertirse en patógenos cuando la planta huésped entra en estrés (Romero et al. 2000). Otros estudios demuestran que los patógenos pueden estar presentes en su hospedero mucho antes del brote de la enfermedad (Photita et al. 2004). Asimismo se ha demostrado que las cepas no patógenas de *F. oxysporum* pueden convertirse en patógenas mediante la transferencia horizontal de cromosomas de patogenicidad de cepas patógenas (Ma et al. 2010). El cambio de estado de endófito a patógeno y viceversa se ha registrado en numerosas especies de hongos (Freeman y Rodríguez 1993, Delaye et al. 2013). Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar el papel de *F. oxysporum* en las plantas de café y en el desarrollo de la corchosis.

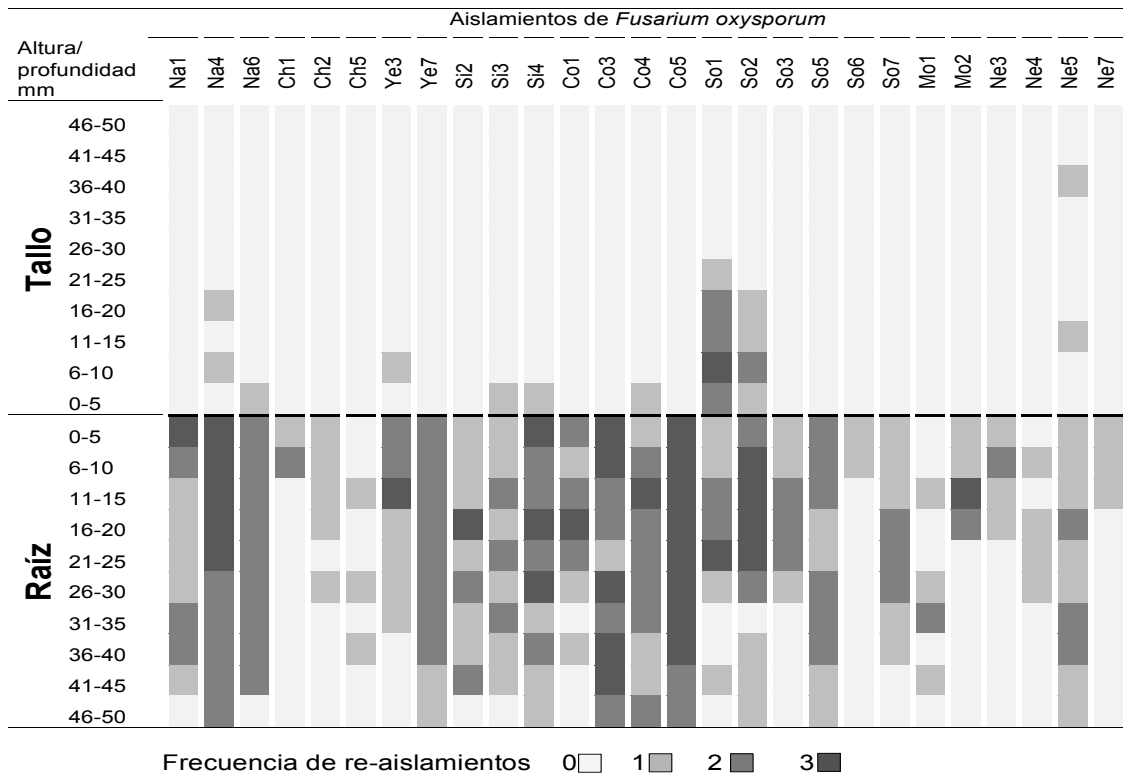


Figura 1.- Frecuencia de re-aislamientos de *Fusarium oxysporum* en tallos y raíces de plantas de *Coffea arabica* con raíces sin lesionar.

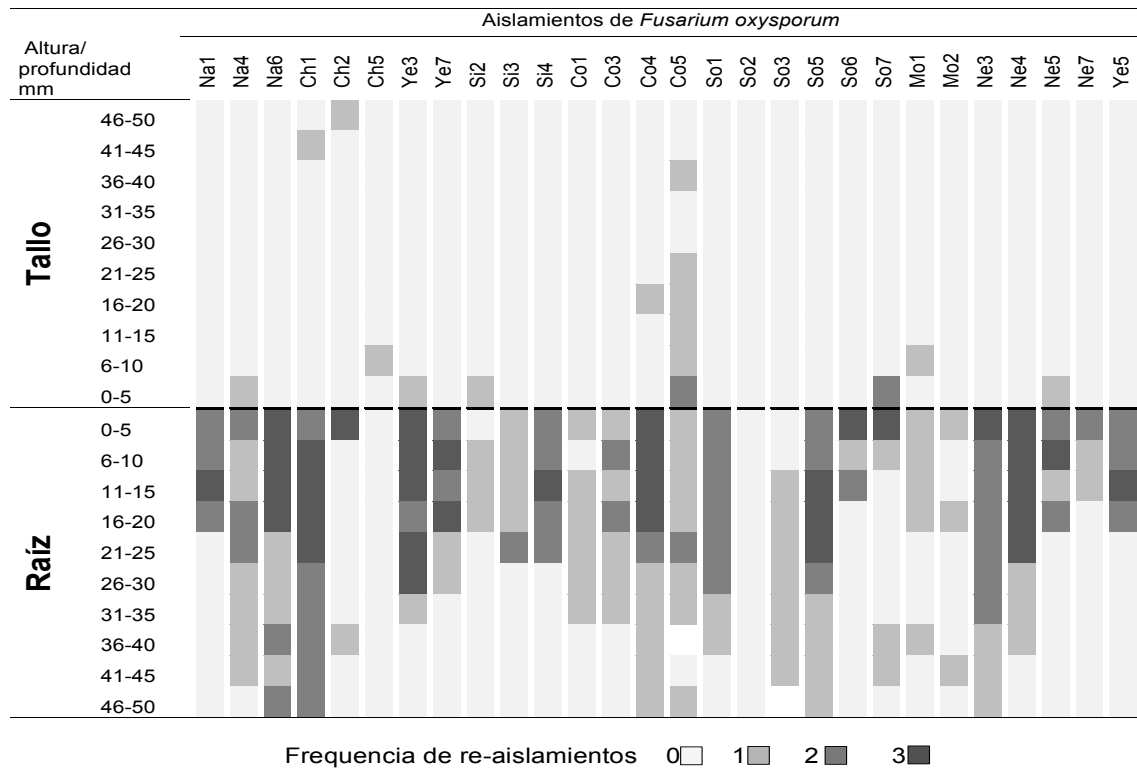


Figura 2.- Frecuencia de re-aislamientos de *Fusarium oxysporum* en tallos y raíces de plantas de *Coffea arabica* con raíces lesionadas.

Referencias

- Agrios G (2002) Fitopatología. Segunda edición. Limusa. Grupo Noriega Editores. México
- Alanis-Martínez I, Medina-Mendoza C, Mabán-Mendoza N, Valadez-Moctezuma E (2015) Classical molecular techniques for differentiation of special forms of *Fusarium oxysporum*. *Revista Mexicana de Micología* 42:1-7
- Bobadilla Landey, R., Cenci, A., Georget, F., Bertrand, B., Camayo, G., Dechamp, E., Simpson, J., Herrera, J.C., Santoni, S., Lashermes, P., Etienne, H., 2013. Highgenetic and epigenetic stability in *Coffea arabica* plants derived from embryogenic suspensions and secondary embryogenesis as revealed by AFLP, MSAP and the phenotypic variation rate. *PLoS One* 8 (2), e56372, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0056372>.
- Cardoso RML (1986) A vascular wilt of coffee (*Coffea arabica*) in the state of Parana, Brasil, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *coffea*. *Fitopatologia Brasileira* 11(4):753-760
- Cumagun CJR, Aguirre JA, Relevante CA, Balatero CH (2010) Pathogenicity and Aggressiveness of *Fusarium oxysporum* Schl. in Bottle Gourd and Bitter Gourd. *Plant Protect. Sci.* 46:51–58
- Delaye L, García-Guzmán G, Heil M (2013) Endophytes versus biotrophic and necrotrophic pathogens—are fungal lifestyles evolutionarily stable traits? *Fungal Diversity* 60:125–135 DOI 10.1007/s13225-013-0240-y
- Di Pietro A, Madrid MP, Caracuel Z, Delgado-Jarana J, Roncero MIG. (2003) *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol Plant Pathol* 2003:315–325.
- Francl LJ, Wheeler TA (1993) Interaction of plant-parasitic nematodes with wilt-inducing fungi.
- Freeman S, Rodriguez RJ (1993) Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. *Science* 260:75-78
- Haegi A, Catalano V, Luongo L, Vitale S, Scotton M, Ficcadenti N, Belisario A (2013) A newly developed real-time PCR assay for detection and quantification of *Fusarium oxysporum* and its use in compatible and incompatible interactions with grafted melon genotypes. *Phytopathology* 103:802-810
- Haseeb A, Sharma A, Ahukla PK (2005) Studies on the management of root-knot

- nematode, *Meloidogyne incognita*-wilt fungus, *Fusarium oxysporum* disease complex of green gram, *Vigna radiata* cv ML-1108. *J Zhejiang Univ SCI* 8:736-742
- Herrera, T., y Ulloa, M. (1990). *El reino de los hongos: Micología básica y aplicada*. México: UNAM/Fondo de Cultura Económica. 552 p.
- Lopez-Lima D, Sánchez-Nava P, Carrión G, Espinosa de los Monteros A, Villain L (2015) Corky-root symptoms for coffee in central Veracruz are linked to the root-knot nematode *Meloidogyne paranaensis*, a new report for Mexico. *European Journal of Plant Pathology* 141:623-629
- Ma, L.J., van der Does, H.C., Borkovich, K.A., Coleman, J.J., Daboussi, M.J., Di Pietro, A., et al. (2010). Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium oxysporum*. *Nature*, 464,367-373.
- Michielse CB, Rep M (2009) Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum* *Molecular Plant Pathology*, 10:311–324 DOI: 10.1111/J.1364-3703.2009.00538.X
- Negrón JA, Acosta N (1989) The *Fusarium oxysporum* f. sp. *Coffeae-Meloidogyne incognita* complex in Bourbon Coffee. *Nematopica* 19:161-168
- Parke JL, Grau CR (1993) *Aphanomyces*. In: Singleton LL, Mihail JD, Rush CM (Eds.) *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*. APS Press, St. Paul, MN, USA pp 27-30
- Photita W, Lumyong S Lumyong P, McKenzie EHC, Hyde KD (2004) Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? *Fungal Diversity* 16: 131-140.
- Reis A, Boiteux LS (2007) Outbreak of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in commercial fresh-market tomato fields in Rio de Janeiro State, Brazil. *Horticultura Brasileira* 25: 451-454.
- Rodríguez-Molina MC, Medina I, Torres-Vila LM, Cuartero J (2003) Vascular colonization patterns in susceptible and resistant tomato cultivars inoculated with *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* races 0 and 1. *Plant Pathology* 52:199–203
- Romero A, Carrion G, Rico-Gray V (2001) Fungal latent pathogens and endophytes from leaves of *Parthenium hysterophorus* (Asteraceae). *Fungal Diversity* 7:81-87
- Sestili S, Polverari A, Luongo L, Ferrarini A, Scotton M, Hussain J, Delledonne M, Ficcadenti N, Belisario A (2011) Distinct colonization patterns and cDNA-AFLP transcriptome profiles in compatible and incompatible interactions

between melon and different races of *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis. BMC Genomics 12:122

Téliz-Ortíz D, Castillo-Ponce G, Nieto-Angel D (1993) La corchosis del café en México. Revista Mexicana de Fitopatología 11:5–12

Ulloa, M., & Hanlin, R. T. (2002). Illustrated dictionary of mycology. St. Paul, MN, USA: APS Press.

van Diepeningen AD, de Hoog GS (2016) Challenges in Fusarium, a Trans-Kingdom Pathogen. Mycopathologia (2016) 181:161–163 DOI 10.1007/s11046-016-9993-

7

7.4 Validación de variedades resistentes al nematodo *M. paranaensis* responsable de la corchosis de la raíz del cafeto

Introducción

Los nematodos agalladores son una importante limitante para la producción de café, principalmente en los países Latinoamericanos (Campos y Villain 2005; Villain et al. 2013). A la fecha se han registrado 18 especies de *Meloidogyne* parasitas del café (Carneiro y Cofcewicz 2008; Humpreys-Pereira et al. 2014). En particular *M. paranaensis* es uno de los nematodos agalladores mas destructivos para los cafetos debido a que esta asociado a la enfermedad conocida como corchosis de la raíz del cafeto (Carneiro et al. 1996). En México esta enfermedad ha sido detectada en diversos sitios en la zona de producción de Veracruz y se consedera una amenaza importante para la cafécultura (López-Lima et al. 2015). Actualmente todos los cultivares de *C. arabica* son susceptibles a *M. paranaensis*, mientras que algunas accesiones silvestres colectadas en Etiopía por la FAO (1968) y el ORSTOM (Guillaumet y Halle 1978) son resistentes (Anzueto et al. 2001; Boisseau et al. 2009). Recientemente, fueron seleccionadas siete variedades híbridas F1, resultado de cruza entre algunas accesiones silvestres de Etiopía, resistentes a nematodos y cultivares comerciales, algunos de ellos con resistencia a roya (Cuadro 1). La productividad, adaptación a sistemas agroforestales, calidad de taza y la resistencia monogénica a la roya se ha comprobado en campo (Bertrand et al. 2005; Bertrand et al. 2006; Bertrand et al. 2011) pero, la resistencia al nematodo responsable de la corchosis, probada en los padres etíopes es de naturaleza cuantitativa con determinismo poligénico por lo que no se puede predecir el nivel de resistencia de la descendencia F1. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la resistencia de este germoplasma al nematodo *M. paranaensis* en condiciones de inoculaciones controladas.

Materiales y métodos.

Para evaluar el nivel de resistencia de siete híbridos F1 se instaló un experimento en un diseño de bloques al azar con 10 repeticiones (plantas con dos pares de hojas) en macetas de 900 ml con una mezcla 2:1 de turba y arena previamente desinfectada durante 6 horas en un pasteurizador. Cada planta se inoculó con 18,000 huevos y juveniles J2 de *M. paranaensis* previamente identificados mediante diagnóstico molecular (López-Lima et al. 2015). Se inocularon también el mismo número de plantas

de un testigo susceptible, *C. arabica* cv. Caturra, y de un testigo resistente, *C. canephora* cv. Nemaya (Cuadro 1). Quince meses después de la inoculación, se evaluó la altura de las plantas, el número de nudos, número de plagiotropos, número de nudos por plagiotropo, peso fresco del follaje y raíz y contenido de clorofila mediante un aparato Hansatech CL-01®. Posteriormente las raíces se lavaron con agua corriente para eliminar los restos de sustrato y se procesaron mediante la técnica de macerado en solución de hipoclorito de sodio (0.5%) y tamizado (150 y 25 µm) para extraer huevos y juveniles de *M. paranaensis*, los cuales se cuantificaron en una cámara de conteo Sedgwick-Rafter para calcular la población final, densidad de población y tasa de multiplicación mediante la siguiente fórmula: TM= población final / población inicial.

Cuadro 1. Híbridos F1 utilizados en el experimento.

Especie	Origen			Resistencia a roya
<i>C. arabica</i> H-05	Etíope resistente	X	Introgresado	Resistencia completa a la roya
<i>C. arabica</i> H-14	Etíope resistente	X	Introgresado	Resistencia completa a la roya
<i>C. arabica</i> H-15	Etíope resistente	X	Introgresado	Resistencia incompleta a la roya
<i>C. arabica</i> H-16	Etíope resistente	X	Introgresado	Resistencia completa a la roya
<i>C. arabica</i> H-17	Etíope resistente	X	Catuaí	Susceptible a la roya
<i>C. arabica</i> H-18	Etíope resistente	X	Introgresado	Resistencia incompleta a la roya
<i>C. arabica</i> H-19	Etíope resistente	X	Introgresado	Resistencia incompleta a la roya
Controles				
<i>C. canephora</i> cv Nemaya resistente a <i>M. paranaensis</i>				
<i>C. arabica</i> cv Caturra susceptible a nematodos y roya				

Resultados y discusión

Todos los híbridos F1 y el testigo susceptible mostraron síntomas de engrosamientos en las raíces secundarias y de corchosis en la raíz principal. En el caso de *Coffea arabica* cv. Caturra, la infección del nematodo estaba distribuida en la mayor parte del sistema radicular a diferencia de los híbridos F1 donde se observaron infecciones mas localizadas principalmente en la raíz pivotante, en el cuello y encima, en la base del tallo (Figura 1a). En el testigo resistente *C. canephora* cv. Nemaya se observaron algunos engrosamientos ligeros en algunas plantas, pero no se observaron síntomas de corchosis. La población final de nematodos en los híbridos, *C. arabica* cv. Caturra y *C. canephora* cv. Nemaya así como las variables vegetativas evaluadas se describen en el cuadro 2. Aunque la población final de nematodos en los híbridos 16, 17, 18 y 19 fue

menor que la del testigo susceptible, no se encontraron diferencias significativas. La población de nematodos en *C. canephora* cv. Nemaya fue significativamente más baja que la población en el híbrido 14, el cual presentó la población final más alta.

Al analizar la densidad de población de nematodos (huevos y J2 por gramo de raíz), únicamente el híbrido 17 y *C. canephora* cv. Nemaya presentaron menor densidad de población que el testigo susceptible pero no se encontró diferencia significativa (Fig. 2). Asimismo, los híbridos 17 y 19 presentaron una tasa de reproducción de nematodos menor a la registrada en el testigo susceptible (Figura 3). Además, el híbrido 17 presentó mayor peso de raíz que el testigo susceptible. Por otro lado, el híbrido 15 presentó mayor crecimiento respecto al testigo susceptible. Las variables diámetro del tallo, número de nudos, número de plagios, nudos por plagio y contenido de clorofila no presentaron diferencias significativas.

El control genético de plagas y enfermedades en el café ha sido enfocado principalmente a la roya con el uso de variedades introgresadas como los Catimores y Sarchimores (Silva et al. 2006; Mishra y Slater 2012). Estas variedades son muy susceptibles al ataque de nematodos, en particular a *Meloidogyne paranaensis*, nematodo asociado a la enfermedad conocida como corchosis de la raíz del cafeto (Villain et al. 2013). Estas variedades presentan una calidad de taza menor a la de las variedades tradicionales (Van der Vossen 2009; Sobreira et al. 2015). Además no están completamente adaptadas a los sistemas agroforestales, con mucha sombra y requieren un programa de fertilización intensivo (Berlingeri et al. 2007), por lo que no se adaptan a los pequeños productores con recursos limitados, los cuales representan la mayor parte de la producción de café en México.

Los híbridos probados en este trabajo mostraron un nivel alto de susceptibilidad a *M. paranaensis*, a pesar de que los padres etíopes tienen un alto nivel de resistencia a este nematodo (Anzueto et al. 2001). Sin embargo, por su alta productividad y precocidad, su resistencia/tolerancia a la roya, su buena calidad de taza, y su buena adaptación a los sistemas agroforestales, estos híbridos F1 que pueden ser injertados sobre patrones de *C. canephora* con resistencia a nematodos, siguen siendo una buena alternativa para lograr un manejo integrado de plagas y enfermedades así como para mejorar la rentabilidad y competitividad de la caficultura mexicana en particular en el sector de pequeños productores



Figura 1 Síntomas de corchosis en los híbridos F1. **a** híbrido 5; **b** híbrido 14; **c** híbrido 17 y **d** híbrido 19.

Cuadro 2.- Variables vegetativas evaluadas en los híbridos F1 de *Coffea arabica* infestados con *Meloidogyne paranaensis*

Variedad/ Cultivar	Diámetro del tallo	Atura	N. de nudos	No. de plagiotropos	Nudos por plagiotropos	Peso fresco follaje	Peso fresco raíz	% Clorofila	Nematodos total
H05	6.8bc	40.1bc	13.3a	4.5a	1.8b	56.2bc	19.8ab	25ab	12654ab
H14	6.8bc	48.2ab	12.9ab	3.5a	1.9ab	54.1bc	19.4ab	32.6a	23836b
H15	8.5ab	57a	13.2a	4.8a	2.2ab	90.5ab	27.1ab	35.1a	13157ab
H16	7.3b	41.1abc	10.5ab	2.8a	1.7b	48bc	30.2ab	36.1a	6735a
H17	7.4ab	47.9abc	12.7ab	3.2a	1.9ab	55.1bc	44.8a	34.6a	4509a
H18	8.0ab	56.7a	12.6ab	4.3a	2.1ab	83.1ab	23.7ab	37a	7851ab
H19	7.0b	49.9ab	12.3ab	3.6a	1.8b	56.8bc	17.5ab	30.2ab	6182a
Caturra	9.8a	56.5a	13.3a	4.8a	2.8a	107.4a	33.2ab	43.7a	9579ab
Nemaya	4.5c	31.8c	7.5b	0b	0c	10.5c	4.7b	10.9b	115a
F _(8,81)	9.42	8.03	3.31	9.55	14.40	9.97	2.53	5.70	4.73
P	0.00	0.00	0.002	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.0

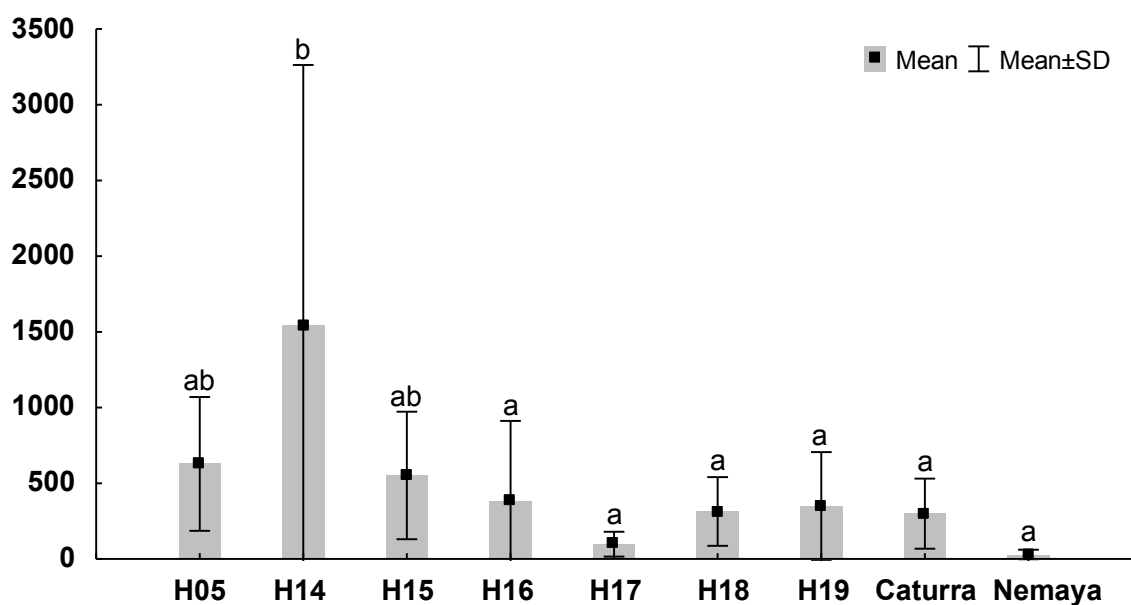


Figura 2 Densidad de población de *Meloidogyne paranaensis* en los siete híbridos F1 de *Coffea arabica* evaluados (huevo y J2 gr raíz⁻¹ ± desviación estándar). Letras diferentes en las barras denotan diferencias significativas por la prueba de Tukey 0.001.

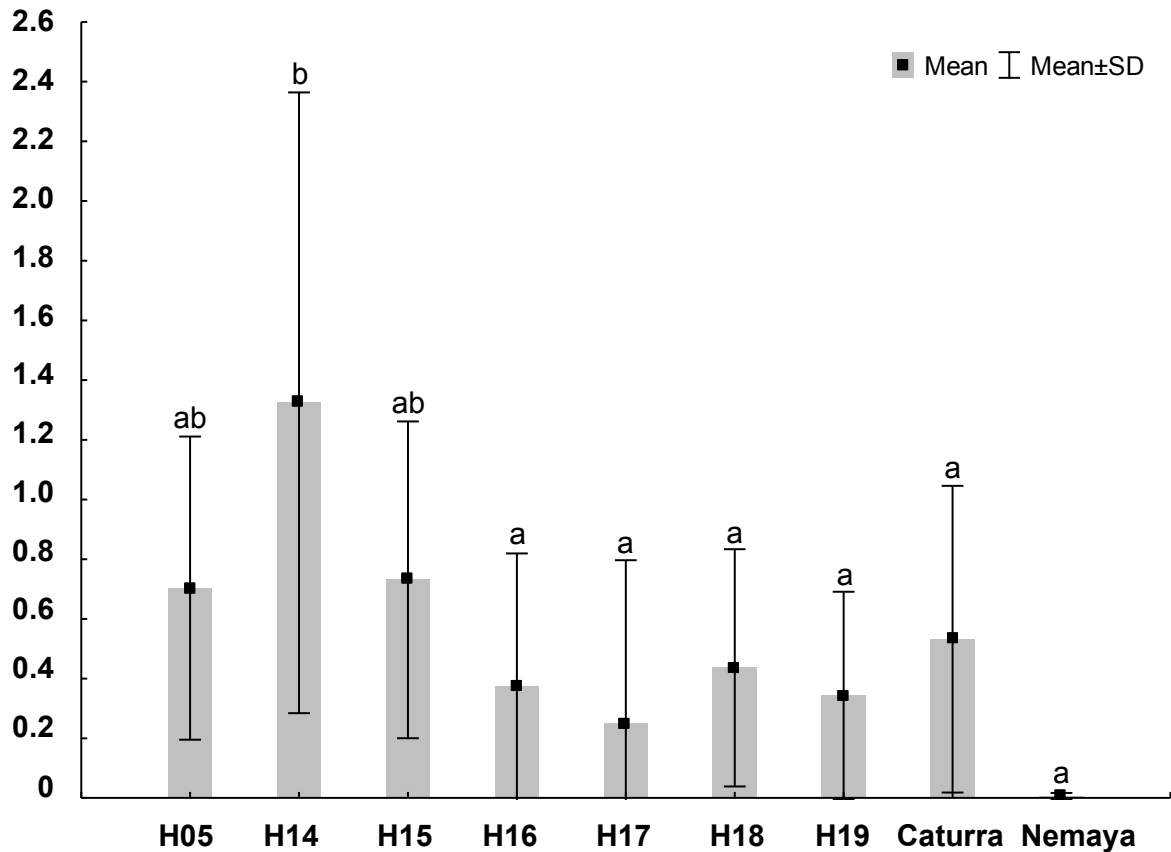


Figura 3 Tasa de reproducción de *Meloidogyne paranaensis* en los siete híbridos F1 de *Coffea arabica* evaluados (población final/población inicial \pm desviación estándar). Letras diferentes en las barras denotan diferencias significativas por la prueba de Tukey 0.001.

Referencias

- Anzueto F, Bertrand B, Sarah JL, Eskes AB, Decazy B (2001) Resistance to *Meloidogyne incognita* in Ethiopian *Coffea arabica* accessions. Euphytica 118:1-8
- Berlinger C, Alvarado C, Silva-Acuña R, Marín C, La Cruz L, Durán D, Medina A, Bustamante J (2007) Evaluación agronómica de 18 líneas de café en la localidad de La Vitu, Estado Trujillo, Venezuela. Bioagro 19:27-33
- Bertrand B, Etienne H, Cilas C, Charrier A, Baradat P (2005) *Coffea arabica* hybrid performance for yield, fertility and bean weight. Euphytica 141:255–262
- Bertrand B, Vaast P, Alpizar E, Etienne H, Davrieux F, Charmetant P (2006) Comparison of bean biochemical composition and beverage quality of arabica hybrids involving Sudanese-Ethiopian origins with traditional varieties at various elevations in Central America. Tree Physiol 26:1239–1248
- Bertrand B, Alpizar E, Lara L, SantaCreo R, Hidalgo M, Quijano JM, Montagnon C,

- Georget F, Etienne H (2011) Performance of *Coffea arabica* F1 hybrids in agroforestry and full-sun cropping systems in comparison with American pure line cultivars. *Euphytica* 181:147–158
- Boisseau M, Aribi J, de Sousa FR, Carneiro RMDG, Anthony F (2009) Resistance to *Meloidogyne paranaensis* in wild *Coffea arabica*. *Tropical plant pathology* 34:38-41
- Campos VP, Villain L (2005) Nematode parasites of coffee and cocoa. In: Luc M, Sikora RA, Bridge J (Eds.) *Plant parasitic nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*, 2nd edition. Wallingford, UK. CAB International. pp:529-579
- Carneiro RMDG, Carneiro RG, Abrantes IMO, Santos M, Almeida MRA (1996) *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. *Journal of Nematology*, 28:177-189
- Carneiro RMDG, Cofcewicz ET (2008) The taxonomy of Coffee –Parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. In: Souza RM (Ed.) *Plant–Parasitic Nematodes of coffee*. Dordrecht. Springer. pp:87-122
- FAO (1968) *FAO coffee mission to Ethiopia 1964–1965*. FAO, Rome
- Guillaumet JL, Halle F (1978) Echantillonnage du matériel *Coffea arabica* récolté en Ethiopie. In: Charrier (Ed.), *Etude de la structure et de la variabilité génétique des caféiers*, Bulletin IFCC pp:14-99
- Humphreys-Pereira DA, Flores-Chaves L, Gómez M, Salazar L, Gómez-Alpízar L, Elling AA (2014) *Meloidogyne lopezi* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a new root-knot nematode associated with coffee (*Coffea arabica* L.) in Costa Rica, its diagnosis and phylogenetic relationship with other coffee-parasitising *Meloidogyne* species. *Nematology* 16:643-661
- Lopez-Lima D, Sánchez-Nava P, Carrion G, Espinosa de los Monteros AE, Villain L (2015) Corky-root symptoms for coffee in central Veracruz are linked to the root-knot nematode *Meloidogyne paranaensis*, a new report for México. *European Journal of Plant Pathology* 141:623–629
- Mishra MK, Slater A (2012) Recent advances in the genetic transformation of coffee. *Biotechnology Research International* DOI: 10.1155/2012/580857
- Silva MC, Várzea V, Guerra-Guimarães L, Azinheira HG, Fernandez D, Petitot AS, Bertrand B, Lashermes P, Nicole M (2006) Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Braz. J. Plant Physiol.* 18: 119-147
- Sobreira FM, Oliveira ACB, Pereira AA, Sakyama NS (2015) Potential of Híbrido de

- Timor germplasm and its derived progenies for coffee quality improvement.
Australian Journal of Crop Science 9:289-295
- Villain L, Sarah JL, Hernandez A, Bertrand B, Anthony F, Lashermes P, et al. (2013)
Diversity of root-knot nematodes parasitizing coffee in Central America.
Nematropica, 43:194-206
- Van der Vossen (2009) The cup quality of disease-resistant cultivars of arabica coffee
(*Coffea arabica*). Experimental Agriculture, 45:323-332

8 Discusión general

En este trabajo se contribuyó al esclarecimiento del origen de la corchosis de la raíz del café. Se demostró que *Meloidogyne paranaensis* es la única especie de nematodo agallador asociada a la formación de la corchosis al menos en el estado de Veracruz. Es necesario confirmar la identidad de la especie de nematodo presente en zonas de producción de café con presencia de la enfermedad en otros estados de México como Chiapas y Puebla. Es claro que *Fusarium oxysporum* está estrechamente relacionado a las raíces de cafetos con corchosis debido a que se registró en todos los sitios examinados en este trabajo. De acuerdo a nuestra revisión bibliográfica, además de los registros de *F. oxysporum* asociado a cafetos con corchosis en Costa Rica y México, este hongo ha sido registrado como patógeno de cafetos en Puerto Rico, causando marchitamiento vascular en cafetos infestados con el RKN *Meloidogyne incognita* sin mención de algún síntoma de corchosis (Negrón y Acosta 1989) y en Brasil causando marchitamiento vascular sin mención de asociación con nematodos (Cardoso 1986). En ambos estudios, atribuyen la causa de los síntomas a *Fusarium oxysporum* f. Sp. *coffeeae*, sin embargo no existe respaldo a nivel molecular de esta forma especial. Asimismo, en México, Alanís-Martínez et al. (2015) identificaron como *Fusarium oxysporum* f. Sp. *coffeeae* a los aislamientos realizados de raíces con corchosis en el estado de Veracruz. Sin embargo, no se han realizado estudios que comprueben la patogenicidad de dichos aislamientos sobre plantas de café, como se hizo con las formas especiales *lycopersici* y *cubense* entre otras de *F. oxysporum* parásitas de tomate y plátano (García-Bastidas et al. 2014; Luongo et al. 2015). Es necesario realizar pruebas de patogenicidad con hospederos diferenciados y pruebas a nivel molecular para confirmar la existencia de *F. oxysporum* f. Sp. *coffeeae*. *Fusarium oxysporum* también se ha registrado en abundancia en la rizósfera de cafetos infectados con el RKN *M. exigua* sin causar síntomas de enfermedad vascular, y se han comprobado que algunas de estas cepas pueden tener actividad nematicida (Freire et al. 2012). El papel funcional de *Fusarium oxysporum* en las plantas de café es aún desconocido, con los resultados obtenidos en este trabajo se generaron nuevas preguntas de investigación que tienen que ser abordadas para determinar el rol de estos dos patógenos asociados a la corchosis del café. Además, la presencia de abundantes bacterias en los tejidos afectados observada en el microscopio electrónico de barrido indican que estos organismos pueden estar relacionados al desarrollo de los síntomas de la enfermedad.

Otro tema importante a desarrollar es la búsqueda de alternativas de manejo integrado para esta enfermedad. Los híbridos F1 evaluados en este trabajo no dieron los resultados esperados, sin embargo el híbrido 17 parece tener cierto nivel de resistencia comparado con la variedad susceptible y el resto de los híbridos. Este híbrido podría seguir estudiándose y ser parte de un plan de manejo de la enfermedad incluyendo otras estrategias de control como el control biológico de nematodos.

9 Conclusiones

- *Meloidogyne incognita* no está relacionada con la corchosis de la raíz del café en el estado de Veracruz.
- En los tejidos afectados con corchosis de la raíz del café se observó la presencia concomitante de nematodos, hongos y bacterias.
- *Fusarium oxysporum* puede colonizar el sistema vascular de los cafetos sin provocar síntomas de marchitez, lo que indica que puede permanecer como endófito o patógeno latente.
- A la fecha no se cuenta con cultivares de *Coffea arabica* resistentes a *Meloidogyne paranaensis*.
- Queda por determinar el papel de nematodos, hongos y bacterias en la etiología de la corchosis y la interacción entre estos.

8 Bibliografía General

- Alanís-Martínez I, Medina-Mendoza C, Marbán-Mendoza N, Valadez-Moctezuma E (2015) Classical molecular techniques for differentiation of special forms of *Fusarium oxysporum*. *Revista Mexicana de Micología* 42:1-7
- Almeida AMSF, Santos MSN (2002) Resistance and host-response of selected plants to *Meloidogyne megadora*. *J Nematol* 34:140–142
- Bertrand B, Núñez C, Sarah JL (2000) Disease complex in coffee involving *Meloidogyne arabicida* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology* 49:383-388
- Campos VP, Silva JRC (2008) Management of *Meloidogyne* spp. in coffee plantations. en: Souza RM (ed.), *Plant-Parasitic Nematodes of Coffee*. Springer Netherlands, pp. 149-164 DOI: 10.1007/978-1-4020-8720-2_6
- Campos VP, Villain L (2005) Nematode parasites of coffee and cocoa. In: Luc M, Sikora RA, Bridge J (eds) *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 2nd edition. CABI, Wallingford
- Cardoso RML (1986). A vascular wilt of coffee (*Coffea arabica*) in the state of Parana, Brasil, caused by *Fusarium oxysporum* f. Sp. *coffeeae*. *Fitopatología Brasileira*, 11:753-760.
- Carneiro RMDG, Carneiro RG, Abrantes IMO, Santos M, Almeida MRA (1996) *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae) a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. *Journal of Nematology*, 28:177-189
- Carneiro RMDG, Tigano M, Randig O, Almeida MR, Sarah J-L (2004) Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology*, 6:287-298
- Carneiro RMDG y Cofcewicz ET (2008) Taxonomy of coffea-parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. en: Souza RM (ed.), *Plant-Parasitic Nematodes of Coffee*. Springer Netherlands, pp. 87-122 DOI: 10.1007/978-1-4020-8720-2_6
- Castaneyra D (2012) Le dan poca importancia a plaga del café. *El Heraldo de Coahuila*. Disponible en: <https://elheraldodecoahuila.wordpress.com/2012/08/24/le-dan-poca-importancia-a-plaga-del-cafe/>
- Castillo PG (1977) Estudio y evaluación del daño causado por el nematodo nodulador de la raíz en semilleros de café (*Coffea arabica* L.) en condiciones de

- invernadero. Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología, Universidad Veracruzana
- Cid del Prado-Vera I, Tovar-Soto A, Hernández JA (2001) Distribución de especies y razas de *Meloidogyne* en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:32-39
- Cruz L (2013) Identificación del nematodo agallador de la raíz del cafeto en la región centro de Veracruz. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana
- Freire ES, Campos VP, Pinho RSC, Oliveira DF, Faira MR, Pohlit AM, Noberto NP, Rezende EL, Pfenning LH, Silva JRC (2012) Volatile Substances Produced by *Fusarium oxysporum* from Coffee Rhizosphere and Other Microbes affect *Meloidogyne incognita* and *Arthrobotrys conoides*. *Journal of Nematology* 44:321–328
- García-Bastidas F, Ordóñez N, Konkol J, Al-Qasim M, Naser Z, Abdelwali M, Salem N, Waalwijk C, Ploetz RC, Kema GHJ (2014) First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 Associated with Panama Disease of Banana outside Southeast Asia. *Plant Disease* 98:694
- García PP, Cid del Prado I, Zavaleta-Mejía E, Téliz D (1997) La corchosis del cafeto (*Coffea arabica* L.) y alternativas de su manejo. *Nematropica*, 27:111
- Gordon C, Manson R, Sundberg J, Cruz-Angón A (2007) Biodiversity, profitability, and vegetation structure in a Mexican coffee agroecosystem. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 118:256-266
- Hernandez EE, Castillo G, Cid del Prado I (1991) Estudio fitonematológico en cafetales del municipio de Tlaltetela, Ver, Resúmenes XVIII Congreso Nacional de Fitopatología. Puebla, p 129
- Hernández-Martínez G, Manson R, Contreras-Hernández A (2009) Quantitative classification of coffee agroecosystems spanning a range of production intensities in central Veracruz, Mexico. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 134:89-98
- Humphreys-Pereira DA, Flores-Chaves L, Gómez M, Salazar L, Gómez-Alpízar L, Elling AA (2014) *Meloidogyne lopezi* n. Sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a new root-knot nematode associated with coffee (*Coffea arabica* L.) in Costa Rica, its diagnosis and phylogenetic relationship with other coffee-parasitising *Meloidogyne* species. *Nematology* 16:643-661
- INIFAP (2005) Clones de *Coffea canephora* como patrones para injertos con tolerancia

- a la corchosis de la raíz del café. Folleto técnico no. 3.
http://www.inifap.gob.mx/Documents/reportes/reporte_anual2004.pdf
 Consultado el 25 de abril 2014
- International Coffee Organization (ICO) (2016). Coffee trade statistics.
<http://www.ico.org>
- Licona-Vargas AL, Ortíz-Solorio CA, Gutiérrez-Castorena MC, Manzo-Ramos F (2006) Clasificación local de tierras y tecnología del policultivo café-plátano para velillo-sombra en comunidades cafetaleras. *Terra Latinoamericana* 24:1-7
- López-Gómez AM, Williams-Linera G, Manson RH (2008) Tree species diversity and vegetation structure in shade coffee farms in Veracruz, Mexico. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 124:160-172
- López R, Salazar L (1989) *Meloidogyne arabicida* sp. n. (Nematoda: Heteroderidae) nativo de Costa Rica: un nuevo y severo patógeno del cafeto. *Turrialba* 39:313-23
- Luongo L, Ferrarini A, Haegi A, Vitale S, Polverari A, Belisario A (2015) Genetic diversity and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* Races from Different Areas of Italy. *J Phytopathol* 163:73–83
- Marbán-Mendoza N, Flores L (1991) Rol de *Meloidogyne arabicida* López y Salazar y *Fusarium oxysporum* F. sp. *coffaeae* en la corchosis del cafeto (*Coffea arabica* var. Caturra) en Costa Rica. XXIII Reunión Anual Organización de Nematólogos de los Trópicos Americanos. San Antonio Texas pp 17-18.
- Moguel P, Toledo VM (1999) Biodiversity conservation in traditional coffee systems of Mexico. *Conservation Biology* 13:11-21
- Negrón JA, Acosta N (1989) The *Fusarium oxysporum* f. Sp. *coffaeae*-*Meloidogyne incognita* complex in Bourbon Coffee. *Nematropica*, 19:161-168.
- Neri GR (1981) Estudio preliminar sobre poblaciones de nematodos en tres estructuras de cafetal de Teocelo, Veracruz. Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología, Universidad Veracruzana
- Regalado OA (1986) Control químico de nematodos en vivero de café. IX Simposium de caficultura Latinoamericano, Guatemala. Pp 118-138
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2016). Servicio de información agroalimentaria y pesquera, producción agrícola 2015. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>. Accessed 21 abril 2016

- Sánchez M (1990) Hongos asociados a la nigua nematodo agallador (*Meloidogyne incognita*) en plantas de café (*Coffea arabica*) cultivadas con sombra en Huatusco, Ver. Mex. Tesis profesional U.A.CH. Chapingo, México.
- Téliz-Ortiz D, Nieto Angel D, Castillo Ponce G, Obregón Domínguez E (1991) La corchosis del café: Síntomas e histopatología. XVIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Puebla, Pue. p. 77
- Téliz-Ortiz D, Castillo-Ponce G, Nieto-Angel D (1993) La corchosis del cafeto en México. Revista Mexicana de Fitopatología 11:5-12
- Topete PE (1966) Manual de plagas y enfermedades del cafeto. Instituto Mexicano del Café 70p
- Vázquez JT (1963) Relaciones suelo-nemátodos. In Memoria del 1er. Congreso Nacional de Ciencia del Suelo. Mexico City: Sociedad Mexicana de Ciencia del Suelo pp 201-203
- Villain L (2008) Economic importance, epidemiology and management of *Pratylenchus* sp. in coffee Plantations. en: Souza RM (ed.), Plant-Parasitic Nematodes of Coffee. Springer Netherlands, pp. 65-84 DOI: 10.1007/978-1-4020-8720-2_6
- Villain L, Sarah JL, Hernandez A, Bertrand B, Anthony F, Lashermes P, et al. (2013) Diversity of root-knot nematodes parasitizing coffee in Central America. Nematropica, 43:194-206