



# 2

## Manual Práctico: BIOFERTILIZACIÓN Y BIOPROTECCIÓN DE CAFÉ (*Coffea arabica*) CON APLICACIÓN DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES



### Proyecto:

Biofertilización y bioprotección de plantas clonales de café (*Coffea arabica*) con micorrizas arbusculares en la región de San Martín.

CONTRATO N° 023-2015-INIA-PNIA/UPMSI/IE

### Autores:

Dr. M.Sc. Luis Alberto Arévalo López  
Ing. M.Sc. Geomar Vallejos Torres

### Financian:



### Aliados:





**Biofertilización y bioprotección de Café (*coffea Arabica*) mediante la aplicación de hongos micorrízicos arbusculares**

**ISBN: 978-612-4372-14-8**

**Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N° 2018-18787**

**Autores:**

Luis Alberto Arévalo López  
Geomar Vallejos Torres

**Editado por:**

Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana  
Jr. Belén Torres de Tello N° 135 - Morales - Tarapoto - Perú  
T: (042) 524748 - 525979  
E-mail: iiapsm@iiap.org.pe  
www.iiap.org.pe  
Editor: Geomar Vallejos Torres

Programa de Investigación en Manejo Integral del  
Bosque y Servicios Ambientales (PROBOSQUES)  
Sede Regional San Martín  
Tarapoto - San Martín - Perú

1a. Edición - Enero 2019  
Tiraje : 1000 ejemplares

**Diseño e Impresión:**

Estudio Gráfico Creart  
De Robert Lenin Chafloque Pinedo  
Jr. Ulises Reátegui N° 810 - Tarapoto  
estudiograficocreat@gmail.com  
Enero 2019

**Impreso en el Perú**



**MANUAL PRÁCTICO 2:  
BIOFERTILIZACIÓN Y BIOPROTECCIÓN DE CAFÉ  
(*Coffea arabica*) MEDIANTE LA APLICACIÓN  
DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES**

**COLABORADORES NACIONALES**

**EQUIPO TÉCNICO:**

**Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana.**

- **Ing. Decny Omar Chinchay Rubio:** Asistente de investigación del proyecto.
- **Ing. Marco Antonio García Sánchez:** Asistente de investigación del proyecto.
- **Blgo. Ángel Martín Rodríguez Del Casillo:** Colinvestigador del proyecto.

**ALIANZA ESTRATÉGICA**

- **Ing. M.Sc. Dr. Carlos Rengifo Saavedra,** Coinvestigador del proyecto. Universidad Nacional de San Martín (UNSM) – Tarapoto.
- **Ing. Marlith Schrader Sánchez,** Coinvestigador del proyecto. Instituto de Educación superior Tecnológico Público El Dorado - El Dorado.
- **Ing. Pedro Santos Mondragón,** Coinvestigador del proyecto. Cooperativa de Servicios Múltiples ADISA Naranjos, Rioja.
- **Ing. Miker Laines Cuesta Moreira,** Coinvestigador del proyecto. Cooperativa Agraria El Gran Saposoa Ltda

**TESISTAS**

- **Fátima Alva, Wilder Culqui, Heydi Marlo, Anabel Saboya, Conan Ushiñahua, Pilar Rodríguez, Osmar Villalobos, Elvis Espinoza, Lorena Romero, Jany Sandoval.**

**COLABORADORES INTERNACIONALES**

- **Dr. Ronald Ferrera – Cerrato**
- **Dr. Alejandro Alarcón**  
Colegio de Postgraduados, Texcoco, México

ISBN 978-612 4372-14 8



9 786124 372148

# INDICE

* AGRADECIMIENTO	05
* INTRODUCCIÓN	06
* Colecta y codificado de muestras de suelo rizosférico en fincas cafetaleras.	07
* Uso de plantas trampa para la multiplicación de hongos micorrízicos.	09
* Periodo de estrés y corte de las plantas de arroz.	10
* Tinción de raíces en plantas de café para determinación de la presencia de HMA.	11
* Tinción de raíces en plantas de arroz para determinación de la presencia de HMA.	12
* Aislamiento y extracción de esporas de HMA.	13
* Propagación sexual del café.	14
* Repique e inoculación de HMA-N a plántones de cafeto propagadas por semilla sexual.	15
* Propagación asexual del café.	16
* Repique e inoculación con HMA a plántones propagados por semilla asexual.	17
* Determinación de la efectividad de los consorcios de HMA nativos.	18
* Biofertilización mediada por micorrizas arbusculares en plántones de café.	22
* Bioprotección mediada por micorrizas arbusculares en la reducción de nematodos en plántones de café.	25
* REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	26
* ANEXO	28

# AGRADECIMIENTO

Al Programa Nacional de Innovación Agraria – PNIA por financiar el presente trabajo de investigación en el marco de las actividades del proyecto “Biofertilización y Bioprotección de Plantas Clonales de Café (*Coffea arabica*) con Micorrizas Arbusculares en la Región San Martín”, según Contrato N° 23-2015-INIA-PNIA/UPMSI/IE.



# INTRODUCCIÓN

El café (*Coffea arabica* L.) es uno de los productos más populares alrededor del mundo, para el Perú es uno de los productos agrícolas más importantes en el comercio internacional (MINAGRI, 2014); alcanzando en el 2011 una cifra histórica en el sector agrícola por ventas de US\$ 1.500 millones.

Particularmente en la Región San Martín es un fuerte soporte a la economía regional, debido a que se cultivan aproximadamente 100,927 hectáreas, involucrando directamente a 44,857 productores, con un universo de aproximadamente 224,285 personas dependientes de esta actividad (MINAGRI, 2014). Aproximadamente el 75% del cultivo se concentra por encima de los 1200 msnm, con rendimiento promedio de 14 qq/ha.

El cultivo de café hoy en día se ve afectado seriamente por el ataque de la roya amarilla, cercospora (nc) y otros. La problemática de la escasa fertilidad natural del suelo y presencia de fitopatógenos se previene o se minimiza con la aplicación de fertilizantes y plaguicidas químicos; sin embargo, el uso irracional de estos productos causa contaminación del suelo y agua, además de un desequilibrio en la densidad y actividad de los microorganismos rizosféricos como los hongos formadores de micorriza (Muñoz et al., 2009).

La palabra micorriza significa hongo-raíz y se usa para definir las asociaciones simbióticas formadas entre los hongos y las raíces de las plantas. Los HMA mejoran la absorción de agua (Martínez & Pugnaire, 2011), nutrientes poco móviles como el fósforo (Xu

et al., 2014) y el crecimiento y adaptación de las plantas ante diversas condiciones desfavorables causadas por factores bióticos

Siendo de mucha importancia el uso de los hongos micorrízicos arbusculares se estableció una metodología que permita lograr una producción masiva de esporas con cultivos trampa para su multiplicación, esta tecnología se cataloga como limpia y no producen desechos, no hay posibilidad de impactos negativos durante la producción. La ventaja de producir inóculos en campo (mismas fincas cafetaleras) es que automáticamente se producen inóculos de las cepas de hongos micorrízicos autóctonos que ya están adaptadas al lugar donde se van a usar.

El desarrollo y transferencia de tecnología sobre la biofertilización y bioprotección en plantas clonales micorrizadas de café podría constituir un sistema más eficiente para el incremento de los rendimientos por hectárea, control de plagas y enfermedades con el uso de tecnologías limpias para el medio ambiente, mejorando la fertilidad de los suelos, buscando reducir los costos de producción y mejorar los niveles productivos de las fincas cafetaleras.

Esperamos que este manual sirva de guía a todos los productores cafetaleros, para mejorar e incrementar la productividad de los cafetales, basados en las variedades caturra, pache y nacional y haciendo uso de consorcios micorrízicos eficientes en la biofertilización y bioprotección de plantones de café.

## Colecta y codificado de muestras de suelo rizosférico en fincas cafetaleras

La colecta de muestras de suelo rizosférico se realizó en fincas cafetaleras con las variedades caturra, pache y nacional en cinco provincias de la región San Martín (Rioja, Moyobamba, Lamas, El Dorado y Huallaga). Esta labor consiste en colectar suelo rizosférico y biomasa radicular de 90 plantas previamente seleccionadas. Se colecta una cantidad de 5 kg de suelo rizosférico y muestras de raíces y pelos absorbentes (León, 2006) por planta de café; a una distancia de 30 cm del tallo principal y una profundidad de 0 – 20 cm, luego se deposita en una bolsa plástica o papel con los datos respectivos de colecta para su traslado hasta vivero donde se realizó la multiplicación de las esporas formadoras de micorrizas, para este caso estuvo situado en las instalaciones del vivero del “Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), San Martín.



Figura 1. Colecta de suelo rizosférico.



Figura 2. Acondicionamiento de suelo rizosférico.

## Uso de plantas trampa para la multiplicación de hongos micorrízicos (HMA)

**Tabla 1.** Identificación y ubicación de muestras rizosféricas en plantas seleccionadas de fincas cafetaleras

Altitud	Variedad	Código/planta seleccionada				
		RIOJA	MOYOBAMBA	LAMAS	EL DORADO	HUALLAGA
A1 (800-1000)	Caturra	63	292	181	12	154
		73	289	193	245	143
		111	300	197	20	159
	Pache	83	286	188	7	151
		109	304	202	4	158
		115	298	207	24	135
		78	287	190	241	162
	Nacional	114	291	200	247	139
		118	307	208	16	147
		67	268	26: 31	224	123
A2 (1000-1200)	Caturra	87	273	40: 43	236	130
		92	255	53: 56	217	170
		96	261	34: 36	238	121
	Pache	98	258	39: 44	223	132
		105	271	58: 60	214	166
		65	274	25: 32	229	165
		97	249	37: 42	220	177
	Nacional	101	264	49: 51	232	180

- Los HMA tienen potencial como biofertilizantes y bioprotectores (Bashan et al., 2012), pero deben ser inoculados en suelos donde la población es mínima o donde los hongos nativos son inefectivos; no obstante, debido a que los HMA son simbiontes obligados (Harris et al., 2012), el inóculo puede obtenerse multiplicándolos en raíces de plantas hospedantes susceptibles o plantas “trampa” (Enríquez et al., 2010). Las plantas trampa que se pueden utilizar son: maíz, arroz, pasturas del tipo gramíneas y algunas leguminosas. Para el caso de este manual, se presenta la multiplicación de esporas basadas en el uso de plantas trampa de arroz como cultivo hospedero, así mismo se muestra un protocolo del uso de los demás cultivos trampa.
- Se confeccionan cajones con dimensiones de 50 cm x 60 cm x 30 cm, forrados con plástico con la finalidad de evitar la contaminación de las esporas seleccionadas con el suelo. En estos cajones fueron depositados el suelo rizosférico extraído mezclado con arena estéril y finalmente se sembraron granos de arroz. La planta trampa de arroz fue cultivada por 60 días, considerando su mantenimiento. Durante el tiempo de la multiplicación, se registraron datos de condiciones ambientales como humedad, temperatura e intensidad de luz solar.



**Figura 3.** Establecimiento de inóculos de HMA



**Figura 4.** Uso de arroz como cultivo trampa en la multiplicación de HMA

## Periodo de estrés y corte de las plantas de arroz

A los 60 días después de la siembra del cultivo trampa se suspende el riego y 20 días después se procede a cortar las plantas de arroz. La finalidad de la suspensión del riego radica en inducir el estrés hídrico y facilitar el proceso de esporulación e incremento de esporas de HMA. Luego se procede a la homogenización de todas las fuentes de inóculos en cada cama multiplicadora, para la luego extraer una sub-muestra de aproximadamente 1 kg la cual es previamente codificado y llevado al laboratorio para realizar su respectivo análisis de cuantificación de esporas.



**Figura 5.** Cultivo trampas con esporas de HMA sometidas a estrés hídrico

Luego de 80 días se obtuvo incrementos de esporulación de 600%, demostrando infectividad y efectividad, resultados que coinciden con los establecidos por Dávila et al. (2009). La infectividad se refiere a la capacidad del hongo para penetrar e invadir la raíz internamente y explorar el suelo, así como la habilidad de persistir en el sistema productivo. La efectividad se demuestra cuando el hongo mejora el desarrollo del hospedante (Tapia et al., 2010; Pérez et al. 2012).



## Tinción de raíces en plantas de café para determinación de la presencia de HMA

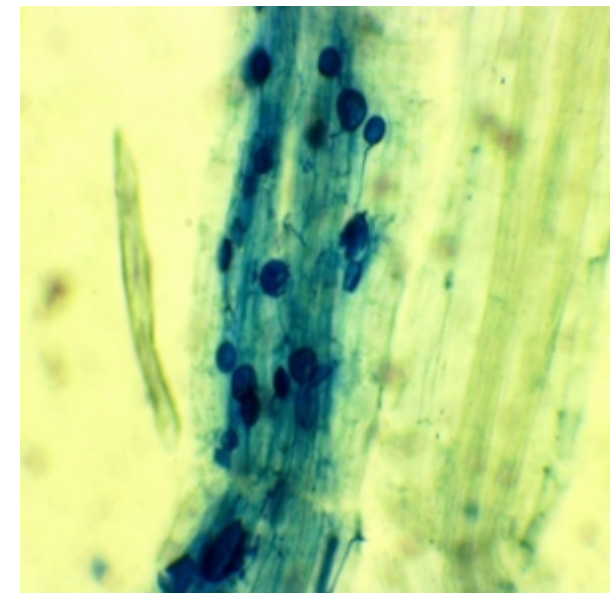
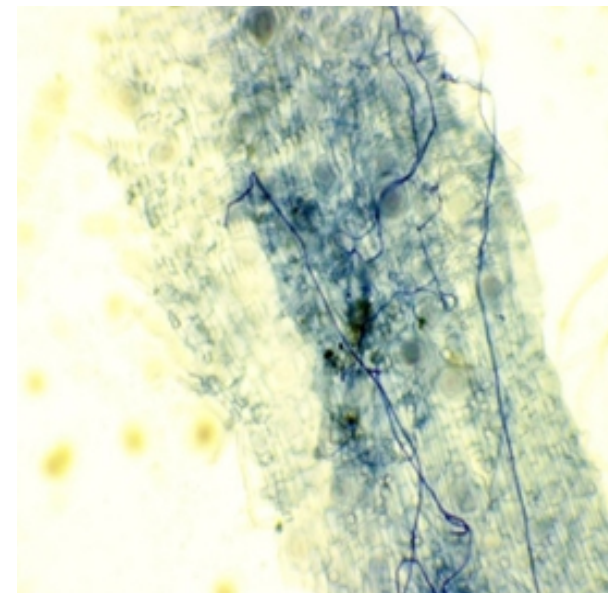
La tinción se realiza aplicando la técnica de Phillips y Hayman (1970) con modificaciones. Para esto las raíces son puestas en tubos de ensayo de 16x150 mm conteniendo una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10% hasta cubrir la muestra, las cuales se dejaron en KOH por 24 horas.

Después se colocan en baño maría a 90°C durante 30 minutos con la finalidad de remover el contenido citoplasmático y clarificar el tejido cortical, luego se lava tres veces con agua corriente hasta eliminar todo el KOH.

Posteriormente las raíces son sumergidas en agua oxigenada ( $H_2O_2$ ) durante 90 minutos a

temperatura ambiente, para aclarar los pigmentos de la raíz, luego se lavan con vinagre blanco de 2-3 veces para acidificar las muestras y se deja en vinagre por 10 minutos.

Finalmente las raíces son sumergidas en solución colorante tinta china (0.25%), y colocadas en baño maría a 90°C durante 60 minutos, después del tiempo transcurrido estas son lavadas entre 2-3 veces con vinagre para eliminar el exceso de tinta. Por último las raíces teñidas se conservan en vinagre blanco, hasta su evaluación.



**Figura 6.** Raíz de café, colonizada por los HMA-N, con presencia de hifas y vesículas.

## Tinción de raíces en plantas de arroz para determinación de la presencia de HMA

La tinción se realiza aplicando la técnica de Phillips y Hayman (1970) con modificaciones. Para esto las raíces son colocadas en tubos de ensayo de 16x150 mm conteniendo una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10% hasta cubrir la muestra, las cuales se dejan en KOH por 24 horas.

Después son colocadas en baño maría a 90°C durante 20 minutos con la finalidad de remover el contenido citoplasmático y clarificar el tejido cortical, luego se lava tres veces con agua corriente hasta eliminar todo el KOH.

Posteriormente las raíces son sumergidas en agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 90 minutos a temperatura

ambiente, para aclarar los pigmentos de la raíz, luego se lavan con vinagre blanco de 2-3 veces para acidificar las muestras y se deja en vinagre por 10 minutos.

Finalmente las raíces son sumergidas en solución colorante tinta china (0.25%), y colocadas en baño maría a 90°C durante 60 minutos, después del tiempo transcurrido estas son lavadas entre 2-3 veces con vinagre para eliminar el exceso de tinta. Por último las raíces teñidas se conservan en vinagre blanco, hasta su evaluación.



Figura 7. Presencia de hifas en raíz teñida de plantas de arroz

La preparación de las muestras para la extracción de esporas de HMA, se realiza mediante los métodos del tamizado húmedo y decantación (Gerdemann y Nicolson, 1963) y el método de centrifugación (Jenkins, 1964).

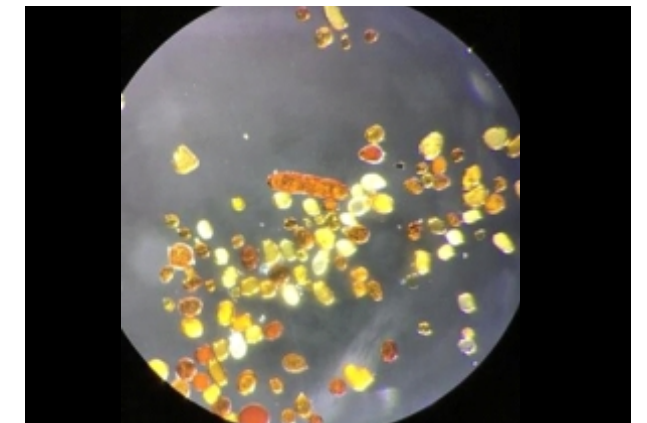
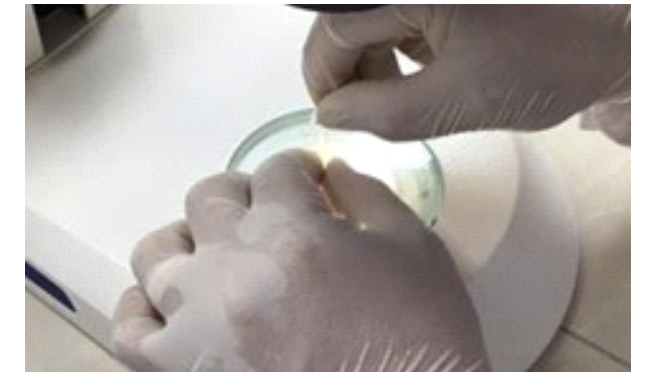
El procedimiento consiste en pesar 10 g de muestra de suelo y disolverlo en suficiente agua, para luego vaciarlo en un frasco de aproximadamente 1 L al cual se le adiciona 800 mL de agua y se agita vigorosamente durante 05 minutos, luego se deja reposar la mezcla por 2-3 minutos y seguidamente se vacía el sobrenadante sobre los tamices de 250 y 38 micras, repitiendo el mismo procedimiento 3 veces y descartando lo que sobra en el frasco.

Luego se lava cada tamiz y el sobrenadante del primero (250 m) debe colocarse en una placa Petri de 100 x 10 mm, a su vez el sobrenadante del segundo (38 m) se coloca en un tubo de falcón adicionándole 30 ml de agua corriente y llevándole a centrifugar a 2400 rpm/ 5 minutos, posteriormente se elimina el sobrenadante conteniendo materia orgánica y esporas muertas.

El precipitado, se suspende en dos soluciones de sacarosa, una al 20% (20 mL) y otra al 60% (20 mL), el cual se lleva a refrigeración. Estos tubos son llevados nuevamente a centrifuga a 2200 rpm/ 4 minutos para precipitar partículas de suelo y suspender las esporas hasta la interface entre los dos azúcares.

Por último el tubo falcón debe ser retirado cuidadosamente de la centrifuga, colocando el sobrenadante sobre el tamiz de 38 micras, para proceder a lavar con agua corriente y eliminar la sacarosa, dejando las esporas, el cual debe ser vaciado en una placa petri, para su posterior evaluación.

## Aislamiento y extracción de esporas de HMA





## Propagación sexual del café



Figura 8. Semilla sexual de café para germinación

Se germinaron semillas de café de las variedades caturra, pache y nacional colectadas en fincas cafetaleras tolerantes a roya. El sustrato empleado fue arena esterilizada a 131 °C x 15 lb de presión por espacio de 2 horas. Después de 45 días, cuando los plantines presentaban un primer par de hojas se realizaron el repique en las bolsas almacigueras preparadas con sustrato orgánico también esterilizada para evaluar el efecto de los hongos micorrízicos arbusculares.



Figura 9. Plántulas de café para su inoculación con HMA

## Repique e inoculación de HMA-N a plántulas de café propagadas por semilla sexual

Tanto el repique como la inoculación con HMA-N se realiza simultáneamente para reducir el estrés de las plántulas y poner en contacto directo el inóculo con las raíces; para ello, las plántulas de café de las camas germinadoras son extraídas cuidadosamente y repicadas en cada bolsa almaciguera. Se utiliza el sustrato orgánico estéril, consistente en tierra agrícola y arena en una relación 2:1. Luego se procede a llenar sustrato en las bolsas almacigueras de 1 kg. La aplicación



Figura 10. Repique e inoculación de plántulas.

micorrízica consiste en agregar una cantidad proporcional al número de esporas asegurándose de incorporar esporas en un número de 1500 a 2000 por cada plánton logrado durante la etapa del repique. Todas las bolsas repicadas deberán ser etiquetadas y codificadas, para realizar las evaluaciones posteriores.



Figura 11. Codificado de plántulas inoculadas.

## Propagación asexual del café

Asimismo, se pueden obtener plántones clonales de material vegetal establecidas en jardines clonales como fuente de semilla vegetativa o directamente de las plantas matrices.

Para fines de este manual, se trabajaron con plántones de café logrados por semilla sexual y asexual, siendo este último recolectado de los rametos establecidos en jardines clonales ubicados en las instalaciones del IIAP-San Martín con un material vegetal caracterizados genéticamente con características sobresalientes



**Figura 12.** Brotes de café para clonación

de productividad, calidad de taza y tolerancia a la roya.

Para el enraizamiento debe aplicarse una solución de 2000 ppm (0.2%) de AIB diluido en alcohol a la base del brote recolectado y preparado con un área foliar cortada hasta el 50%, estos brotes fueron instalados en sustratos de arena en bandejas livianas de vivero y finalmente depositados en los microtúneles para su enraizamiento por un tiempo de 50 días.



**Figura 13.** Establecimiento de brotes de café en ambientes enraizadores

## Repique e inoculación con HMA a plántones propagados por semilla asexual



**Figura 14.** Inoculación de brotes enraizados

Al cabo de 50 días estos brotes enraizados son repicados en bolsas almacigueras con sustrato de tierra mezclados con arena, es en esta etapa donde se aplican entre 1500 a 2000 esporas de hongos micorrízicos arbusculares nativos identificados y seleccionados con eficiencia en la biofertilización y bioprotección por cada brote repicado y son llevados a un vivero de aclimatación con un sistema de sombra favorable con mallas que permiten el ingreso de la luz solar de 50 y 20% y la aplicación frecuente de un riego liviano con la finalidad de mantener la turgencia de los brotes enraizados en todo momento y lograr así su endurecimiento de los plántones en un periodo de dos meses.



**Figura 15.** Planta clonada micorrizada y aclimatada

## Determinación de la efectividad de los consorcios de HMA nativos



**Figura 16.** Plantón de café micorrizadas y no micorrizadas

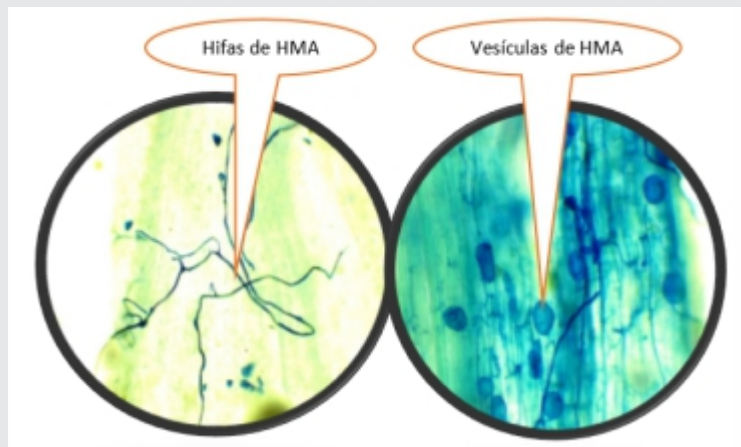
Para determinar la efectividad de los consorcios de HMAN en la biofertilización y bioprotección de plántones de café, se evaluaron diferentes parámetros como por ejemplo, parámetros fúngicos porcentaje de colonización y longitud de micelio extraradical; así como también parámetros morfológicos de las plantas como altura de planta (cm); número de ramas y parámetros de sanidad como número de agallas en raíces de café, porcentaje de infección por *Meloidogyne* spp, e incidencia y severidad a roya.

Se lograron obtener 03 consorcios de hongos micorrízicos arbusculares eficientes en la biofertilización y bioprotección en plántones de café.

**Altura de planta:** Para evaluar la altura de planta se toma como punto de inicio la base del tallo y como punto de referencia el meristemo apical o yema terminal, utilizando una regla milimetrada.

**Longitud de Micelio Extraradical (MER):** Se utiliza la técnica del gel semisólido y cuantificación por el método de intersección de cuadrantes (Robles, 2009).

Las raíces preparadas son observadas en un microscopio estereoscópico de 5X, contándose las intersecciones hifalínea. Éstos datos son transformados a longitud de micelio por unidad de peso de suelo mediante una ecuación (Newman, 1966).



**Figura 17.** Hifas y vesículas de HMA observadas en raíces de café

**Porcentaje de colonización micorrízica:** Desde el punto de vista microbiológico se evalúa el porcentaje de colonización micorrízica, siguiendo la metodología de tinción de raíces (Phillips y Hayman (1970). Las raicillas fueron colocadas sobre portaobjetos (30 raicillas) con lactoglicerol para colocar cubreobjetos (León 2006).

La determinación de la frecuencia de la colonización micorrízica (arbusculos, vesículas, hifas y esporas) considera 90 campos ópticos observados de las 30 raicillas montadas en portaobjetos, expresándola en porcentaje de colonización (Sieverding 1983); además, es necesario determinar la intensidad micorrízica en el sistema radical.

Ambas determinaciones se calculan con las siguientes ecuaciones (Trouvelot et al., 1986; Sieverding, 1983).

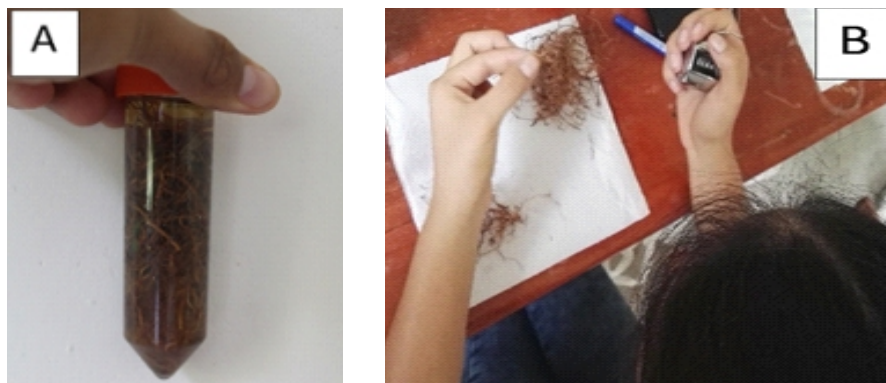


**Figura 18.** Evaluación biométrica de esporas de HMA.



**Figura 19.** Medición biométrica de una espóra de HMA.

**Evaluación del número de agallas en raíces de café:** Raíces conservadas son lavadas con agua corriente y se colocaron en tubos falcón que contenían alcohol al 50%. Posteriormente, se conservan en refrigeración hasta su evaluación respectiva. Para realizar el conteo de agallas, se pesaron 5 g. de raíces que contienen agallas.



**Figura 20.** Evaluación de agallas en raíces de café micorrizadas: **A)** Conservación. **B)** Conteo de agallas.

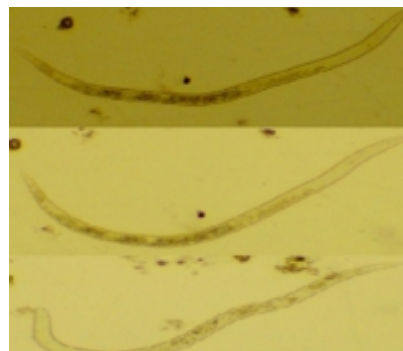
**Porcentaje de infección por *Meloidogyne* spp:** Para determinar el porcentaje de infección en el sistema radical de las plantas de café, se utiliza la escala cuantitativa propuesta por Taylor y Sasser (1983), tomando los grados de reacción de estos, se obtiene una escala de resistencia, siendo estas probadas para el nematodo *Meloidogyne* sp en el cultivo de tomate.

Para el cálculo del porcentaje de infección se pesaran 100 agallas en tres repeticiones, luego se cuenta la cantidad de agallas presentes en las raíces de cada plantón de café y se compara con el promedio del peso de las 100 agallas, finalmente para obtener el porcentaje de infección es necesario comparar el peso fresco total del sistema radicular con el peso total de las agallas presentes en cada plantón.

**Figura 21.** *Meloidogyne* spp. en raíces de café.



**Figura 22.** *Meloidogyne* spp. observadas en raíces de café.



### Incidencia y severidad a roya.

Para determinar la incidencia a roya se evalúa todas las plantas del bloque, observándose hoja por hoja con un formato de evaluación preparado.

Las plantas que no presentaron la sintomatología de esporas de roya (esporas color naranja) es necesario verlas a traluz para determinar si existen manchas cloróticas (que es la primera etapa de los síntomas de esta enfermedad).

Para determinar la severidad de roya se usó la escala propuesta por Hiroshi et al., 2009, la misma que segmenta la severidad por grados según la tabla 2.

**Tabla 2:** Escala de resistencia a las poblaciones de roya (Hiroshi et al., 2009)

Escala	Descripción
1	Árboles sin lesiones cloróticas en las hojas.
2	Árboles con lesiones cloróticas en las hojas sin esporulación.
3	Número de lesiones en la hoja con esporas de roya entre 1 a 10 y frecuencia de las hojas con esporas de roya entre 1 y 10%.
4	Número de lesiones en la hoja con esporas de roya entre 11 a 20, y frecuencia de las hojas con esporas de roya entre 11 y 35%
5	Más de 20 lesiones con esporas de roya y más de 35% de hojas con esporulación.



**Figura 23.** Plantones micorrizadas de café.



**Figura 24.** *H. vastatrix* en plantones micorrizadas de café.

A continuación se presenta algunos resultados en biofertilización y bioprotección de plantones de café con aplicaciones de micorrizas arbusculares.

## Biofertilización mediada por micorrizas arbusculares en plantones de café.

Se presenta la biofertilización en base a la aplicación de esporas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en plantones de café de las variedades de caturra, pache y nacional evaluadas a los 120 días después de establecido el experimento.

Para determinar la naturaleza de los efectos de los HMA sobre la variable incremento en altura de los

plantones se establecieron en un diseño experimental completamente al azar (D.C.A). Cada uno de los 11 tratamientos tal como se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3:** Tratamientos en estudio con HMA nativos

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN	HMA (Esporas)
T <sub>0</sub>	Sin Micorriza (Absoluto)	0
T <sub>1</sub>	Con HMA de Rioja, Altitud (800-1000)	2000
T <sub>2</sub>	Con HMA de Rioja, Altitud (1000-1200)	2000
T <sub>3</sub>	Con HMA de Moyobamba, Altitud (800-1000)	2000
T <sub>4</sub>	Con HMA de Moyobamba, Altitud (1000-1200)	2000
T <sub>5</sub>	Con HMA de Lamas, Altitud (800-1000)	2000
T <sub>6</sub>	Con HMA de Lamas, Altitud (1000-1200)	2000
T <sub>7</sub>	Con HMA de El Dorado, Altitud (800-1000)	2000
T <sub>8</sub>	Con HMA de El Dorado, Altitud (1000-1200)	2000
T <sub>9</sub>	Con HMA de Huallaga, Altitud (800-1000)	2000
T <sub>10</sub>	Con HMA de Huallaga, Altitud (1000-1200)	2000

**Incremento de altura en plantones de café, variedad caturra (cm).**

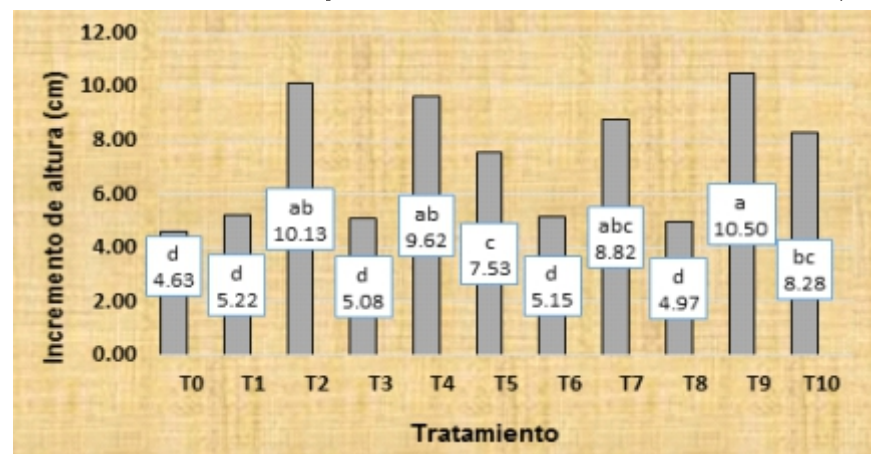


**Gráfico 1.** Prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ) para el incremento de altura (cm) en plantas clonales de café, variedad caturra.



**Gráfico 2.** Prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ) para el incremento de altura (cm) en plantas clonales de café, variedad pache.

### Incremento de altura en plántones de café, variedad nacional (cm).



**Gráfico 3.** Prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ) para el incremento de altura (cm) en plantas clonales de café, variedad nacional.

Como se observa en la prueba de Tukey (Gráfico 1), respecto a la variedad caturra, los tratamientos T3 y T5 con inóculos de HMA colectados procedentes de Moyobamba y Lamas en la altitud de 800-1000 msnm presentaron los mayores incrementos en altura de plánton con valores de 5.72 cm y 4.70 cm respectivamente; para la variedad pache (Gráfico 2), los tratamientos T3, T9 y T10 con inóculos de HMA colectados en Moyobamba y Huallaga en las altitudes de 800-1000 y 1000-1200 msnm obtuvieron los mejores incrementos en altura de plánton con valores de 5.82, 7.78 y 9.87 cm respectivamente y para la variedad nacional (Gráfico 3), los tratamientos T2 y T9 con inóculos de HMA colectados en Rioja y Huallaga en la altitud de 1000-1200 y 800-1000 msnm obtuvieron los mejores incrementos en altura de plánton con valores de 10.13 y 10.50 cm respectivamente

Sin embargo, contrario a estos resultados lo obtuvo el tratamiento testigo T0 (sin inóculo de HMA) con tan solo 1.19 cm de incremento para la variedad caturra, 0.90 cm para la variedad pache y 4.63 cm para la variedad nacional, lográndose diferencias con respecto a los otros tratamientos, incrementos mayores de hasta 4 veces durante los 120 días de

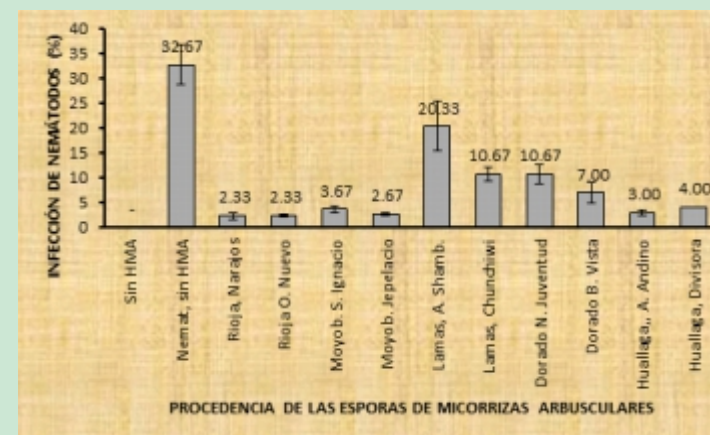
duración del ensayo. La altura es importante porque nos indica el crecimiento ortotrópico de la planta, lo que va a proporcionar bandolas que garantizaran la producción en los próximos años (Garriz y Vicuña, 1990). En la agricultura, el uso de HMA tiene un gran potencial biotecnológico debido a que facilitan la disponibilidad de nutrientes para las plantas. Por lo tanto, plantas micorrizadas poseen una ventaja importante con respecto a las plantas no micorrizadas (Da Silva y Cardoso, 2007). Sin embargo, el conocimiento sobre las interacciones entre las condiciones edáficas y la ecología de los HMA nativos y la efectiva asociación simbiótica entre las plantas y estos microorganismos es limitado. Por esta razón, el análisis de poblaciones de HMA nativos y su ambiente edáfico, pueden conducir a su uso eficiente en la agricultura, especialmente de países en vías de desarrollo (Serralde y Ramírez, 2004).

## Bioprotección mediada por micorrizas arbusculares en la reducción de nematodos en plántones de café

Se presenta la bioprotección en base a la aplicación de esporas de hongos micorrizicos arbusculares (HMA) en plántones de café de las variedades de caturra, pache y nacional evaluadas a los 120 días después de establecido el experimento.

Para determinar la naturaleza de los efectos de los HMA sobre la variable infección por nematodos y presencia de roya en plántones de café, se establecieron diferentes diseños experimentales con diferentes factores y tratamientos en estudio.

### Reducción de la infección por nematodos en plántones de café mediada por micorrizas arbusculares



**Gráfico 4.** Efecto de las micorrizas arbusculares y nematodos evaluados en plántones de café

En el Gráfico 4 se muestra que el tratamiento con nematodos sin aplicación de micorrizas, presentó el más alto valor de infección con nematodos con 32,67%; mientras que el tratamiento sin aplicación de micorrizas y sin nematodos no mostró infección por nematodos, lo que sugiere además que el sustrato estuvo bien tratado para evitar contaminarse con nematodos presentes en forma natural; seguido del tratamiento con aplicación de HMA procedente de Lamas - Alto Shamboyacu, que presentó valor de 20,33%. Menores porcentajes de infección por nematodos lo presentaron las micorrizas procedentes de Rioja y Moyobamba y Huallaga.

Existen algunas referencias (Sánchez, 2007), en donde se ha encontrado reducción en el nivel de colonización de los micosimbiontes por fitonematodos, principalmente cuando se inoculan primero las HMA y, posteriormente (un mes), los nematodos fitoparásitos. Estos mismos resultados fueron reflejados en otro cultivo a nivel; Carbajal (2009), con plantas de *Hypericum* inoculadas con HMA nativos en respuesta al ataque por *Meloidogyne incognita*, obtuvo mejores resultados que los inoculados con la micorriza comercial, evitando la penetración masiva del nematodo en sus raíces y de esta manera una limitada formación de agallas.

## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Bashan, Y., Kamnev, A. & de Bashan, L. 2012. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility of Soils*, 49, 465–479.

Carbajal, E. 2009. Colonización Micorrízica por Hongos Vesículo Arbusculares en *Hypericum*, y Control del Nematodo Nodulador *Meloidogyne Incognita*. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí, Ecuador. 148 pp.

Da Silva, Jose y Cardoso, Elke. 2007. Micorriza arbuscular em cupuaçu e pupunha cultivados em sistema agroforestal e em monocultivo na Amazônia Central. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 41(5): 819-825.

Dávila, L., Ramos, C., y Rosales, C. 2009. Multiplicación de hongos micorrízicos arbusculares MA nativos de cultivo de cacao (*Theobroma cacao*) en maíz (*Zea mays*) bajo distintos tratamientos agronómicos. (Tesis de Pregrado). Universidad Popular del Cesar, Valledupar, Colombia.

Enríquez, F., Núñez, L. y Paillacho, F. 2010. Evaluación de la efectividad de las micorrizas arbusculares nativas sobre el desarrollo y estado nutritivo del palmito (*Bactris gasipaes*, Kunt) en etapa de vivero. XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. Escuela Politécnica del Ejército, Santo Domingo, Ecuador.

Garriz P.I. y Vicuñas. 1990. "Variaciones anuales en el crecimiento vegetativo y la arquitectura del canopeo de *Coffea arabica* L. cv. Caturra catimor". *Agronomía Tropical*, 36 (4–6). 77–88 p.

Gerdemann, J. W. y Nicholson, T. H. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br Mycol Soc.* vol. 46, p. 235–244.

Harris, C., Esqueda, M., Orozco, A., Castellanos, A., Gardea, A., y Valenzuela, E. 2012. Metabolismo energético de Cucurbita pepo micorrizada con hongos del desierto sonoreño y crecida con salinidad o déficit de humedad. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(1), 51–59.

Hiroshi, G., Sera, T., Batista I. y Shiguer D. 2009. Resistance to leaf rust in coffee cultivars. *Coffee science, Laveas*. 5(1): 59-66.

Jenkins, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Rep.* 48, 692

León, D. 2006. Evaluación y caracterización de micorrizas arbusculares asociadas a yuca (*Manihot esculenta* sp.) en dos regiones de la Amazonía Colombiana. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 125 pp.

Martínez, L., & Pugnaire, F. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi host preference and site effects in two plant species in a semiarid environment. *Applied Soil Ecology*, 48, 313–317.

Ministerio de Agricultura y Riego. 2014. Plan Nacional de Renovación de Cafetales. Dirección General de Competitividad Agraria. Lima, Perú. 24p.

Ministerio de Agricultura y Riego. 2014. Origen y distribución geográfica del café. Dirección General de Competitividad Agraria. Lima, Perú.

Muñoz, E., Macías, C., Franco, A., Sánchez, E., Jiménez, J. y González, J. 2009. Identificación y colonización natural de hongos micorrízicos arbusculares en nogal. *Terra Latinoamericana*, 27, 355-361.

Phillips, J. y Hayman, D. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular – arbuscular fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158 – 161.

Robles, C. 2009. "Variación temporal de la diversidad de hongos de micorriza arbuscular y el potencial micorrízico en especies silvestres de Agave en Oaxaca". Instituto Politecnico Nacional (IPN). Oaxaca, México. 80 pp.

Sánchez, M., Gómez, E., Muñoz, J. E., Barrios, E., Pragner, M., Bravo, O. 2007. Las endomicorrizas, expresión bioedáfica de importancia en el trópico. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Editorial Feriva. 351 p.

Serralde, Ana y Ramírez, M. 2004. Análisis de poblaciones de micorrizas en maíz (*Zea mays*) cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos. *Revista Corpoica*, 5(1) 31-40.

Sieverding, E. 1983. Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo-arbuscular en el laboratorio. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. Cali.

Tapia, J., Ferrera, R., Varela, L., Rodríguez, J., Soria, J., Tiscareño, M., Loredó, C., Alcalá, J. y Villar, C. 2010. Inefectividad y efectividad de hongos micorrízicos arbusculares nativos de suelos salinos en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*). *Revista Mexicana de Micología*, 31, 69-74.

Taylor, A. y Sasser, J. 1983. Biología, identificación y control de los nematodos del nódulo de la raíz (especies de *Meloidogyne*). Carolina del Norte, USA. pp. 1-11.

Trouvelot, A.; Kough, J. L.; y Gianinazzi-Pearson, V. 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes. d'estimation ayant une signification fonctionnelle. En *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. Gianinazzi-Pearson, V. and Gianinazzi, S (eds.). INRA, Paris. p: 101-109.

Xu, P., Liang, L., Dong, X., Xu, J., Jiang, P. & Shen, R. 2014. Response of soil phosphorus required for maximum growth of *Asparagus officinalis* L. to inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi. *Pedosphere*, 24 (6), 776-782.

# ANEXO 1. Glosario de términos

## BIOFERTILIZACIÓN

La Biofertilización es una tecnología que consiste en la inclusión de microorganismos en las semillas o plantines (Inoculación) "Hongos Micorrizas - Bacterias fijadoras de N<sub>2</sub>" y/o solubilizadores de fósforo, producen efectos aditivos, de particular importancia, para el desarrollo de cultivos más rendidores y aumentar el contenido de materia orgánica del suelo.

## BIOPROTECCIÓN

La bioprotección es una tecnología que consiste en la inclusión de microorganismos como resultado de la preactivación de las respuestas de defensa de la planta como es el uso de hongos formadores de micorrizas arbusculares con la finalidad de mejorar la calidad fitosanitaria de los cultivos.

## CONSORCIOS DE MICORRIZAS ARBUSCULARES

Los consorcios de micorrizas arbusculares son asociaciones naturales de dos o más especies que actúan como una comunidad, beneficiándose cada uno de ellos de la actividad de los demás. Es decir, se trata de sistemas naturales en los que hongos micorrízicos arbusculares de distintas especies a menudo de distintos géneros, coexisten espacialmente y cooperan, posibilitando así la supervivencia de todos ellos.

## HMA-N

Son los hongos micorrízicos arbusculares nativos.

## HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (HMA)

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son organismos del suelo que viven simbióticamente con la mayoría de plantas. Ellos les aportan beneficios, dándoles ventajas con respecto a las plantas no micorrizadas, como por ejemplo facilitándole a la planta la toma de nutrientes de baja disponibilidad o de poca movilidad en el suelo, evitando la acción de microorganismo patógenos en la raíz, aumentando la tolerancia de la planta a condiciones de estrés abiótico en el suelo, entre otros beneficios.

## INOCULO

Término colectivo para referirse a los microorganismos o sus partes (esporas, fragmentos miceliales, etc.) capaces de provocar infección o simbiosis cuando se transfieren a un huésped.

## MICELIO

Aparato vegetativo de los hongos que le sirve para nutrirse y está constituido por hifas.

## PLANTA TRAMPA

Planta trampa es un cultivo que se siembra en camas de multiplicación de esporas de micorrizas arbusculares con la finalidad de atraer el hongo en los momentos clave de su ciclo de vida.

## PROPAGACIÓN ASEXUAL

La propagación asexual se define como la reproducción de una planta a partir de una célula, un tejido, un órgano (raíces, tallos, ramas, hojas).

## PROPAGACIÓN SEXUAL

La reproducción sexual se define como la unión de células germinales especiales, los gametos, y está encaminada a la variabilidad genética por recombinación cromosómica.

## ROYA AMARILLA

La Roya es un hongo fitoparásito obligado del café. Esta enfermedad se caracteriza por la aparición de pústulas de color pardo anaranjado, que avanzan siguiendo los nervios de las hojas en dirección a las puntas.

## SIMBIOSIS MICORRIZICA

La simbiosis micorrízica corresponde a una asociación mutualista antigua entre hongos y raíces de la mayoría de las plantas terrestres.



