

Interaction between *Mycodiplosis* and *Hemileia vastatrix* in three scenarios of coffee crop management (*Coffea arabica*)

Interacción entre *Mycodiplosis* y *Hemileia vastatrix* en tres escenarios de manejo del cultivo de café (*Coffea arabica*)

Eduardo Santiago-Elena¹, Erika Janet Zamora-Macorra^{1*}, Mireya Zamora-Macorra², Karla Giovana Elizalde-Gaytan¹; ¹Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México. C.P. 56230. ²Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Delegación Coyoacán, C.P. 04960. México. *Autor para correspondencia: erikazam@gmail.com

Recibido: 08 de Mayo, 2020.

Aceptado: 06 de Agosto, 2020.

Santiago-Elena E, Zamora-Macorra EJ, Zamora-Macorra M and Elizalde-Gaytan KG. 2020. Interaction between *Mycodiplosis* and *Hemileia vastatrix* in three scenarios of coffee crop management (*Coffea arabica*). Mexican Journal of Phytopathology 38(3): 320-336.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2005-2

Primera publicación DOI: 17 de Agosto, 2020.

First DOI publication: August 17, 2020.

Resumen. La roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*) es una enfermedad devastadora para los cafetales en México. Los métodos de control se han centrado en el uso de fungicidas, pero sin éxito, por lo que el control biológico representa una alternativa. Las larvas de *Mycodiplosis* se reportan como depredadoras de *H. vastatrix*, pero la información disponible sobre este insecto es limitada. Los objetivos de esta investigación fueron describir el tipo de relación entre *H. vastatrix* y *Mycodiplosis* y conocer su patrón de distribución en el dosel de la planta. Se eligieron tres plantaciones con incidencia

Abstract. Coffee rust (*Hemileia vastatrix*) is a devastating disease for coffee plantations in Mexico. Control methods have focused on the use of fungicides, with no success, so biological control represents an alternative. *Mycodiplosis* larvae are reported as predators of *H. vastatrix* but the information available about this insect is limited. The objectives of this research were to describe the type of relationship between *H. vastatrix* and *Mycodiplosis*, and to know their distribution pattern in the plant canopy. Three plots with a high incidence of coffee rust in Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla, were sampled and were registered periodically the severity of the rust and the number of larvae of *Mycodiplosis* per strata of the canopy. 25 plants per plot were selected, sampled in “cinco de oros”. Larvae were molecularly identified. Using the Kruskal Wallis test, differences were detected in the number of sampling sites in the severity of rust and the number of *Mycodiplosis* larvae, detecting a positive correlation between the severity of rust and the number of *Mycodiplosis* larvae. The *Mycodiplosis* distribution was similar in the strata

de roya en Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla y se registraron periódicamente la severidad de la roya y el número de larvas de *Mycodiplosis* por estrato de la planta. Se seleccionaron 25 plantas por parcela, muestreada en cinco de oros. Las larvas se identificaron molecularmente. Mediante la prueba de Kruskal Wallis, se encontraron diferencias significativas entre sitios de muestreo en la severidad de roya y el número de larvas de *Mycodiplosis*, detectando una correlación positiva entre la severidad de la roya y el número de larvas de *Mycodiplosis*. La distribución de *Mycodiplosis* fue similar en los estratos (baja, media y alta) de las plantas evaluadas.

Palabras clave: Roya del cafeto, micófago, control biológico, incidencia, severidad.

La roya del cafeto es una enfermedad causada por el basidiomiceto *Hemileia vastatrix* (Uredinales: Pucciniaceae). Desde el 2012 esta enfermedad se catalogó como destructiva en Centroamérica ya que afectó del 30 al 100% de la producción de los cafetales (Henderson, 2020). En México la roya se encuentra presente en toda el área sembrada con variedades susceptibles, y se ha registrado una disminución en la producción de café cereza desde el 2012, cuando se obtuvieron 1 336 882 t, comparado con el 2018 con una producción de 835 380 t (SAGARPA-SENASICA 2016; SAGARPA-SIAP 2018).

El ciclo de la roya inicia por la deposición y germinación de uredosporas en las hojas; la infección depende de varios factores ambientales y fisiológicos de la planta, pero los principales son la cantidad de lluvia, la temperatura, la edad de las hojas y la carga de inóculo (Nutman y Roberts, 1963). Las uredosporas son dispersadas dentro de una plantación a través del viento o por salpique del agua

(low, medium and high) of the evaluated plants.

Key words: Coffee rust, mycophagus, biological control, incidence, severity.

Coffee rust is a disease caused by the basidiomycete *Hemileia vastatrix* (Uredinales: Pucciniaceae). Since 2012, this disease has been catalogued as destructive in Central America, since it has destroyed 30% of all coffee crop productions (Henderson, 2020). In Mexico, rust is present in all areas containing susceptible varieties, and a reduction has been registered in the production of cherry coffee since el 2012, when 1,336,882 t were produced, in comparison with 2018, in which 835,380 t were produced (SAGARPA-SENASICA 2016; SAGARPA-SIAP 2018).

The rust cycle begins with the deposition and germination of uredospores on the leaves; the infection depends on several environmental and physiological factors of the plant, although the main ones are the amount of rainfall, temperature, age of leaves and inoculant (Nutman and Roberts, 1963). Uredospores are scattered throughout a plantation by the wind or the splashing of rainwater (Nutman and Roberts, 1963; Rayner 1961; Arroyo *et al.*, 2018). Rust reduces the photosynthetic ability of plants and the development of the new sprouts in the next planting cycle. A high severity one year will directly affect the production level of the following year, causing a gradual reduction in growth, which triggers defoliations, followed by the progressive death of sprouts and branches (CABI, 2018).

An alternative for the management of rust is the genetic resistance of the varieties. The hybrid Catimor and the variety Robusta have proven to be more tolerant to the disease than the variety Arabiga; however, tolerance is rarely effective against all the

de lluvia (Nutman y Roberts, 1963; Rayner 1961; Arroyo *et al.*, 2018). La roya reduce la capacidad fotosintética de la planta y el desarrollo de los nuevos brotes en el siguiente ciclo de cultivo. La severidad alta de un año afectará directamente el nivel de producción del siguiente, provocando una reducción paulatina del crecimiento, que inicia con defoliaciones y posteriormente con muerte progresiva de brotes y ramas (CABI, 2018).

Una alternativa para el manejo de la roya es la resistencia genética de las variedades. El híbrido Catimor y la variedad Robusta han demostrado ser más tolerantes contra la enfermedad a diferencia de la variedad Arábica; sin embargo, la tolerancia es raramente efectiva contra todas las razas del patógeno (CABI, 2018). Independientemente de la variedad, para prevenir o controlar esta enfermedad se utiliza con frecuencia la aplicación de fungicidas a base de compuestos de cobre (Haddad *et al.*, 2009; Loland y Singh, 2004); sin embargo, éstos pueden ocasionar problemas al ecosistema ya que el cobre se acumula en el suelo y genera toxicidad en las cadenas tróficas al acumularse en altas concentraciones (Loland y Singh, 2004). Aplicaciones aisladas y tardías, cercanas a la época de cosecha o después de la misma, son ineficientes para el control (Martínez *et al.*, 2013). También se recomiendan aplicaciones de algunos fungicidas sistémicos (Martínez *et al.*, 2013); no obstante, estos productos no son selectivos y afectan a hongos entomopatógenos, como *Lecanicillium lecanii* (Hypocreales: Cordycipitaceae), que ayuda a reducir las poblaciones plaga del café, como la escama verde (*Coccus viridis*, Hemiptera: coccidae) (Jackson *et al.*, 2012).

Una alternativa ambientalmente amigable recomendada para el manejo de cualquier enfermedad es el uso de agentes de control biológico. En este sentido, existen insectos micófitos como las larvas del género *Mycodiplosis* (Diptera: Cecidomyiidae)

breeds of the pathogen (CABI, 2018). Regardless of the variety, in order to prevent or control this disease, fungicides based on copper compounds are frequently used to prevent or control this disease (Haddad *et al.*, 2009; Loland and Singh, 2004). Nevertheless, these may bring problems to the ecosystem, since the copper accumulates in the soil and generates toxicity in the trophic chains when it accumulates in high concentrations (Loland and Singh, 2004). Late, isolated applications near to or after the harvesting season are inefficient for the control (Martínez *et al.*, 2013). The use of some systemic fungicides is also recommended (Martínez *et al.*, 2013); however, these products are not selective and will affect entomopathogenic fungi, such as *Lecanicillium lecanii* (Hypocreales: Cordycipitaceae), which help reduce coffee pest populations, such as green scale (*Coccus viridis*, Hemiptera: coccidae) (Jackson *et al.*, 2012).

A recommended eco-friendly alternative for the management of any disease is the use of biological control agents. In this sense, mycophagous insects such as the larvae of the genus *Mycodiplosis* (Diptera: Cecidomyiidae) (Kiel, 2014) feed off rust (Basidiomycota: Pucciniales) or mildew (Erysiphales) (Holz, 1970). The number of *Mycodiplosis* species that feed of rust spores, their frequency and distribution is unknown, since few studies have examined the relation between *Mycodiplosis* and the fungi they feed off (Kiel, 2014). *M. hemileiae* is believed to be a potential *H. vastatrix* biological control agent in Latin America and the Caribbean (Hajian-Forooshani *et al.*, 2016). Kaushal *et al.* (2001) suggest that the relation helps host plants, since the larva reduces the amount of fungal spores. However, Kluth *et al.* (2001) suggest that diptera could function as dissemination agents of the fungus in the plant. Due to this, the aims of the present investigation were to: 1) Describe the type of relation between

(Kiel, 2014), que se alimentan de royas (Basidiomycota: Pucciniales) o cenicillas (Erysiphales) (Holz, 1970). Se desconoce el número de especies de *Mycodiplosis* que se alimentan de esporas de roya, así como su frecuencia y distribución, ya que hay pocos estudios que han examinado la relación entre *Mycodiplosis* y los hongos de los que se alimentan (Kiel, 2014). Se cree que *M. hemileiae* es un agente de control biológico potencial de *H. vastatrix* en Latinoamérica y el Caribe (Hajian-Foroshani *et al.*, 2016). Kaushal *et al.* (2001) sugieren que la relación ayuda a las plantas hospedantes, ya que la larva reduce la cantidad de esporas del hongo; sin embargo, Kluth *et al.* (2001) sugiere que los dípteros podrían servir como dispersores del hongo en la planta. Por lo anterior, los objetivos de la presente investigación fueron: 1) Describir en tres diferentes sistemas de manejo del cultivo, el tipo de relación entre la roya del café (*H. vastatrix*) y *Mycodiplosis* spp. y 2) Conocer el patrón de distribución de *Mycodiplosis* spp. y de *H. vastatrix* en el dosel de la planta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de muestreo. La investigación se realizó en el municipio de Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla, México; en parcelas con plantas de café (*Coffea arabica*) de diversas variedades (Costa Rica 95, Caturra, Colombiana y Borbón) y edades (10 a 35 años). Se seleccionaron tres parcelas, la primera se ubicó en la localidad de Santa Lucía (19° 58' 17" N; 97° 38' 05" O), a 964 metros sobre el nivel del mar (msnm). La segunda se ubicó en Cuetzinapan (19° 58' 39" N; 97° 3' 08" O) a 930 msnm, y la tercera se ubicó en San Bernardino (19° 58' 44" N; 97° 38' 26" O) a 903 msnm. En Santa Lucía se realizaron siete aplicaciones de fungicidas de contacto (oxi-cloruro de cobre y sulfato de cobre pentahidratado),

coffee rust (*H. vastatrix*) and *Mycodiplosis* spp. in three different crop management systems and 2) to know the distribution patterns of *Mycodiplosis* spp. and *H. vastatrix* in the canopy of the plant.

MATERIALS AND METHODS

Sampling site. This investigation was carried out in the municipal area of Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla, Mexico, in plots with coffee plants (*Coffea arabica*) of diverse varieties (Costa Rica 95, Caturra, Colombiana and Borbón) and ages (10 to 35 years). Three plots were chosen, the first of which was located in Santa Lucía (19° 58' 17" N; 97° 38' 05" W), at 964 meters above sea level (masl). The second was located in Cuetzinapan (19° 58' 39" N; 97° 38' 08" W) at 930 masl and the third, in San Bernardo (19° 58' 44" N; 97° 38' 26" W) at 903 masl. In Santa Lucía, seven rounds of contact fungicides (copper oxychloride and copper sulfate pentahydrate) were applied, along with six of systemic fungicides (Cyproconazole, Epoxiconazole, Flutriazole and Azoxystrobin+Cyproconazole), two foliar fertilizations and four nitrogen fertilizations on the soil. In Cuetzinapan, only six rounds of contact fungicides (copper oxychloride and copper sulfate pentahydrate) were applied, along with three rounds of systemic fungicides (Cyproconazole, Epoxiconazole and Azoxystrobin+Cyproconazole), one foliar fertilization and three nitrogen fertilizations on the soil. No fungicide was applied in San Bernardo, but one round of foliar fertilization was applied, along with three nitrogen fertilizations on the soil. In all sites, phytosanitary and formation prunings were carried out.

Molecular identification of *Mycodiplosis*. The identification was performed with the molecular

seis de fungicidas sistémicos (Ciproconazol, Epoxiconazol, Flutriazol y Azoxistrobin+Ciproconazol), dos fertilizaciones foliares y cuatro fertilizaciones de nitrógeno al suelo. En Cuetzinapan solo se realizaron seis aplicaciones de fungicidas de contacto (oxicloruro de cobre y sulfato de cobre pentahidratado), tres de fungicidas sistémicos (Ciproconazol, Epoxiconazol y Azoxistrobin+Ciproconazol), una fertilización foliar y tres fertilizaciones de nitrógeno al suelo. En San Bernardino no se realizaron aplicaciones de fungicidas y se hizo una fertilización foliar y tres fertilizaciones de nitrógeno al suelo. En todos los sitios se hicieron podas fitosanitarias y de formación.

Identificación molecular de *Mycodiplosis*. La identificación se realizó mediante el análisis molecular de secuencias del gen mitocondrial COI, ya que para la caracterización taxonómica a especie es necesario describir morfológicamente a machos adultos (Henk *et al.*, 2011) y su recolección en campo es complicada. Por lo tanto, en cada parcela seleccionada se recolectaron cinco larvas del primer al tercer instar en cada planta de cafeto evaluada para severidad. En total se recolectaron 125 larvas por parcela, las cuales se colocaron en frascos con etanol al 70%, se etiquetaron y se transportaron al laboratorio del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo en Texcoco, estado de México.

La extracción de ADN total se hizo con 30 larvas de cada sitio muestreado. Las larvas se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril para eliminar el exceso de etanol y posteriormente se transfirieron en un tubo eppendorf que contenía CTAB al 2% + 1% de 2-Mercaptoetanol; se maceraron con ayuda de un micropistilo y se incubaron con proteinasa K al 10% durante 1 hora a 65 °C. La separación de fases se realizó con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y centrifugación durante 15 minutos a 13000 rpm. Para la precipitación, se

analysis of sequences on the mitochondrial COI gene, since the morphological description of adult males is necessary for the taxonomic characterization by the species (Henk *et al.*, 2011) and gathering them on the field is complicated. Therefore, in each plot selected, five larvae were gathered, from the first to the last instar, in each coffee plant evaluated for severity. A total of 125 larvae were gathered, per plot, then placed in jars containing ethanol at 70%, labelled and transported to the laboratory in the Colegio de Postgraduados, Montecillo campus in Texcoco, State of Mexico.

The total DNA extraction was performed with 30 larvae in each site sampled. The larvae were rinsed three times in sterile distilled water to remove excess ethanol and later transferred to an Eppendorf tube containing CTAB at 2% + 1% of 2-Mercaptoethanol; they were macerated using a micropistile and incubated with K proteinase at 10% for 1 hour at 65 °C. The phases were separated using chloroform: isoamyl alcohol (24:1) and centrifuged for 15 minutes at 13000 rpm. For precipitation, recovered phase IV of ethanol at 100% was exposed for 30 minutes to a temperature of -20 °C. It was then centrifuged for 15 min at 13000 rpm to recover the pellet, which was dissolved in 30 µL of HPLC water. The concentration and integrity of the DNA was corroborated in a Nanodrop. For the PCR (Polymerase Chain Reaction), the primers (HCO and LCO) were used, along with conditions of amplification described by Vrijenhoek (1994). These amplified a region of ~710 pairs of bases of the mitochondrial gene cytochrome C oxidase subunit I (COI). The PCR products of the expected weight were purified using the kit Wizard® and sent for sequencing to Macrogen® (Seoul, Korea). The sequences were cleaned using the program BioEdit, and compared with the data base available in the GenBank. The best sequence was uploaded onto this system to obtain the access number.

colocó a la fase recuperada 1V de etanol al 100% y se colocó por 30 minutos a -20 °C. Posteriormente se centrifugó durante 15 min a 13000 rpm para recuperar la pastilla, la cual fue disuelta en 30 µL de agua HPLC. La concentración e integridad del ADN se corroboró en un Nanodrop. Para la PCR (Polymerase Chain Reaction) se utilizaron los primers (HCO y LCO) y condiciones de amplificación descritos por Vrijenhoek (1994), estos amplifican una región de ~710 pares de bases del gen mitocondrial citocromo C oxidasa subunidad I (COI). Los productos de PCR del peso esperado, se purificaron con el kit Wizard® y se enviaron a secuenciar a Macrogen® (Seul, Corea). Las secuencias se limpiaron con el programa BioEdit, y se compararon con la base de datos disponibles en el GenBank. La mejor secuencia se subió en este sistema para obtener el número de acceso.

Evaluación de la severidad por roya. En cada parcela se realizó un muestreo en cinco de oros y se marcaron cinco plantas por punto, para tener 25 plantas en total. El dosel de la planta se dividió en tres estratos: bajo (< 40 cm), medio (41-80 cm) y alto (>80 cm); se eligieron aleatoriamente tres hojas de cada estrato y se evaluaron individualmente con la escala desarrollada por DGSV-SINAVEF-LANREF (2016) con modificaciones, donde 0= hoja sana sin pústulas, 1= 0.5-1% de cobertura con pústulas (más de un punto clorótico en la hoja), 2= 1-5%, 3= 6-20%, 4= 21-50% y 5 >50%. En total se hicieron seis evaluaciones que iniciaron en julio de 2017 y finalizaron en enero 2019.

Evaluación del número de larvas de *Mycodiplosis*. Se realizó en las mismas plantas y hojas seleccionadas para evaluar la severidad ocasionada por roya. De cada hoja seleccionada previamente se contabilizó y registró el número de larvas de *Mycodiplosis* por hoja, para tener en total tres

Evaluation of rust severity. In each plot, a 5-point sampling was carried out and five plants were marked in each point, for a total of 25 plants. The plant's canopy was divided into three strata: low (< 40 cm), middle (41-80 cm) and high (>80 cm); three leaves were chosen at random from every stratum and evaluated individually with the scale developed by DGSV-SINAVEF-LANREF (2016) with modifications, where 0= healthy leaf without pustules, 1= 0.5-1% of surface with (more than one chlorotic spot on the leaf), 2= 1-5%, 3= 6-20%, 4= 21-50% and 5 >50%. In total, six evaluations were carried out, starting in July 2017 and ending in January 2019.

Evaluation of the number of *Mycodiplosis* larvae. This was carried out on the plants and leaves selected to evaluate the severity caused by the rust. Out of each previously selected leaf, the number of *Mycodiplosis* larvae was counted and recorded per leaf, to obtain a total of three measurements per stratum and nine for every marked plant. The evaluations were carried out at the same time as the measurement of rust severity.

Statistical analysis and determination of the relation between severity and number of larvae. Averages were compared with a non-parametric Kruskal Wallis test between the three sampling sites; the rust severity data were used, along with the number of *Mycodiplosis* larvae evaluated in the three strata of the plants (low, middle and high). A reliability of 95% and an alpha of 0.05% were considered. A *spearman* correlation analysis was carried out between the rust severity tests and *Mycodiplosis* to identify whether there is a tendency between the degree of infection and the number of larvae for each plant stratum (low, middle and high). The data were analyzed by sampling site using the program SAS JMP 11.0.

mediciones por estrato y nueve por planta marcada. Las evaluaciones se hicieron simultáneamente con la medición de severidad por roya.

Análisis estadístico y determinación de la relación entre severidad y número de larvas. Se realizó una comparación de medias a través de la prueba no paramétrica Kruskal Wallis entre los tres sitios de muestreo, se utilizaron los datos de severidad de roya y el número de larvas de *Mycodiplosis* evaluados en los tres estratos de la planta (bajo, medio y alto). Se consideró una confiabilidad del 95% y un alfa del 0.05%. También se realizó un análisis de correlación de *spearman* entre los datos de severidad de roya y *Mycodiplosis* para identificar si existe una tendencia entre el grado de infección y el número de larvas por cada estrato de la planta (bajo, medio y alto). Los datos se analizaron por sitios de muestreo, mediante el programa JMP 11.0 de SAS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de *Mycodiplosis*. La secuencia consenso obtenida se registró en la base de datos del GenBank (número de acceso MK986689) y al compararla con otras secuencias se obtuvo un 95% de similitud con ejemplares de la familia Cecidomyiidae. Existe poca información disponible en las bases de datos sobre especies de *Mycodiplosis* y en general, es un género poco estudiado. Los miembros de este género son descritos por la morfología de los machos adultos. Existen 49 especies descritas y depositadas en el Museo Nacional de Historia Natural de Jamaica y Estados Unidos de América. Se cree que puede haber un grado de especialización entre las especies de *Mycodiplosis* y las especies de las cuales se alimentan; aunque se han encontrado a una misma especie alimentándose de

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of *Mycodiplosis*. The consensus sequence obtained was registered in the GenBank data base (accession number MK986689), and comparing it with other sequences, a 95% similarity was obtained with specimens of the Cecidomyiidae family. There is little information available in the data bases on *Mycodiplosis* species, and in general terms, it is a scarcely studied genus. The members of this genus are described by the morphology of adult males. There are 49 species described and deposited in the Natural History Museum of Jamaica and the United States of America. It is believed that a degree of specialization may exist between the species of *Mycodiplosis* and the species off of which they feed; although one same species has been found to feed off of different species of rust, such as *M. rubida*, which was described in *Uromyces pisi* (Pucciniales: pucciniaceae) and *Puccinia* sp. (Pucciniales: pucciniaceae). The degree of specialization between the *Mycodiplosis* species is uncertain (Nelsen, 2013).

The phylogenetic analysis carried out on this genus in 2013 was performed with larvae from 261 collections of plants, botanized and infected by fungi. This analysis did not contemplate any coffee plant infected with *Hemileia vastatrix*, (Nelsen, 2013). Further and more profound research is necessary in order to be able to describe the mycophagous species involved.

Evaluation of rust severity and number of *Mycodiplosis* larvae. The climate in Xochitlán de Vicente Suárez is classified as Cfa (subtropical humid), with an average temperature of 19.8 °C and annual rainfalls of around 3,293 mm (SMN-CNA, 2018). These conditions promote the development of rust, which is more severe in coffee plantations located at altitudes below 1500 masl, in

diversas especies de royas, como *M. rubida* que fue descrita en *Uromyces pisi* (Pucciniales: pucciniaceae) y *Puccinia* sp. (Pucciniales: pucciniaceae). El grado de especialización entre las especies de *Mycodiplosis* es incierto (Nelsen, 2013).

El análisis filogenético de este género realizado en el 2013 se hizo con larvas provenientes de 261 colecciones de plantas herborizadas e infectadas por hongos, en este análisis no se contempló a alguna planta de cafeto infectada con *Hemileia vastatrix*, (Nelsen, 2013). Es necesario hacer investigación más profunda al respecto para poder describir la o las especies micófitas involucradas.

Evaluación de severidad por roya y número de larvas de *Mycodiplosis*. El clima de Xochitlán de Vicente Suárez está clasificado como Cfa (subtropical húmedo), con temperatura promedio de 19.8 °C y precipitaciones anuales alrededor de 3 293 mm (SMN-CNA, 2018), condiciones que favorecen el desarrollo de roya, ya que la enfermedad es más severa en cafetales ubicados en altitudes menores de 1500 msnm, en temperaturas cálidas y con periodos de humedad prolongados (CABI, 2018); por lo que durante la presente investigación siempre hubo prevalencia de la enfermedad en los sitios seleccionados.

En Santa Lucia y Cuetzinapan se realizaron aplicaciones de fungicidas sistémicos y de contacto, a diferencia de San Bernardo donde no se hicieron aplicaciones. Los datos demuestran que las aplicaciones mantuvieron la severidad de la roya en niveles más bajos que en donde no se realizó un control químico. Los fungicidas actúan directamente sobre la intensidad de esporulación y limitan las áreas con uredosporas (Merle *et al.*, 2019). No obstante, la fluctuación de la severidad fue mayor en Santa Lucia y Cuetzinapan a diferencia de San Bernardo, en donde se mantuvo estable (Figura 1). Además, se encontró que la severidad por roya en

warm temperatures and with prolonged periods of humidity (CABI, 2018); therefore, throughout the present investigation, the diseased always prevailed in the selected sites.

In Santa Lucia and Cuetzinapan, rounds of systemic fungicides were applied, unlike in San Bernardo, where no rounds were applied. The data show that the applications kept rust severity at lower levels than in places in which no chemical control was applied. Fungicides act directly on the intensity of sporulation and they limit the areas with uredospores (Merle *et al.*, 2019). However, the fluctuation of the severity was greater in Santa Lucia and Cuetzinapan, unlike in San Bernardo, where it was stable (Figure 1). Additionally, rust severity was found to be similar in Cuetzinapan and in Santa Lucia, although less fungicide and fertilizer was applied in the former, indicating that the number of fungicide applications could be reduced without reducing the effectiveness of the control.

In regard to *Mycodiplosis*, the presence of larvae was also observed in all the evaluations performed, and the site with the highest population density was San Bernardo, while Cuetzinapan and Santa Lucia were similar (Figure 2). Given that the larvae of this diptera feed off of uredospores, it seems that, the higher their availability, the higher the number of larvae. However, greater evidence is required to determine if the functional response of larvae to the fluctuation of uredospores is not linear (Davies, 2007).

Severity and number of larvae. The Kruskal-Wallis analysis displayed significant differences between the sampling sites, in both severity ($p < .0001$) and in number of larvae ($p < .0001$) (Table 1). The plot located in San Bernardo had the highest severity and number of larvae, while the one in Cuetzinapan had the lowest severity

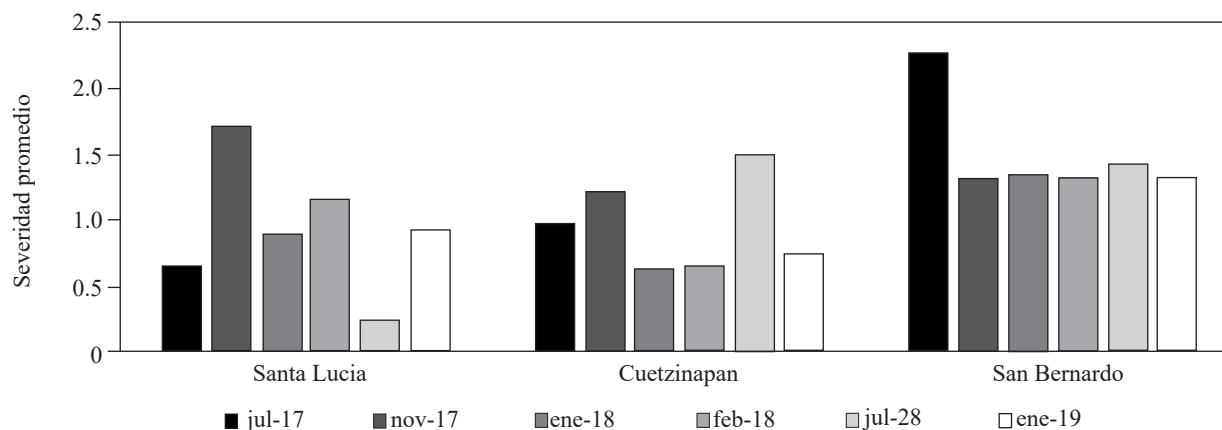


Figura 1. Severidad de la roya del caféto (*Hemileia vastatrix*) en tres localidades y seis fechas de muestreo en el municipio de Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.
Figure 1. Severity of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) in three locations and six dates of sampling in the municipal area of Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.

Cuetzinapan fue similar a la de Santa Lucía, aunque se realizaron menos aplicaciones de fungicidas y menos fertilizaciones; indicando que el número de aplicaciones de fungicidas podría reducirse sin reducir la efectividad del control.

Referente a *Mycodiplosis*, también se observó presencia de larvas en todas las evaluaciones realizadas, y el sitio con mayor densidad poblacional fue San Bernardo mientras que Cuetzinapan y Santa Lucía fueron similares (Figura 2). Dado que las larvas de este díptero se alimentan de las uredosporas, parece que entre mayor disponibilidad haya de las mismas habrá una mayor cantidad de larvas. Sin embargo, se necesita mayor evidencia para determinar si la respuesta funcional que tienen las larvas ante la fluctuación de uredosporas es no lineal (Davies, 2007).

Severidad y número de larvas. Con el análisis de Kruskal-Wallis se encontraron diferencias significativas entre los sitios de muestreo, tanto en severidad ($p < .0001$) como en número de larvas ($p < .0001$) (Cuadro 1). La parcela ubicada en San Bernardo tuvo la mayor severidad y número de larvas,

and number of larvae (Figures 2 and 3). This is due to the applications of fungicides that helped reduce rust severity and, therefore, there was less food availability for larvae. Similar results were reported by Merle et al. (2019), who showed that its natural enemy (*Lecanicillium lecanii*) was also more abundant in areas with more rust.

We assume that in all areas, the population of the diptera helps reduce *Hemileia vastatrix* populations, since it feeds off the uredospores, which could delay the beginning of the infection or contribute to reducing initial infections (Nutman and Roberts, 1963). However, given that the level of severity is high, it would be necessary to explore whether an efficient management option is biological control by flooding.

The comparison of averages performed with the rust severity data per plant stratum (low, middle and high) showed significant differences ($p < 0.001$). The severity in the middle stratum was determined to be greater than in the low and high strata (Table 2). This may be due to several factors, such as the layout of plant tissues, the amount of light/shade and the genotype and age of the plant. In general,

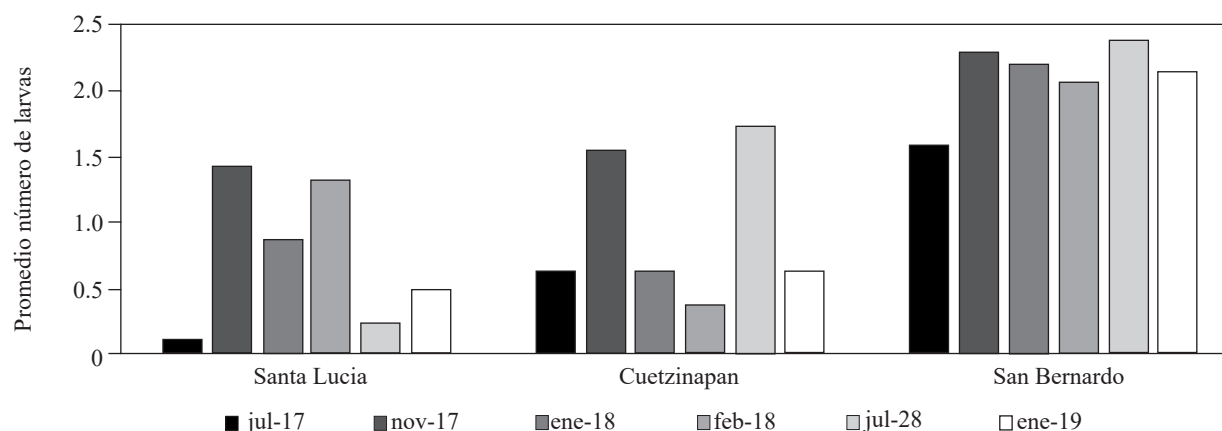


Figura 2. Fluctuación poblacional de *Mycodiplosis* spp. en tres localidades y seis fechas de muestreo en el municipio de Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.

Figure 2. Fluctuations in the population of *Mycodiplosis* spp. In three locations and six dates of sampling in the municipal area of Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.

mientras que la ubicada en Cuetzinapan tuvo la menor severidad y número de larvas (Figura 2 y 3); esto debido a las aplicaciones de fungicidas que ayudaron a disminuir la severidad de la roya y, por tanto, hubo menor disponibilidad de alimento para las larvas. Resultados similares fueron reportados por Merle y colaboradores (2019) quienes demostraron que en sitios donde había más roya, su enemigo natural (*Lecanicillium lecanii*) también fue más abundante.

the middle stratum has a greater amount of plant tissue, whereas the higher stratum is composed of new tissue or tissue in formation, and the lower stratum has a lower number of branches. Shade is different in the strata of the plant, and it is known to have antagonistic effects in the colonization and the sporulation of rust (Toniutti *et al.*, 2017). In addition, the number of appressoria in the fungus decreases in susceptible genotypes as the leaves age, whereas in resistant genotypes, there are more

Cuadro 1. Comparación entre las medias de la severidad y número de larvas (*Mycodiplosis* spp.) de acuerdo al estrato de la planta y el sitio de muestreo en el municipio de Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.

Table 1. Comparison between means of the severity and number of larvae (*Mycodiplosis* spp.) according to the strata of the plants and the sampling site in the municipal area of Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.

		Sitio						χ^2 , p
		Santa Lucia		Cuetzinapan		San Bernardo		
		Media	DE	Media	DE	Media	DE	
Severidad	Bajo	0.95	1.19	0.97	1.24	1.49	1.58	28.89, <0.001
	Medio	1.13	1.32	0.97	1.19	1.52	1.52	34.59, <0.001
	Alto	0.83	1.11	0.82	1.18	1.42	1.42	49.67, <0.001
Larvas	Bajo	0.78	1.46	0.69	1.3	2.09	2.09	93.29, <0.001
	Medio	0.91	1.79	0.9	2.24	2.11	2.11	105.9, <0.001
	Alto	0.72	1.25	0.68	1.31	2.32	2.32	121.6, <0.001

χ^2 derivada de una Prueba Wilcoxon y Kruskal Wallis, DE= Desviación Estándar / χ^2 derived from a Wilcoxon and Kruskal Wallis Test, SD= Standard Deviation.

Suponemos que en todos los sitios la población del díptero ayuda a disminuir las poblaciones de *Hemileia vastatrix*, al alimentarse de las uredosporas, lo que podría retrasar el inicio de la infección o contribuir a reducir las infecciones iniciales (Nutmán y Roberts, 1963). Sin embargo, dado que el nivel de severidad es elevado, se tendría que explorar si una opción de manejo eficaz es el control biológico inundativo.

La comparación de medias realizada con los datos de severidad de roya por estrato de la planta (bajo, medio y alto) demostró diferencias significativas ($p < 0.001$). Se determinó que la severidad en el estrato medio es mayor respecto al estrato bajo y alto (Cuadro 2). Esto puede deberse a varios factores, como la disposición de tejido vegetal, la cantidad de luz/sombra y el genotipo y edad de la planta. En general, el estrato medio tiene mayor cantidad de tejido vegetal, mientras que el estrato superior está compuesto de tejido nuevo o en formación y el inferior tiene menor número de ramas. La sombra es diferente en los estratos de la planta y se conoce que tiene efectos antagónicos en la colonización y esporulación de la roya (Toniutti *et al.*, 2017). Además, en genotipos susceptibles, el número de apresorios del hongo disminuye conforme se incrementa la edad de las hojas, mientras que los

apressoria in young and old leaves (Coutinho *et al.*, 1994).

No significant differences ($p = 0.2686$) were found in the distribution of *Mycodiplosis* in the strata of the plant (Table 2). Merle *et al.* (2019) found that, in the strata of coffee plants, the area with uredospores was similar under the shade or in areas exposed to the sun, which reinforces the results obtained in the present investigation, since larvae had the same food availability in the three strata, therefore its distribution was similar.

Correlation between *Mycodiplosis* and rust severity. A positive correlation was found in all sites and strata between rust severity and the number of *Mycodiplosis* larvae (Cuadro 3). In San Bernardo there was a very clear positive tendency, in which a higher severity meant a greater number of larvae (Figure 3). In general terms, for all sites, the high stratum displayed a higher correlation. In San Bernardo, no fungicides were applied and this allowed for a better association between rust and *Mycodiplosis*. Copper-based fungicides not only affect rust directly, but also natural enemies and the phenology of the host plant (Brinate *et al.*, 2015).

In diverse experiments, positive correlations have been found between hosts/prey and parasites/

Cuadro 2. Distribución de la severidad y número de larvas (*Mycodiplosis* spp.) según el estrato de las plantas de café muestreadas en el municipio de Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.

Table 2. Distribution of the severity and number of larvae (*Mycodiplosis* spp.) according to the strata of the coffee plants sampled in the municipal area of Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.

	Bajo		Medio		Alto		χ^2 , p
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	
Severidad	1.14	1.37	1.21	1.35	1.02	1.31	18.00, <0.001
No. Larvas	1.19	2.1	1.31	2.4	1.24	2.2	2.62, 0.2686

χ^2 derivada de una Prueba Wilcoxon y Kruskal Wallis, DE= Desviación Estándar / χ^2 derived from a Wilcoxon and Kruskal Wallis Test, SD= Standard Deviation.

genotipos resistentes hay más apresorios en hojas jóvenes y viejas (Coutinho *et al.*, 1994).

No se encontraron diferencias significativas ($p=0.2686$) en la distribución de *Mycodiplosis* en los estratos de la planta (Cuadro 2). Merle y colaboradores (2019) encontraron que en los estratos de plantas de café el área con uredosporas fue similar bajo sombra o en zonas con exposición al sol, lo que refuerza los resultados obtenidos en esta investigación, ya que la larva tuvo la misma disponibilidad de alimento en los tres estratos y por tanto su distribución fue similar.

Correlación entre *Mycodiplosis* y severidad de roya. Se identificó una correlación positiva en todos los sitios y estratos entre la severidad de la roya y el número de larvas de *Mycodiplosis* (Cuadro 3). En San Bernardo hubo una tendencia positiva muy clara, donde a mayor severidad presentó un mayor número de larvas (Figura 3). En general, para todos los sitios, el estrato alto mostró tener una mayor correlación. En San Bernardo no se realizaron aplicaciones de fungicidas, lo que permitió una mejor asociación entre la roya y *Mycodiplosis*. Los fungicidas a base de cobre no solo afectan directamente a la roya, sino también a los enemigos naturales y a la fenología de la planta hospedera (Brinate *et al.*, 2015).

En diversos experimentos se han encontrado correlaciones positivas entre hospedantes/presas y parásitos/depredadores, similares a las observadas en este trabajo; tal es el caso de los diferentes estados del ciclo del coccinelido micófago *Illeis cincta* y la severidad causada por cenicilla (*Oidium* sp.) en girasol (*Helianthus annuus*) (Jagadish *et al.*, 2017); o de la disponibilidad de células de la larva *Trichoplusia ni* y la multiplicación del virus entomopatógeno *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) (Tseng y Myers, 2014).

predators, similar to those observed in the present work. Such is the case of the different stages of the cycle of the mycophagous coccinelid *Illeis cincta* and the severity caused by mildew (*Oidium* sp.) in sunflower (*Helianthus annuus*) (Jagadish *et al.*, 2017), or of the cell availability of the larva *Trichoplusia ni* and the multiplication of the entomopathogenic virus *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) (Tseng and Myers, 2014).

In the present investigation, the positive correlation between *Mycodiplosis* and the severity of rust can be analyzed from two perspectives: rust as a pathogenic agent of the coffee plant that depends on the availability of plant tissue and *Mycodiplosis* as a biocontrolling agent (predator) of rust, which depends on the number of uredospores available (prey).

The general conditions of the host have been observed, in various pathosystems, to beneficially or negatively affect the development of the parasite. In some cases, if the host is “low quality” and does not have ideal conditions, biotic and abiotic, for its

Cuadro 3. Correlación entre la severidad de la roya y número de larvas (*Mycodiplosis* spp.) según el estrato de la planta y el sitio de muestreo en el municipio de Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.

Table 3. Correlation between rust severity and the number of larvae (*Mycodiplosis* spp.) according to the strata of the plants and the sampling site in the municipal area of Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.

	Santa Lucia r*, p	Cuetzinapan r*, p	San Bernardo r*, p
Bajo	0.4016 p=.000	0.3197 p=.000	0.5054 p=.000
Medio	0.4194 p=.000	0.3290 p=.000	0.4943 p=.000
Alto	0.4198 p=.000	0.4225 p=.000	0.5287 p=.000

*Correlación de Spearman / * Spearman Correlation.

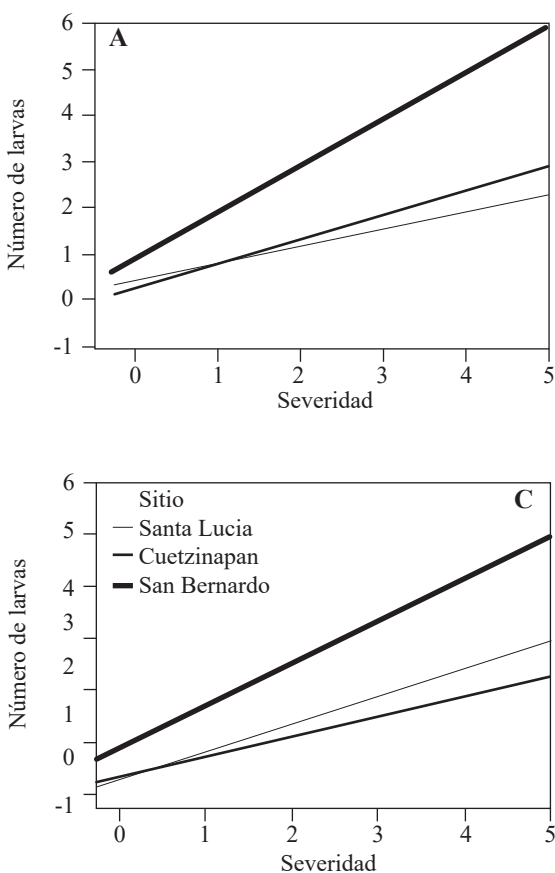


Figura 3. Relación entre el número de larvas de *Mycodiplosis* spp. y la severidad de roya (*H. vataatrix*) en el estrato alto (A), medio (B) y bajo (C) de las plantas de café muestreadas en el municipio de Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.

Figure 3. Relation between the number of *Mycodiplosis* spp. larvae and rust (*H. vataatrix*) severity in the high (A), middle (B) and low (C) strata of the coffee plants sampled in the municipal area of Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.

En la presente investigación la correlación positiva entre *Mycodiplosis* y la severidad de Roya puede ser analizada desde dos perspectivas: la roya como un agente patógeno del café que depende de la disponibilidad de tejido vegetal y *Mycodiplosis* como un agente biocontrolador (depredador) de la roya, que depende del número de uredosporas disponibles (presas).

Se ha observado en varios patosistemas que el desarrollo del parásito puede ser beneficiado o afectado negativamente por las condiciones generales del hospedante. En algunos casos, si el hospedante es de “baja calidad” y no tiene las condiciones idóneas, bióticas y abióticas para su desarrollo, el parásito podrá infectarlo fácilmente y se reproducirá más, generando que la población del huésped

development, the parasite will easily infect it and it will reproduce more, leading the population of the host to continue under non-ideal conditions, making it more and more susceptible, and therefore with a better development of the pathogen (Beldomenico y Begon, 2009). However, well-fed hosts that provide greater amounts of food have also been known to favor the development of the parasite and will help it produce more offspring (Tseng and Myers, 2014).

On the other hand, it is also known that the populations of prey and predators fluctuate due to their interaction, and this investigation found, in every case, a positive correlation between the severity of rust (prey) and the number of larvae (predators), which entails a mutual regulation

continúe bajo condiciones no idóneas, haciéndolo cada vez más susceptible y por lo tanto con mejor desarrollo del patógeno (Beldomenico y Begon, 2009); sin embargo, también se ha visto que un hospedante bien nutrido y que proporcione mayor cantidad de alimento favorecerá el desarrollo del parásito y hará que este tenga mayor descendencia (Tseng y Myers, 2014).

Por otro lado, se sabe que las poblaciones de presas y depredadores oscilan debido a su interacción, y en este trabajo se encontró siempre una correlación positiva entre la severidad de roya (presas) y el número de larvas (depredadores), lo que supone una regulación mutua entre estas poblaciones; sin embargo, la población de roya varía por razones distintas de las presiones de depredación de la larva, por lo que es difícil determinar si los cambios en la población de roya están o no relacionados directamente con los cambios de densidad de la población de su depredador (*Mycodiplosis*). Por lo tanto, se puede inferir que la población del díptero tiene potencial para reducir el crecimiento de la población de roya (Davies, 2007).

La interacción Cafeto-Roya-*Mycodiplosis* es evidentemente más compleja que lo descrito en el presente trabajo; la severidad de la roya es posiblemente determinada por el nivel de desarrollo y susceptibilidad del cultivo y dado que la población de *Mycodiplosis* es dependiente de la severidad de roya (correlación positiva), la población del díptero aumentará si hay mayor disponibilidad de uredosporas. Una severidad alta de la roya afecta directamente el potencial de producción del café del siguiente ciclo, provocando un decrecimiento paulatino, que iniciará con defoliaciones y posteriormente con muerte progresiva de brotes y ramas (CABI, 2018); no obstante, es posible que el díptero, al estar consumiendo las uredosporas, ayude a mantener en equilibrio los niveles de roya del siguiente ciclo, evitando que la producción disminuya notablemente.

between these populations. However, rust population varies for reasons different to the pressure of larva predation, making it difficult to determine whether the changes in the rust population are directly related to the changes in the population density of its predator (*Mycodiplosis*) or not. We can therefore infer that the population of the diptera has the potential to reduce the growth of the rust population (Davies, 2007).

The Coffee plant-Rust-*Mycodiplosis* interaction is evidently more complex than what has been described in the present work. Rust severity is possibly determined by the level of development and susceptibility of the crop, and given that the population of *Mycodiplosis* is dependent on the severity of rust (positive correlation), the population of this insect will increase if there is a greater availability of uredospores. A high rust severity has a direct effect on the coffee production potential of the next cycle, leading to a gradual decrease, which will begin with defoliations, followed by the progressive death of shoots and branches (CABI, 2018). Nevertheless, it is possible that the diptera, when eating the uredospores, helps maintain the balance in the levels of rust of the next cycle, stopping the production from decreasing noticeably.

Along with this, other biotic factors could make the interaction more complex, such as the presence of *Lecanicillium lecanii*, another biocontrolling agent, or the tree ant *Azteca sericeasur* (hymenoptera: formicidae), which may feed off the diptera, avoiding an efficient control of the rust (Hajian-Forooshani *et al.*, 2016; Vandermeer *et al.*, 2016). However, the distribution of *A. sericeasur* in Mexico is scarcely known (Vásquez-Bolaños, 2011) and has seemingly only been reported in the southeast of the country (Hajian-Forooshani *et al.*, 2016; Vandermeer *et al.*, 2016).

In several moments of the present investigation, larvae of the diptera were observed to mobilize

Aunado a esto, otros factores bióticos que podrían hacer más compleja la interacción, como la presencia de *Lecanicillium lecanii*, otro agente biocontrolador, o la hormiga arbórea *Azteca sericeasur* (hymenoptera: formicidae) que podría alimentarse del díptero evitando un eficiente control de la roya (Hajian-Forooshani *et al.*, 2016; Vandermeer *et al.*, 2016). Sin embargo, la distribución de *A. sericeasur* en México es poco conocida (Vásquez-Bolaños, 2011) y al parecer solo se ha reportado en el sureste del país (Hajian-Forooshani *et al.*, 2016; Vandermeer *et al.*, 2016).

Durante la presente investigación se observó en diversas ocasiones que las larvas del díptero se movilizaban dentro de las pústulas alimentándose de las uredosporas, por lo que éstas se encontraban no solo en su tracto digestivo, sino también sobre su tegumento. Hasta ahora se desconoce si esto es suficiente para que el insecto actúe como diseminador de la roya en la misma hoja y contribuya a aumentar la severidad en la planta. Es evidente la necesidad de realizar más investigaciones sobre el ciclo de vida de la larva para poder comprender mejor su función y relación con *H. vastatrix*.

CONCLUSIONES

La distribución de roya (*H. vastatrix*) en el dosel de los tres escenarios de manejo del cultivo, fue mayor en el estrato medio de la planta, y la distribución de *Mycodiplosis* spp. es similar en los tres estratos de la planta. Existe una correlación positiva entre la severidad ocasionada por la roya del café (*H. vastatrix*) y el número de larvas de *Mycodiplosis* spp., que es favorecida al no usar fungicidas.

inside the pustules, feeding off the uredospores, and were therefore found, not only in their digestive tract, but also on their integument. To date, whether this is enough for the insect to act as a disseminator of rust in the leaf itself and contribute to increase the severity in the plant, is unknown. There is an evident need to carry out further research on the life cycle of the larva to understand its function and relation with *vastatrix* in greater depth.

CONCLUSIONS

The distribution of rust (*H. vastatrix*) in the canopy of the three crop management scenarios was greater in the middle stratum of the plant, and the distribution of *Mycodiplosis* spp. is similar in the three strata of the plant. There is a positive correlation between the severity caused by rust in coffee plants (*H. vastatrix*) and the number of *Mycodiplosis* spp. larvae, which is favored without the use of fungicides.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

## LITERATURA CITADA

- Arroyo EJ, Sánchez F and Barboza LA. 2018. Infection model for analyzing biological control of coffee rust using bacterial anti-fungal compounds. *Mathematical Biosciences* 307:13-24. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2018.10.009>.
- Beldomenico MP and Begon M. 2009. Disease spread, susceptibility and infection intensity: vicious circles? *Trends in Ecology and Evolution* 25(1): 21-27. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.06.015>
- Brinate SVB, Martins LD, Pereira GNG, Cunha VV, Sotero A de J, Amaral JFT, Junior WCJ and Tomaz MA. 2015.

- Copper can influence growth, disease control and production in arabica coffee trees. *Australian Journal of Crop Science* 9(7): 678–683. <https://search.informit.com.au/documentSummary;dn=357328620234232;res=IELHSS>
- CABI. 2018. Plantwise Knowledge Bank. Technical Factsheet: Coffee leaf rust *Hemileia vastatrix*. <https://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=26865>.
- Coutinho TA, Rijkenberg FHJ and Van ASCH MAJ. 1994 The effect of leaf age on infection of Coffea genotypes by *Hemileia vastatrix*. *Plant Pathology* 43(1):97-103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1994.tb00558.x>
- Davies NB. 2007. Capítulo 14. Depredación. Pp. 299 -326. In: Smith TM y Smith RL (eds.). *Ecología*. 6a edición. Pearson educación S.A, Madrid, España. 776 p. ISBN: 978-84-7829-084-0.
- DGSV-SINAVEF-LANREF. 2016. Escalas de severidad de roya del café en hoja y planta. <http://www.royacafe.lanref.org.mx/Documentos/EscalaSeveridadDefoliacionPlanta-yHoja.pdf>
- Haddad F, Maffia L, Mizubuti E and Texeira H. 2009. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. *Biological Control* 49(2): 114-119. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.02.004>
- Hajian-Forooshani Z, Rivera SIS, Jiménez SE, Perfecto I and Vandermeer J. 2016. Impact of regionally distinct agroecosystem communities on the potential for autonomous control of the coffee leaf rust. *Journal of Environmental Entomology* 45(6):1521-1526. <https://doi.org/10.1093/ee/nvw125>
- Henderson PT. 2020. Elite-led development and Mexico's independent coffee organisations in the wake of the rust epidemic, *Third World Quarterly* 41(6): 1012-1029, <https://doi.org/10.1080/01436597.2020.1729726>
- Henk DA, Farr DF and Aime MC. 2011. *Mycodiplosis* (Diptera) infestation of rust fungi is frequent, wide spread and possibly host specific. *Fungal ecology* 4(4): 284-289. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.03.006>.
- Holz, B. 1970: Revision in Mitteleuropa vorkommender mycophager Gallmücken der *Mycodiplosis*-Gruppe (Diptera, Cecidomyiidae) unter Berücksichtigung ihrer Wirtsspezifität. Unpubl. Thesis. Stuttgart: University of Stuttgart, 237 p.
- Jackson D, Skillman J and Vandermeer J. 2012. Indirect biological control of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*, by the entomogenous fungus *Lecanicillium lecanii* in a complex coffee agroecosystem. *Biological Control* 61(1): 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.01.004>
- Jagadish KS, Basavaraj K and Geetha S. 2017. Spatial distribution of the mycophagous ladybird predator, *Illeis cincta* (Fabricius) (Coleoptera Coccinellidae) in relation to powdery mildew disease in sunflower (*Helianthus annuus* L.) Canopy. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 5(5): 331-334. <http://www.entomoljournal.com/archives/?year=2017&vol=5&issue=5&ArticleId=2341>
- Kaushal K, Mishra AN, Varma PK, Kapoor KN and Pandey RN. 2001. Dipteran fly (*Mycodiplosis* sp): a natural bioagent for controlling leaf rust (*Puccinia recondita* var. tritici) of wheat (*Triticum aestivum*). *Indian Journal of Agricultural Sciences* 71(2): 136-138. [https://www.researchgate.net/publication/292558955\\_Dipteran\\_fly\\_Mycodiplosis\\_sp\\_A\\_natural\\_bioagent\\_for\\_controlling\\_leaf\\_rust\\_Puccinia\\_recondita\\_tritici\\_of\\_wheat\\_Triticum\\_aestivum](https://www.researchgate.net/publication/292558955_Dipteran_fly_Mycodiplosis_sp_A_natural_bioagent_for_controlling_leaf_rust_Puccinia_recondita_tritici_of_wheat_Triticum_aestivum)
- Kiel. 2014. Gall midges (Diptera: Cecidomyiidae: Cecidomyiinae) of Germany -Faunistics, ecology and zoogeography by Marcela Skuhrová, Václav Skuhrový and Hans Mayer. *Faunistisch-Ökologische Arbeitsgemeinschaft e.V.* 38: 1-200. [https://www.zobodat.at/pdf/Faun-Oekol-Mitt\\_Supp\\_38\\_0001-0200.pdf](https://www.zobodat.at/pdf/Faun-Oekol-Mitt_Supp_38_0001-0200.pdf)
- Kluth S, Kruess A and Tscharnke T. 2001. Interactions between the rust fungus *Puccinia punctiformis* and ectophagous and endophagous insects on creeping thistle. *Journal of Applied Ecology* 38(3): 548-556. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2001.00612.x>
- Loland J and Singh B. 2004. Copper contamination of soil and vegetation in coffee orchards after long-term use of Cu fungicides. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 69: 203-211. <https://doi.org/10.1023/B:FRES.0000035175.74199.9a>
- Martínez M, Cerna R, Salinas H and Lizardo A. 2013. Guía de manejo de plagas: lista verde y amarilla. CABI. <https://www.plantwise.org/FullTextPDF/2018/20187800210.pdf>
- Merle I, Pico J, Granados E, Boudrot A, Tixier P, de Melo E, Filho V, Cilas C and Avelino J. 2019. Unraveling the complexity of coffee leaf rust behavior and development in different *Coffea arabica* agro-ecosystems. *Phytopathology* 110(2): 418-427. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-19-0094-R>
- Nelsen DJ. 2013. A Phylogenetic Analysis of Species Diversity, Specificity, and Distribution of Mycodiplosis on Rust Fungi. Plant Pathology and Crop Physiology. LSU Master's Theses. [https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool\\_theses/2700](https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_theses/2700)
- Nutman F and Roberts F. 1963. Studies on the Biology of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. *Trans British Mycological Society* 46: 27-44. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80005-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80005-4)
- Rayner, R. 1961. Germination and Penetration studies on coffee rust (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.). *Annals of Applied Biology* 49(3): 497-505. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1961.tb03641.x>
- SAGARPA-SENASICA. 2016. Roya del café. *Hemileia vastatrix* (Barkeley & Broome) (Pucciniales: Chaetomiaceae). *Aviso público del riesgo y situación actual*. 6 p. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172768/Aviso\\_publico\\_Roya\\_del\\_cafeto\\_2016.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172768/Aviso_publico_Roya_del_cafeto_2016.pdf)
- SAGARPA-SIAP. 2018. Atlas Agroalimentario 2012-2018. 50-51 pp. Primera edición. Ciudad de México. [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018).
- SMN-CNA. Servicio Meteorológico Nacional- Comisión Nacional del Agua. 2018. <https://smn.cna.gob.mx/es/climatologia/informacion-climatologica/informacion-estadistica-climatologica>
- Toniutti L, Breidler JC, Etienne H, Campa C, Doubeau S, Urban L, Lambot C, Pinilla JCH and Bertrand B. 2017. Influence of environmental conditions and genetic background of arabica coffee (*C. arabica* L) on leaf rust (*Hemileia vastatrix*) pathogenesis. *Frontiers in Plant Science* 8: 2025. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02025>
- Tseng M and Myers JH. 2014. The relationship between parasite fitness and host condition in an insect-virus System.

- PLoS ONE 9(9): e106401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106401>
- Vandermeer LK, Vandermeer JH and Perfecto I. 2016. Disentangling endogenous versus exogenous pattern formation in spatial ecology: a case study of the ant *Azteca sericeasur* in southern Mexico. Royal Society Open Science 3: 160073. <https://doi.org/10.1098/rsos.160073>
- Vásquez-Bolaños M. 2011. Lista de especies de hormigas (Hymenoptera: Formicidae) para México. Dugesiana 18(1): 95-133. <https://www.antwiki.org/wiki/images/3/3f/V%C3%A1squezBola%C3%B1os2011Mexico.pdf>
- Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular marine biology and biotechnology 3(5): 294-299. [https://www.researchgate.net/publication/15316743\\_DNA\\_primers\\_for\\_amplification\\_of\\_mitochondrial\\_Cytochrome\\_C\\_oxidase\\_subunit\\_I\\_from\\_diverse\\_metazoan\\_invertebrates](https://www.researchgate.net/publication/15316743_DNA_primers_for_amplification_of_mitochondrial_Cytochrome_C_oxidase_subunit_I_from_diverse_metazoan_invertebrates)