



1859

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**

**FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS  
NATURALES RENOVABLES**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**Actividad biológica de los aceites esenciales  
contra el desarrollo y la supervivencia de  
*Hemileia vastatrix*.**

Tesis previa a la obtención de  
título de Ingeniero Agrónomo

**Autor**

Edison Joel Jiménez Cumbicus

**Director**

Jorge I. Armijos-Rivera, PhD

**Loja-Ecuador**

2021

## CERTIFICACIÓN

**Jorge I. Armijos-Rivera, PhD**

**Director de Tesis**

### **CERTIFICO:**

Que luego de haber dirigido y revisado el trabajo de tesis titulado “**Actividad biológica de los aceites esenciales contra el desarrollo y la supervivencia de *Hemileia vastatrix***”, previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo, del egresado Edison Joel Jiménez Cumbicus, se autoriza su presentación debido a que el mismo se sujeta a las normas y reglamentos generales de graduación exigido para la carrera de Ingeniería Agronómica de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja.

En mi calidad de director de tesis, certifico que el trabajo de investigación realizado ha sido propio del egresado.

Loja, 4 de marzo del 2021



firmado electrónicamente por:  
**JORGE ISAAC  
ARMIJOS  
RIVERA**

Jorge I. Armijos-Rivera, PhD

**DIRECTOR DE TESIS**

## CERTIFICACIÓN

Una vez cumplida la reunión del tribunal de calificación del trabajo final de tesis titulado: “**Actividad biológica de los aceites esenciales contra el desarrollo y la supervivencia de *Hemileia vastatrix***” de la autoría del egresado Edison Joel Jiménez Cumbicus, de la carrera de Ingeniería Agronómica, el cual se le propuso realizar unas correcciones, mismas que ya han sido incluidas en el documento final.

En tal virtud, nos permitimos aprobar y calificar el trabajo final realizado por señor tesista, el cual está acorde con los requerimientos de la carrera de Ingeniería Agronómica de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, por lo tanto, se autoriza continuar con los trámites pertinentes.

Loja, 30 de agosto del 2021



Firmado electrónicamente por:  
**EDMIGIO SOLIFS  
VALDIVIESO  
CARAGUAY**

---

Ing. Edmigio Valdivieso Mg.Sc.  
PRESIDENTE



Firmado electrónicamente por:  
**SANTIAGO  
CRISTOBAL  
VASQUEZ MATUTE**

---

Ing. Santiago Vásquez Ph. D.  
VOCAL



Firmado electrónicamente por:  
**ANGEL ROLANDO  
ROBLES CARRION**

---

Ing. Ángel Robles Ph. D.  
VOCAL

## **AUTORÍA**

Yo, EDISON JOEL JIEMENEZ CUMBICUS, declaro ser el autor del presente TRABAJO DE TESIS y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

Firma:



Firmado electrónicamente por:

**EDISON JOEL JIMENEZ  
CUMBICU**

Autor: Edison Joel Jiménez Cumbicus

Cédula: 1150142493

Fecha: 07 de septiembre de 2021


## CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, Edison Jiménez Cumbicus, declaro ser autor, de la tesis titulada “**Actividad biológica de los aceites esenciales contra el desarrollo y la supervivencia de *Hemileia vastatrix***”, como requisito para optar al grado de Ingeniero Agrónomo, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los siete días del mes de septiembre del dos mil veintiuno firma el autor.

Firma:  Firmado electrónicamente por:  
**EDISON JOEL JIMENEZ  
CUMBICUS**

**Autor:** Edison Joel Jiménez Cumbicus

**Número de cédula:** 1150142493

**Dirección:** 27 de abril, Espíndola, Loja.

**Correo electrónico:** [ejjimenezc@unl.edu.ec](mailto:ejjimenezc@unl.edu.ec)

**Celular:** 0988747974

### DATOS COMPLEMENTARIOS:

Director de Tesis: Jorge I. Armijos-Rivera, PhD

Tribunal de Grado: Ing. Edmigio Valdivieso Mg. Sc. PRESIDENTE.

Ing. Santiago Vásquez Ph. D. VOCAL

Ing. Ángel Robles. Ph. D. VOCAL

## **AGRADECIMIENTO**

*Agradezco a Dios por haber permitido culminar mi formación académica y hacer realidad un sueño anhelado, a mis padres, hermanos que supieron darme su apoyo incondicional a lo largo de este camino. Mis más sinceros agradecimientos a la planta docente de la carrera de Ingeniería Agronómica, por brindarme sus conocimientos y experiencias. De la misma manera a mi director de Tesis Dr. Jorge Armijos quien fue pilar fundamental para dirigir el cumplimiento de mi trabajo de tesis, por sus conocimientos, orientación, paciencia y motivación. Finalmente, familiares y amigos por brindarme su confianza, amistad. Gracias a todos por contribuir con un grano de arena para este logro académico.*

## DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a Dios por guiarme y protegerme en todo momento, a mis padres Andrés Jiménez y Edilma Cumbicus que, con su ejemplo de esfuerzo y superación, además de no dejarme desmayar en esta ardua etapa; a mis hermanos: Robinson y Anthony Jiménez que siempre estuvieron presentes compartiendo momentos de felicidad. De igual manera lo dedico a mis abuelos paternos y maternos: Arcesio Jiménez, Dorinda Cumbicus, Misael Cumbicus y Clara Castillo, por sus sabios consejos y compartir grandes momentos a su lado. A mi tío Patricio Cumbicus que siempre me distes tu apoyo incondicional

*Edison Joel Jiménez Cumbicus*

# ÍNDICE GENERAL

PORTADA.....	I
CERTIFICACIÓN.....	II
CERTIFICACIÓN.....	III
AUTORÍA.....	IV
CARTA DE AUTORIZACIÓN .....	V
AGRADECIMIENTO.....	VI
DEDICATORIA .....	VII
ÍNDICE GENERAL.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
RESUMEN .....	XIV
ABSTRACT.....	XV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos .....	3
2. REVISIÓN LITERARIA. ....	4
2.1. <i>Hemileia vastatrix</i> .....	4
2.2. <i>Hemileia vastatrix</i> y <i>Coffea arabica</i> .....	4
2.3. Relación Patógeno hospedero .....	5
2.3.1. Diseminación:.....	5
2.3.2. Germinación: .....	5
2.3.3. Penetración: .....	6



2.3.4.	Colonización: .....	6
2.3.5.	Esporulación:.....	6
<b>2.4.</b>	<b>Urediniosporas .....</b>	<b>7</b>
<b>2.5.</b>	<b>Técnicas aplicadas dentro del laboratorio.....</b>	<b>7</b>
2.5.1.	Ciclos continuos de inoculación.....	7
2.5.2.	Suspensión de esporas en agua destilada .....	8
2.5.3.	Criopreservación .....	8
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1.</b>	<b>Metodología para el primer objetivo “Comprobar la eficiencia de los aceites esenciales en el control del desarrollo <i>Hemileia vastatrix</i> a partir de ensayos <i>in vivo</i>”.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2.</b>	<b>Metodología para el segundo objetivo “Evaluar la viabilidad de las esporas de <i>Hemileia vastatrix</i> sometidas a los aceites esenciales”.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3.</b>	<b>Metodología para el tercer objetivo “Determinar el efecto de los aceites esenciales sobre las esporas de <i>Hemileia vastatrix</i>”.....</b>	<b>16</b>
<b>3.4.</b>	<b>Metodología para el cuarto objetivo “Identificar los posibles daños producidos en la pared celular de las esporas de <i>Hemileia vastatrix</i> por los aceites esenciales”.....</b>	<b>17</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1.</b>	<b>Comprobar la eficiencia de los aceites esenciales en el control del desarrollo <i>Hemileia vastatrix</i> a partir de ensayos <i>in vivo</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2.</b>	<b>Evaluar la viabilidad de las esporas de <i>Hemileia vastatrix</i> sometidas a los aceites esenciales.....</b>	<b>26</b>
<b>4.3.</b>	<b>Determinar el efecto de los aceites esenciales sobre las esporas <i>Hemileia vastatrix</i>.....</b>	<b>29</b>

4.4.	Identificar los posibles daños producidos en la pared celular de las esporas de <i>Hemileia vastatrix</i> por los aceites esenciales.....	30
5.	DISCUSIÓN.....	32
6.	CONCLUSIONES.....	37
7.	RECOMENDACIONES.....	39
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	40
9.	Anexos: .....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	a) Discos de hojas de café en los cuales se aplicó la suspensión fúngica y colocados en obscuridad; b) Discos de hojas de café en los cuales se aplicó la suspensión fúngica y colocados bajo luz permanente. ....	13
Figura 2.	Incremento del área de infección de las hojas de <i>H. vastatrix</i> , en dos mediciones, a los 10 y 20 días. Barras sobre las columnas indican el error estándar. ....	19
Figura 3.	Tasa de crecimiento diario de cada uno de los aceites a concentraciones de 0,1 y 0,5 %.....	20
Figura 4.	Cálculo de $EC_{50}$ en el control del desarrollo de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	22
Figura 5.	Gráficos de las líneas de tendencia del crecimiento de los tratamientos .....	23
Figura 6.	Discos de hojas de café colocados en las cajas Petri.....	24
Figura 7.	Discos de hojas de café aplicados con aceites esenciales a dos concentraciones....	24
Figura 8.	Discos de hojas inoculados con esporas de <i>H. vastatrix</i> .....	25
Figura 9.	Porcentaje de Inhibición de esporas de <i>Hemileia vastatrix</i> sometidas a los aceites esenciales por 24 horas en portaobjetos.. ....	27
Figura 10.	Poder inhibitorio de aceites esenciales contra la germinación de esporas de <i>H. vastatrix</i> , expresado en términos de $EC_{50}$ .....	28
Figura 11.	Esporas de <i>Hemileia vastatrix</i> vistas en el microscopio .....	31

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	<b>Concentraciones de los aceites esenciales al 0.5% y 0.1% expresados en partes por millón (ppm).....</b>	<b>21</b>
<b>Tabla 2.</b>	<b>Discos de hojas de los tratamientos 24 horas antes y 24 horas después, donde se desarrolla el hongo <i>Hemileia vastatrix</i>.....</b>	<b>30</b>

**“Actividad biológica de los aceites esenciales  
contra el desarrollo y la supervivencia de  
*Hemileia vastatrix*”**

## RESUMEN

*Hemileia vastatrix*, causante de la roya del café, es considerada como la enfermedad más destructiva del cultivo y la de mayor importancia económica. Actualmente, el control químico es el más utilizado para combatir la enfermedad, pero el principal problema es la resistencia que pueden adquirir los hongos, volviendo ineficiente. El estudio de los aceites esenciales ha aumentado su interés en los últimos años, debido a que pueden ser utilizadas para el control de enfermedades en plantas. La presente investigación, se centra en encontrar aceites esenciales con un efecto controlador en el desarrollo de la roya del café. Este estudio se lo realizó a través de un screening *in vivo*, con el fin de determinar el efecto de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus citriodora* Hook), romero (*Rosmarinus officinalis* L.), cedrón (*Lippia citriodora*), mandarina (*Citrus nobilis*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum* L.), en dos concentraciones sobre *H. vastatrix*. Los ensayos planteados evaluaron el efecto de los aceites esenciales sobre el desarrollo infección en hojas de café (efecto curativo) y su efecto al estar en contacto con las esporas de *H. vastatrix* (Efecto protector); Además observando las esporas sometidas a los tratamientos, determinar la presencia daños producidos por los aceites esenciales en la pared celular de las esporas del hongo. Los aceites esenciales de mandarina, clavo de olor y cedrón mostraron ser eficientes en el control del desarrollo de *Hemileia vastatrix* sobre hojas de café, reduciendo el crecimiento de la infección y de reducir la germinación de esporas; por lo cual se concluye que estos aceites poseen tanto un efecto curativo como protector. Al observar en el microscopio las esporas, no se identificó ningún tipo de daños causados por la acción directa del aceite sobre la pared celular de las esporas, así como tampoco formas atípicas o irregulares; lo que implica que el efecto de inhibición sobre la germinación podría ser nivel metabólico; esto, fundamenta las bases en la búsqueda de moléculas orgánicas con poder inhibitorio contra la patogénesis de este fitoparásito.

**Palabras clave:** *Hemileia vastatrix*, roya, aceites esenciales, esporas, inhibición, metabólico.

## ABSTRACT

*Hemileia vastatrix*, the cause of coffee rust, is considered the most destructive disease of the crop and the most *Hemileia vastatrix* causes coffee leaf rust, it is considered as a one of the most economically important diseases destroying the crop. Nowadays, chemical control is one of the most used in the control of this disease, but the main problem is the resistance that fungus can acquire becoming inefficient. The study of essential oils has increased its interest in recent years because they can be used to control plant diseases. The present research is focused on finding hidden molecules in essential oils with a controlling effect on the biological cycle of coffee rust. This research was carried out through an in vivo screening, in order to determine the effect of the essential oils of eucalipto (*Eucalyptus citriodora* Hook), romero (*Rosmarinus officinalis* L.), cedron (*Lippia citriodora*), mandarina (*Citrus nobilis*) and clavo de olor (*Syzygium aromaticum* L.), in two concentrations on *H. vastatrix*; the essays proposed evaluated the effect of essential oils on the development of infection in coffee leaves (curative effect) and their effect in contact with *H. vastatrix* spores (protective effect); also the spores subjected to the treatments, to determine the presence of damage produced by the essential oils in the cell wall of the fungal spores. Essential oils of mandarina, clavo de olor y cedrón demonstrated to be efficient in the control of *Hemileia vastatrix* on coffee leaves, reducing the growth of the infection and germination of spores, concluding that these oils have both curative and protective effect. When the spores were observed under the microscope none type of damage was identified by the direct action of the oil on the cell wall of the spores as well as atypical or irregular shapes; which implies that the inhibition effect on germination could be at a metabolic level; this provides the basis for the research of organic molecules with an inhibitory power against the pathogenesis of this phytoparasite.

**Key words:** *Hemileia vastatrix*, rust, essential oils, urediniospores, inhibition, metabolic.

## 1. INTRODUCCIÓN

El café (*Coffea arabica* L.) es un cultivo con una vida productiva mayor a 40 años, es el segundo producto más exportado a nivel mundial y del cual, más de 20 millones de personas dependen para su subsistencia (García, 2013). Sin embargo, al igual que otros cultivos, las plantaciones de café son propensas al ataque de plagas y enfermedades (García, 2013).

Del grupo de organismos que pueden parasitar a la planta de café, el hongo *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome, causante de la roya café, se considera como la enfermedad más destructiva del cultivo y la de mayor importancia económica a nivel mundial, ya que puede llegar a provocar la muerte regresiva de ramas y árboles (American Phytopathological Society, 2011). *H. vastatrix* es considerado como parásito obligado, es decir que se alimenta de hojas vivas para su desarrollo y el único hospedero conocido es el café (Villarreyna, 2014).

En el cultivo de café, el impacto económico provocado por *H. vastatrix* no solo se refleja en la reducción de la cantidad y calidad de la producción, sino también en implementar costosas medidas para el control de la enfermedad en cultivares susceptibles (Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación, 2016). Además, está presente en todos los lugares donde se produce este cultivo (FAO, 2016), afectando a nivel mundial al 62% de los productores (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2017).

Actualmente, el control químico es el más utilizado para combatir la enfermedad ya que ha demostrado disminuir y eliminar esporas, además de mantener un bajo nivel de severidad (SAGARPA, 2018). Sin embargo, el principal problema de este control es la resistencia que pueden adquirir los hongos frente a ciertos productos, volviéndolos ineficientes (Carmona y Sautua, 2017). Esto se debe al alto potencial evolutivo que presentan los hongos, permitiéndoles



superar las estrategias de control debido a que poseen sistemas de reproducción mixtos, alto flujo de genes y un número elevado de mutaciones (Silva *et al.*, 2018). Otros problemas son que perjudican la salud humana, dañan la biodiversidad y la presencia de residuos de agroquímicos en los alimentos y en el ambiente (Pérez *et al.*, 2013).

Actualmente, la mejor estrategia para el control de la enfermedad es la utilización de cultivares resistentes, pero el hongo ha demostrado ser capaz de superar esta resistencia al poco tiempo desde su utilización (Porto *et al.*, 2019) y puede tomar años obtener nuevas variedades resistentes que mantengan la calidad y cantidad del producto. Celis *et al.* (2009) sugiere que es necesario crear un control de enfermedades utilizando productos derivados de plantas con la finalidad de reducir la dependencia de los productos químicos, obtener alimentos sanos y reducir la contaminación ambiental.

El empleo de extractos vegetales para el control de plagas y enfermedades en el marco de una agricultura sostenible, constituye una alternativa promisoriosa ya que estos contienen metabolitos secundarios que usa la planta como mecanismo de defensa (Rodríguez *et al.*, 2000). Dichos compuestos dan a los extractos naturales ciertas características, como antiapetitivos (Jiménez *et al.*, 2013) antivirales (Ordaz-Trinidad *et al.*, 2018), antimicrobianos (Solares *et al.*, 2018) o repelentes (Pino-Benítez y Valencia, 2015), los cuales pueden ser utilizados para mejorar la calidad e incrementar la producción puesto que son tóxicos para patógenos de las plantas y son fácilmente degradables (Rodríguez *et al.*, 2000). Dentro de estos bioproductos se encuentran los aceites esenciales, los cuales tendrán una composición característica dependiendo de la especie.

El estudio de los aceites esenciales ha aumentado su interés en los últimos años debido a las propiedades antibacterianas, fungicidas y antioxidantes (Argote *et al.*, 2017). Sus principales compuestos con propiedades antimicrobianas son los fenoles, flavonoides (Diaz *et al.*, 2017) y

péptidos (Bard *et al.*, 2018) que pueden ser utilizados para el control de enfermedades de plantas y animales (Diaz *et al.*, 2017).

La presente investigación, “Actividad biológica de aceites esenciales contra al desarrollo y supervivencia de *Hemileia vastatrix*”, se centra en encontrar aceites esenciales poseedores de compuestos secundarios, con un efecto controlador sobre la enfermedad y a su vez, que sean específicos para la roya del café y no afecten negativamente el medio ambiente, ni la salud humana. Este estudio es la primera fase del Proyecto de investigación “**Identificación de targets moleculares para el desarrollo de inhibidores enzimáticos en el control de la roya del café (*Hemileia vastatrix*)**”

## **Objetivos**

**Objetivo general:** Encontrar aceites esenciales activos contra el desarrollo y supervivencia de *Hemileia vastatrix* en *Coffea arabica*.

### **Objetivos específicos:**

- Comprobar la eficiencia de los aceites esenciales en el control del desarrollo *Hemileia vastatrix* a partir de ensayos *in vivo*.
- Evaluar la viabilidad de las esporas de *Hemileia vastatrix* sometidas a los aceites esenciales.
- Determinar el efecto de los aceites esenciales sobre las esporas *Hemileia vastatrix*
- Identificar los posibles daños producidos en la pared celular de las esporas de *Hemileia vastatrix* por los aceites esenciales.

## 2. REVISIÓN LITERARIA.

### 2.1. *Hemileia vastatrix*

*Hemileia vastatrix* es el hongo causante de la roya del café, es un parásito obligado que se alimenta de células vegetales vivas para poder desarrollarse (Panstruga, 2003). Actualmente se encuentran descritas más de 50 razas fisiológicas de *H. vastatrix* a nivel mundial, con diferentes cantidades de genes de virulencia (Porto *et al.*, 2019); además de que puede ser un importante alergénico debido al nivel de concentración de esporas presentes en el aire, en los países dedicados a la producción de café (Croce-Portocarrero *et al.*, 2003).

Clasificación taxonómica (Mora, 2016)

Reino: Fungi  
Phylum: Basidiomycota  
Subphylum: Puccinioniomycotina  
Clase: Pucciniomycetes  
Orden: Pucciniales  
Género: *Hemileia*  
Especie: *Hemileia vastatrix* Berk & Ber

### 2.2. *Hemileia vastatrix* y *Coffea arabica*

La roya del café causada por el hongo *Hemileia vastatrix* es una de las enfermedades foliares más importantes de las plantaciones de café en todo el mundo (Porto *et al.*, 2019). Avelino y Rivas (2013) afirman que “la intensidad de la epidemia depende de las interacciones entre el hospedero, el patógeno, el ambiente y el manejo”.

La principal fuente de inóculo para que se desarrolle la enfermedad, es la presencia de residuos de cosechas anteriores infectadas, a través de lesiones necrosadas o latentes aún presentes en la defoliación después de la cosecha (Avelino y Rivas, 2013). El principal problema, según Agrios (1998), es la defoliación de los cafetales por causa de la roya, que puede provocar la muerte

progresiva de las ramas, ocasionando una pérdida de rendimiento de hasta el 70% de la producción del cultivo de café (Deepak, 2012). Avelino y Rivas (2013) afirman que la epidemia del 2012 en América Central se debió a que las variedades plantadas eran susceptibles a la enfermedad de la roya afectando al 20% de la producción. Posteriormente se comprobó que las pérdidas eran aún mayores luego de un año de haberse presentado la epidemia (Cerda *et al.*, 2017).

### **2.3. Relación Patógeno hospedero**

El ciclo de vida de la roya del café consta de cinco etapas:

#### **2.3.1. Diseminación:**

La diseminación de la roya de café la realiza a través de sus esporas asexuales llamadas urediniosporas que tienen un tamaño de 30 micras de largo y 20 de ancho (Rivillas *et al.*, 2011). La activación de la diseminación se da por distintos factores, principalmente la lluvia, el viento y las personas (Silva *et al.*, 1999). El agua resulta un método efectivo para controlar la diseminación ya que se ha comprobado que puede lavar hasta el 30% de urediniosporas (Branes, 2016).

#### **2.3.2. Germinación:**

La infección provocada por *H. vastatrix* en el café, comienza en las hojas cuando sus esporas germinan en el envés (Porto *et al.*, 2019). La etapa de germinación es el inicio del proceso infeccioso en la planta. En esta etapa, *H. vastatrix* necesita de condiciones ambientales óptimas de: temperatura de 22 °C, 24 a 48 horas de oscuridad y disponibilidad de agua durante la etapa de penetración. Cuando las uredosporas germinan, forman tubos germinativos en un periodo de 6 a 8 horas, estos tubos germinativos cuentan con puntas en donde se originan los apresorios, los mismos que permiten ingresar al estoma de la planta (Avelino y Rivas, 2013)

### **2.3.3. Penetración:**

Las uredosporas germinadas, penetran en el estoma de la hoja hasta la cámara subestomática (Vieira *et al.*, 2012) a través de los apresorios, que son hifas afiladas (Porto *et al.*, 2019). Las hojas jóvenes son menos propensas a la penetración de los apresorios, debido a que los estomas en estas son incompletos (Kushalappa, 1989). Una vez que se produzca esta fase, se establece una relación trófica entre el patógeno y el hospedero (Avelino *et al.*, 1999).

### **2.3.4. Colonización:**

Es un proceso intercelular (Rivillas, 2011). La propagación es mediante la formación y crecimiento de hifas (Porto *et al.*, 2019). Las hifas forman los haustorios los cuales se encargan de extraer los nutrientes de las células vivas de la hoja (Rivillas, 2011). *H. vastatrix* establece su colonización parasitaria mediante la secreción de proteínas efectoras que modifican la estructura y función de las células huésped (Porto *et al.*, 2019). Esta etapa se caracteriza porque comienza a presentarse los primeros signos de la enfermedad en el envés de la hoja donde se observan manchas amarillentas (Avelino *et al.*, 1999).

### **2.3.5. Esporulación:**

Cuando las hifas invaden la cámara subestomática se comienza a producir agregados de células esporógenas, estas salen por la apertura del estoma y forman el esporóforo, estructura donde se lleva a cabo la producción de urediniosporas (Avelino *et al.*, 1999). El agregado a nivel del estoma se conoce como soros (Rayner, 1972). Un soro puede producir en 3 meses 400 000 urediniosporas las cuales darán inicio a un nuevo ciclo infeccioso (Avelino *et al.*, 1999).

El periodo transcurrido entre el inicio de la germinación y la esporulación se denomina periodo de latencia (Avelino *et al.*, 1999). Este ciclo infeccioso se puede desarrollar varias veces en la misma hoja (Avelino y Rivas, 2013).

#### **2.4. Urediniosporas**

Las urediniosporas son las esporas asexuales del hongo, estas presentan paredes lisas y paredes equinuladas con espinas cónicas sobre el estoma de hoja, típico de las esporas del género *Hemileia* (Carvalho *et al.*, 2011; SENASICA, 2018). Las urediniosporas son responsables de la dispersión, supervivencia y estructura de la infección del patógeno (Deepak, 2012). Dentro de estas esporas asexuales se produce una fase de cariogamia y meiosis que genera una recombinación de los genes, sumado a su alta tasa de mutación; explica por qué aparecen tan rápido nuevas razas de roya (Carvalho *et al.*, 2011). Cultivo de *H. vastatrix in-vitro*

*H. vastatrix* es un patógeno que no puede cultivarse *in-vitro* (Brooks, 2018), sin embargo, se puede cultivar a través de aislamientos mediante ciclos continuos de inoculaciones en plantas susceptibles, pero esto puede afectar las características fenotípicas y genotípicas presentes en las poblaciones silvestres (Escobar y Cristancho, 2007). Además, seguir cultivando la roya del café en plantas vivas no sólo requiere mucha mano de obra, sino que también es costoso (Brooks, 2018).

#### **2.5. Técnicas aplicadas dentro del laboratorio**

Debido a que *H. vastatrix* es un parásito obligado, se han desarrollado varias técnicas para estudiarlo dentro de los laboratorios, entre las cuales se señalan:

##### ***2.5.1. Ciclos continuos de inoculación***

Consiste en obtener urediniosporas de *H. vastatrix* haciendo frecuentemente inoculaciones *in vivo* de plantas presentes en invernaderos u hojas de café sometidas a temperaturas y humedad

controladas, pero aumenta el riesgo de contaminación y no garantiza la estabilidad genética a largo plazo (Escobar y Cristancho, 2007).

### **2.5.2. Suspensión de esporas en agua destilada**

Esta técnica consiste en colocar esporas del hongo en recipientes previamente esterilizados con 1 ml de agua destilada, este procedimiento se debe realizar en una cámara de extracción de vapores para evitar contaminación, con un periodo de utilidad de 24 horas (Gutiérrez *et al.*, 2019).

### **2.5.3. Criopreservación**

Es una técnica que permite el almacenamiento a corto y largo plazo de microorganismos importantes (Brooks, 2018), y consiste en someter a bajas temperaturas los microorganismos deteniendo su metabolismo y sus funciones vitales (Gutiérrez *et al.*, 2019). Según Brooks (2018), en el almacenamiento de urediniosporas, temperaturas menores a  $-20^{\circ}\text{C}$ , la congelación afecta la viabilidad de las esporas.

## **2.6. Aceites esenciales y sus compuestos antifúngicos**

Ya se ha demostrado con anterioridad, que los compuestos presentes dentro los aceites esenciales tienden propiedades antifúngicas; han sido poco usados debido a que, en la industria de la agricultura, resulta más eficaz la producción de compuestos sintéticos, mismos que afectan negativamente la salud y el ambiente. Por tal razón el estudio y uso de los aceites esenciales para el control de hongos fitopatógenos se ha intensificado los últimos años (Pérez-Soto *et al.*, 2015).

### **2.6.1. Métodos de extracción.**

Los métodos que se usan para la extracción de aceites esenciales son: destilación por arrastre de vapor, separa los compuestos mediante la inyección de vapor de agua; extracción con disolventes volátiles, muestras secas de plantas se ponen en contacto con disolventes orgánicos (Peredo y López, 2009).

### **2.6.2. Principios activos.**

Dentro de los aceites esenciales se encuentran una gran variedad de compuestos antifúngicos como lo son: terpenoides, iridoides, sesquiterpenos, saponinas, compuestos azufrados o nitrogenados (alcaloides, aminas, amidas), alifáticos y aromáticos (fenoles, flavonoides, estilbenos, bibenziles, xantonas y benzoquinonas), sesquiterpénicas, cumarinas, indoles, bibenzyles, derivados del ácido antranílico, estilbenos, flavanonas, diterpenos, antocianidinas, chromonas, isoflavonas, isoflavonoides, alcaloides, fenoles, antroquinonas, fenilpropanoides y sesquiterpenos (Montes, 2009).

### **2.6.3. Uso de aceites esenciales con actividad fungicida.**

Actualmente existes un gran número de investigaciones destinadas a comprobar las propiedades fúngicas que poseen los aceites esenciales para el control de enfermedades dentro de los cultivos, de las cuales se puede citar:

Alejandro et al. (2014) evaluaron extractos y aceites esenciales del orégano de monte (*Lippia origanoides*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) logrando disminuir el crecimiento micelial evaluados en condiciones in vitro.

Para controlar los efectos producidos por *Fusarium oxysporum*, Rodríguez Pedroso et al. (2012) evaluaron la actividad antifúngica de extractos hidroalcohólicos y acuosos de *Acacia farnesiana*, mostrando más de un 90 % de inhibición del crecimiento micelial desde la primera evaluación.

Así mismo, contra *F. oxysporum*, Ocaña (2013) probaron extractos de gobernadora (*Larrea tridentata*), eucalipto (*Eucalyptus sp*) y damiana (*Turnera difusa*); donde *L. tridentata* presentó el mejor efecto seguido de *Eucalyptus. sp*.

Para el control de antracnosis de la papaya en postcosecha causada por *Colletotrichum gloesporoides*, Valenzuela et al. (2013) evaluaron la actividad antifúngica de extractos de ajo *Allium sativum* y canela *Cinnamomum zeylanicum* que mostraron efecto fungicida para supresión de crecimiento micelial, inhibición de germinación y esporulación del hongo.



Por otro lado, Mishra y Moses (2018) evaluaron la actividad antifúngica de extractos de hojas de *Senna obtusifolia* y *Senna tora* contra *Alternaria helianthii*, *Pythium aphanidermatum*, *F. oxysporum* y *A. niger*, siendo *S. obtusifolia* la que mostró una mejor eficacia antifúngica.

Para el control de sigatoka *Micosphaerella fijiensis* en banano, Morales (2017) evaluó la aplicación in vitro y en campo de extractos de hojas de moringa *Moringa oleífera* llegando a disminuir el crecimiento micelial del hongo.

Estas y otras investigaciones son prueba del potencial que tiene los aceites esenciales para combatir enfermedades causadas por hongos fitopatógenos dentro de los cultivos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Análisis Químico de la Universidad Nacional de Loja, la ciudad tiene temperaturas en un rango de 10 a 22 °C y una altitud que oscila entre 2 174 msnm (Paladines, 2013).

Los aceites esenciales utilizados para la evaluación de los ensayos, fueron proporcionados por el Laboratorio del Departamento de Química y Ciencias Exactas de la Universidad Técnica Particular de Loja.

Los aceites esenciales evaluados fueron de: eucalipto (*Eucalyptus citriodora* Hook), romero (*Salvia rosmarinus* L), cedrón (*Lippia citriodora* L'Hér), mandarina (*Citrus nobilis* Lour) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum* L.).

#### **3.1. Metodología para el primer objetivo “Comprobar la eficiencia de los aceites esenciales en el control del desarrollo *Hemileia vastatrix* a partir de ensayos *in vivo*”.**

Este objetivo constó de dos fases: de campo y laboratorio.

Para la fase de campo, 6 hojas de una planta de café, infectada con roya, fueron seleccionadas en la Finca San José ubicada en la parroquia el Ingenio cantón Espíndola provincia de Loja, cuyo nivel de severidad se encontraba entre 2 y 5 % según la escala Sinavef-Lanref (2015).

Se evaluaron 5 tratamientos, los que constituyeron los cinco aceites esenciales, disueltos a dos concentraciones: 0,1 y 0,5 %. Además de un tratamiento control, en el que se utilizó agua destilada en lugar de aceite esencial.

La fase de campo comprendió un periodo de evaluación de 20 días, en la cual se realizaron dos aplicaciones de los tratamientos: la primera al momento de seleccionar las hojas, y la segunda, 10 días después. Para la evaluación del ensayo, se fotografió cada una de las hojas a los 0, 10 y 20 días desde la primera aplicación, imágenes que fueron utilizadas para determinar el crecimiento

de la enfermedad con respecto al tiempo. El tratamiento control utilizado como referencia, permitió establecer si existe una acción de control sobre la enfermedad, ejercida por los aceites esenciales.

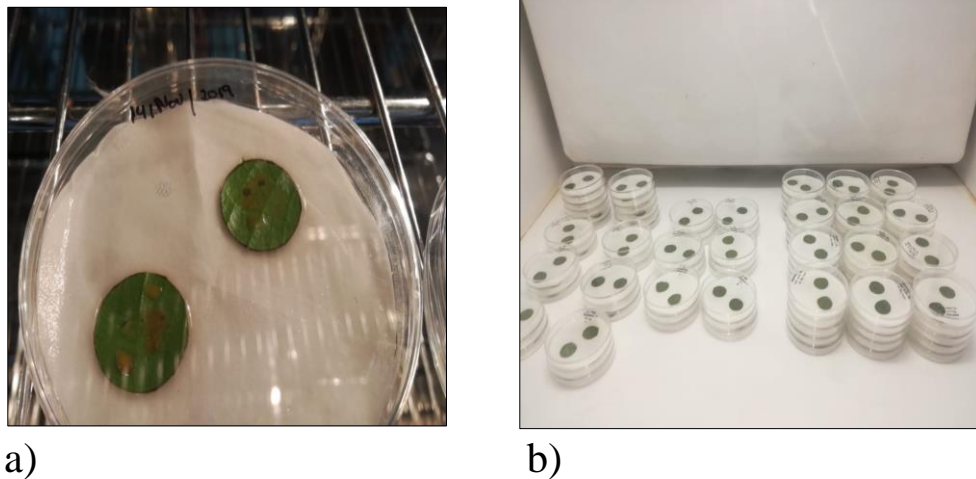
En cada fotografía tomada aparece papel milimétrico debajo de las hojas seleccionadas para el ensayo, mismo que servirá de escala para calibrar el programa “imagen J” permitiendo calcular de manera precisa cual es el área de infección que presenta cada tratamiento a los 0, 10 y 20 con lo cual se puede conocer el incremento del crecimiento para cada uno de los tratamientos a los 10 y 20 días después de iniciado el ensayo.

En el laboratorio, de las hojas infectadas se recolectaron esporas, específicamente esporas de *H. vastatrix*, utilizando un bisturí esterilizado, posteriormente las esporas fueron colocadas en una suspensión de agua destilada estéril (Eskes A, 1982). De esta suspensión se tomó 1 ml para realizar un conteo en la cámara de Neubauer y así conocer el número de esporas de la suspensión, con este dato se procedió a preparar una segunda disolución en la cual se obtuvo una concentración de  $1 \times 10^6$ , que es requerida para infectar los discos de hojas de café (Silva-Castro *et al.*, 2018).

Posteriormente, las hojas sanas fueron esterilizadas, sumergiéndolas en una solución de: hipoclorito al 0,5%, alcohol al 70% y agua destilada por un minuto en cada una de estas sustancias. Secas las hojas, se cortaron discos 1,5 cm de diámetro (Costa *et al.*, 1978) que fueron colocados en cajas de Petri, las cuales contenían papel filtro humedecido con agua destilada estéril, cuya función era mantener la humedad de dicho ambiente y por ende, mantener fisiológicamente activos los discos de hojas de café (Eskes A, 1982).

Con los discos y la suspensión de esporas preparadas, se procedió a evaluar la fase de laboratorio, misma que comprendió de dos controles: un positivo y un negativo, además de un blanco, establecidos como complemento de la fase de campo.

El control positivo, constó de 3 repeticiones y consistió en utilizar la suspensión fúngica para infectar los discos de hojas, colocando 40  $\mu\text{L}$  de suspensión en el envés de cada disco, luego estos fueron sometidos a 6 horas de oscuridad para favorecer la germinación (Deepak *et al.*, 2012), seguidamente fueron colocadas en luz continua para ayudar a el crecimiento del hongo (figura 1).



**Figura 1.** a) Discos de hojas de café en los cuales se aplicó la suspensión fúngica y colocados en oscuridad; b) Discos de hojas de café en los cuales se aplicó la suspensión fúngica y colocados bajo luz permanente.

En el control negativo, de los 10 tratamientos (5 aceites a dos concentraciones), cada uno con tres repeticiones, se tomaron 40  $\mu\text{L}$  y se colocaron, sobre los discos con el fin de observar si estos causaban daño al estar en contacto con el tejido de la hoja.

En el blanco, se evaluó, cuánto tiempo soportan los discos, al ser colocados en cajas de Petri con papel filtro humedecido, manteniendo su integridad y se determinó si el método de esterilización de las hojas es el correcto, se colocaron 3 repeticiones.

Para analizar los datos del ensayo terminado, primero, se procedió a calcular el incremento del crecimiento de la infección, tomando como referencia el área infectada ( $\text{mm}^2$ ), se utilizó las

fotografías tomadas de las hojas infectadas y con el software “Imagen J”, se determinó el área infectada a los 10 y 20 días después de aplicación de los tratamientos, debido a que el crecimiento del área infectada en los tratamientos antes de los 10 días, era muy pequeña y poco distinguible.

A partir de los resultados obtenidos sobre el área infectada, se realizó un análisis de varianza con el software “InfoStat” aplicando un diseño completamente al azar bifactorial (DCA), mismo que se expresa a través del modelo lineal (ecuación 1), lo que permitió determinar si alguno de los tratamientos es significativo, y posterior una prueba de comparación múltiple “Tukey”, encontrar los mejores tratamientos en el control del desarrollo de *H. vastatrix* (Tabla 1).

Ecuación 1: 
$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde,  $Y_{ijk}$ : variable dependiente,  $\mu$ : es media general común a todos los tratamientos  
 $A_i$ : el efecto del factor A (Aceite),  $B_j$ : el efecto del factor B (Concentración),  $AB_{ij}$ : el efecto de la interacción entre el factor A y el factor b  $\epsilon_{ijk}$ : representa la variabilidad (error)

Con el fin de detallar y observar de mejor manera el efecto de los aceites esenciales, se calculó el poder inhibitorio que poseen, con respecto al crecimiento del área infectada por *H. vastatrix*, en función del  $EC_{50}$ , que es la concentración del aceite para reducir el crecimiento normal de la infección al 50%. Los cálculos del  $EC_{50}$  se realizaron con el software GraphPad Prism® (version 9.0, La Jolla, CA) que utiliza la ecuación 2, con una correlación no lineal, en donde, en el caso de  $EC_{50}$  se graficará el área de infección en  $mm^2$  vs la concentración del aceite esencial.

Ecuación 2: 
$$v = V / (1 + (I / EC_{50}))$$

Donde,  $v$ : Crecimiento medido del área infecta;  $V$ : Crecimiento máxima aparente del área afectada en el inhibidor;  $I$ : concentración del inhibidor;  $ID_{50}$ : dosis inhibitoria del 50%

Además, con el mismo software, se crearon gráficos que muestran las tendencias de crecimiento del control y los tratamientos, a través de una interpolación de una curva con un modelo Pade (1,1) approximant, que utiliza la ecuación 3 y gráfica la propagación del área infectada en mm<sup>2</sup> contra los días después de la aplicación de los tratamientos.

Ecuación 3: 
$$L/M = P_L(x)/Q_M(x)$$

Donde  $P_L(x)$  es un polinomio del grado más alto de  $L$  y  $Q_M(x)$  es un polinomio del grado más alto de  $M$ .

### **3.2. Metodología para el segundo objetivo “Evaluar la viabilidad de las esporas de *Hemileia vastatrix* sometidas a los aceites esenciales”**

Para determinar si los aceites esenciales afectan la viabilidad de las esporas de *H. vastatrix*, se colocó en un portaobjetos (Silva-Castro *et al.*, 2018) 10 µL de suspensión de esporas y 10 µL de cada uno de los tratamientos (los aceites en las dos concentraciones) y un tratamiento control: que en lugar del aceite se colocó agua destilada.

Los portaobjetos con la suspensión y los aceites, fueron colocados en cajas de Petri que contenían 3 ml de agua destilada para crear un ambiente húmedo, preparadas las cajas con los portaobjetos, fueron llevadas a oscuridad por 24 horas (Deepak *et al.*, 2012), luego de ello, se realizó un conteo del número de esporas que germinaron durante ese tiempo.

Con el número de esporas geminadas de cada tratamiento, al igual que en el control del desarrollo, para analizar los datos, se realizó un análisis de varianza con el software “InfoStat” aplicando un diseño completamente al azar (DCA) bifactorial con la fórmula 1, seguido de una prueba de comparación múltiple “Duncan” y se calculó el EC50 con el software GraphPad Prism®. Cada uno de los tratamientos constó de 3 repeticiones biológicas. Finalmente se determinó y grafico el porcentaje de inhibición con la siguiente ecuación.

Ecuación 4: **% Inhibición de la germinación=  $(c - x / c) \times 100$**

Donde,  $c =$  esporas germinadas en el control y  $x =$  esporas germinadas en los tratamientos (Silva-Castro *et al.*,2018).

### **3.3. Metodología para el tercer objetivo “Determinar el efecto de los aceites esenciales sobre las esporas de *Hemileia vastatrix*”**

Para la determinación del efecto de los aceites esenciales sobre las esporas de *H. vastatrix*, discos de 1,5 cm de diámetro de hojas sanas de café, fueron colocados en cajas de Petri con papel filtro humedecido con agua destilada. Los discos fueron inoculados con 40  $\mu$ L de suspensión fúngica (preparada en el primer objetivo) de esporas de *H. vastatrix*. Las cajas de Petri con los discos inoculados se colocaron bajo oscuridad durante 6 horas y luego a luz continua durante las 24 horas del día (Deepak *et al.*, 2012).

Se aplicaron 40  $\mu$ L de los aceites esenciales a dos concentraciones: 0,5 % y 0,1 %; sobre los discos de hojas de café.

Se establecieron 3 tratamientos para cada concentración de cada aceite esencial, con 3 réplicas cada uno. Los tratamientos fueron: el control, discos de hojas de café inoculados con la suspensión fúngica (Silva-Castro *et al.*, 2018) 24 horas antes y 24 horas después de la aplicación de los aceites diluidos a dos concentraciones, discos de hojas de café inoculados con la suspensión fúngica 24 horas después de la aplicación de los aceites diluidos a dos concentraciones.

Los aceites esenciales pueden tener dos tipos de efecto; preventivo, si evita que se desarrolle la enfermedad y curativo si una vez ya desarrollada la enfermedad, detiene su crecimiento.

Los resultados se basaron en la observación del desarrollo de la enfermedad en los discos de hojas. En el caso de que la enfermedad no se desarrolle en los tratamientos de 24 horas antes,

se estaría hablando de un efecto preventivo, y en el caso de que la enfermedad no se desarrolle en los tratamientos de 24 horas después, sería un efecto curativo. También existe la posibilidad de que los aceites esenciales a estas concentraciones no presenten un efecto, si la enfermedad se desarrolla en los 3 tratamientos: control, 24 horas antes y 24 horas después.

#### **3.4. Metodología para el cuarto objetivo “Identificar los posibles daños producidos en la pared celular de las esporas de *Hemileia vastatrix* por los aceites esenciales”.**

La metodología empleada es similar a la utilizada en el objetivo 2; se colocó en un portaobjetos (Silva-Castro *et al.*, 2018) 10  $\mu$ L de suspensión de esporas y 10  $\mu$ L de cada uno de los tratamientos (los aceites en las dos concentraciones). Los portaobjetos con la suspensión y los aceites, fueron colocados en cajas de Petri que contenían 3 ml de agua destilada, preparadas las cajas con los portaobjetos, fueron llevadas a oscuridad por 24 horas (Deepak *et al.*, 2012), luego de ello, se evaluó la existencia de daños producidos en la pared celular del hongo a través de un microscopio óptico (Mena *et al.*, 2015).



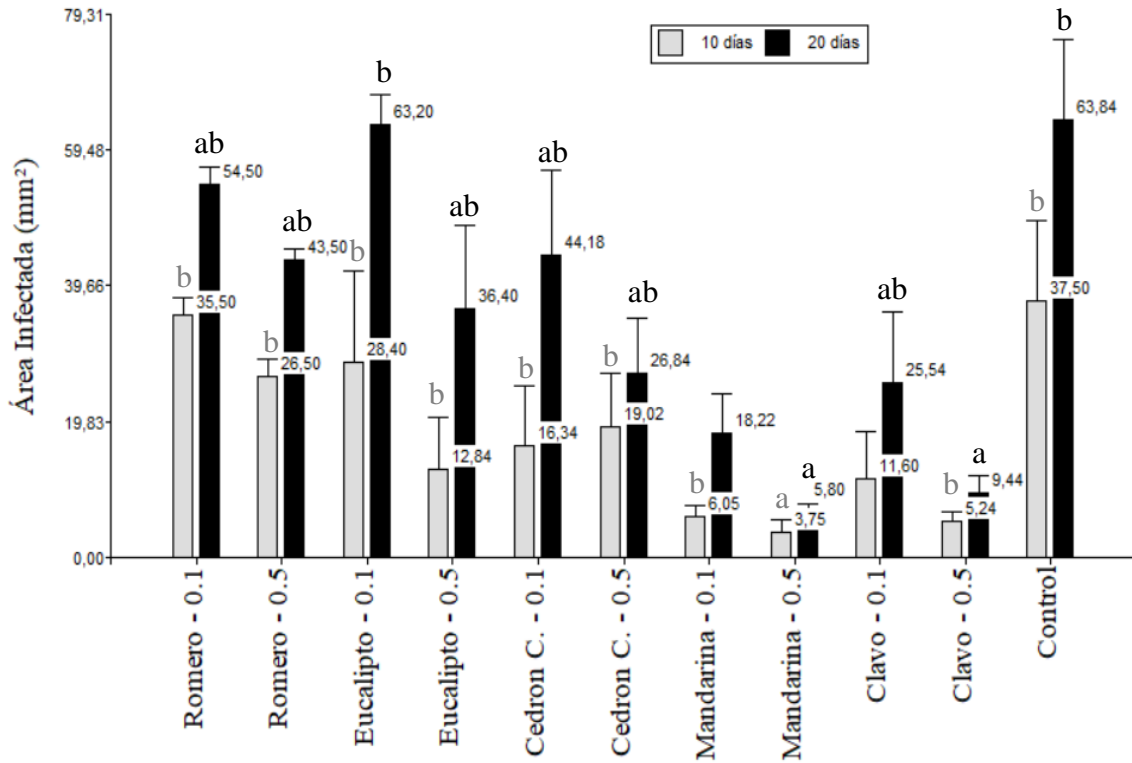
#### **4. RESULTADOS**

##### **4.1. Comprobar la eficiencia de los aceites esenciales en el control del desarrollo**

##### ***Hemileia vastatrix* a partir de ensayos *in vivo*.**

En la fase de campo, al aplicar los aceites esenciales a dos concentraciones en el desarrollo de enfermedad, se observó que algunos de los tratamientos eran similares a la muestra control, mientras que otros presentaron valores variados de inhibición (Figura 2), por lo cual se realizó un análisis de varianza con un diseño completamente al azar bifactorial (DCA) para los 10 y 20 días después de la aplicación, el análisis de varianza dio a entender que los tratamientos eran significativos, al tener un *p-valor* de 0,025 para los 10 días y de 0,0004 para los 20 días, por lo cual se procedió a realizar dos pruebas de comparación múltiple (Tukey) y determinar si son significativos o no. Cabe recalcar que no se encontró interacción entre los aceites esenciales y la concentración.

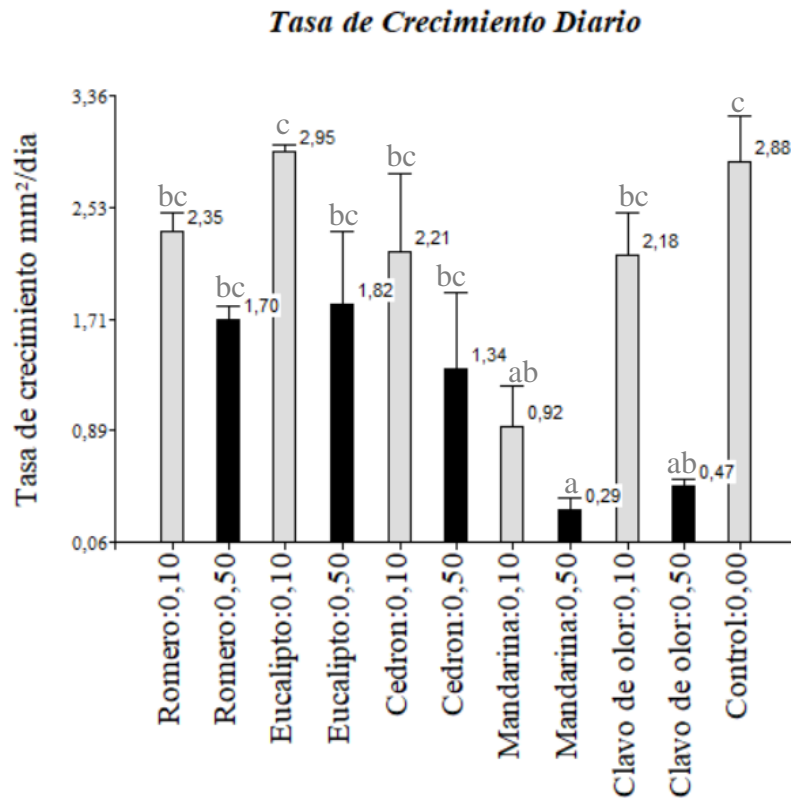
### *Incremento del Área Infectada*



*Figura 2. Incremento del área de infección de las hojas de *H. vastatrix*, en dos mediciones, a los 10 y 20 días. Barras sobre las columnas indican el error estándar.*

La prueba de comparación múltiple de Tukey se realizó con los datos del crecimiento de la infección a 10 y 20 días después del inicio del ensayo. En la prueba de Tukey a los 10 días después de la aplicación, únicamente el tratamiento del aceite mandarina al 0,5% fue diferente al tratamiento control. En cambio, en la prueba de Tukey a los 20 días, además del aceite de mandarina, el aceite de clavo de olor al 0,5% difiere del tratamiento control. El aceite de mandarina destaca por los resultados en el control del desarrollo de *H. vastatrix*, seguido del clavo de olor; en cambio, el aceite de cedrón mostró ser menos eficientes que estos dos y por último los aceites de romero y eucalipto en ninguna de las dos concentraciones logran llegar a inhibir 50% del desarrollo normal de *H. vastatrix* (Tratamiento control), por lo cual son los descartados para el cálculo del

EC<sub>50</sub>. El tratamiento control nos permitió dilucidar la tasa de crecimiento regular de la roya en la planta, dando como resultado una tasa de crecimiento diario de 2.88 mm<sup>2</sup> y según el aceite esencial aplicado sobre las hojas de café, el valor de tasa de crecimiento cambia (Figura3), resaltando el valor del aceite de mandarina al 0.5%. de 0.29 mm<sup>2</sup> que es 10 veces menor que el del control. Con los datos de la tasa de crecimiento diario se obtuvo un *p*-valor de 0.0018 al realizar un análisis de varianza con diseño DCA bifactorial razón por la cual, se procedió con una prueba de comparación múltiple de Tukey (Figura 3).



**Figura 3.** Tasa de crecimiento diario de cada uno de los aceites a concentraciones de 0,1 y 0,5 %.

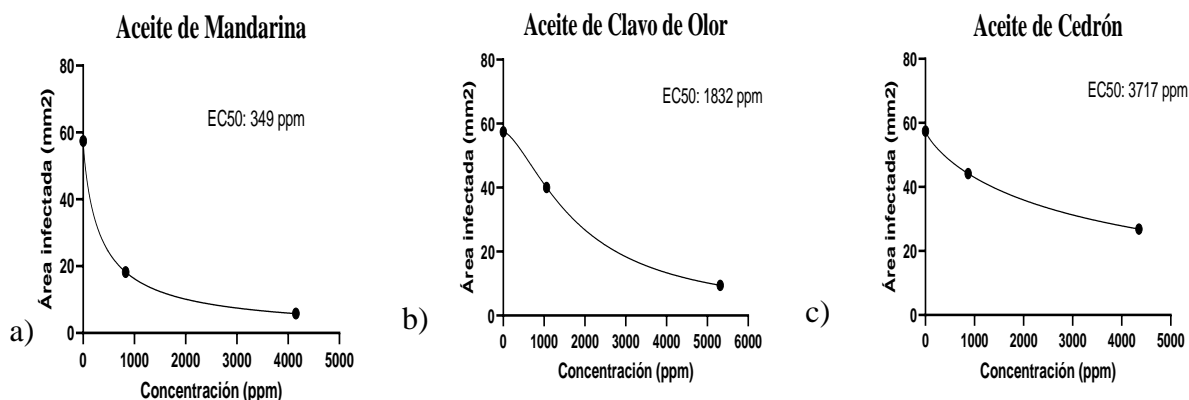
Tomando en cuenta los resultados anteriormente mencionados, se procedió a calcular el EC<sub>50</sub> y graficar líneas de tendencias que representan el crecimiento de *H. vastatrix*, de los tratamientos a través de la interpolación de curvas.

Antes de proceder a realizar los cálculos, se efectuó una conversión (tabla 1); en vista de que las concentraciones expresadas en porcentaje no reflejan de la mejor manera la cantidad exacta de aceite esencial que se utiliza; por lo cual, se trabajó y analizó el EC<sub>50</sub> con los aceites expresados en partes por millón (ppm), siendo las unidades utilizadas generalmente en estos tipos de trabajos.

	<b>Mandarina</b>	<b>Clavo de Olor</b>	<b>Cedrón</b>	<b>Eucalipto</b>	<b>Romero</b>
<b>Concentración al 0.5%</b>	4150 ppm	5315 ppm	4352 ppm	4600 ppm	4636 ppm
<b>Concentración al 0.1%</b>	830 ppm	1063 ppm	870 ppm	920 ppm	937 ppm

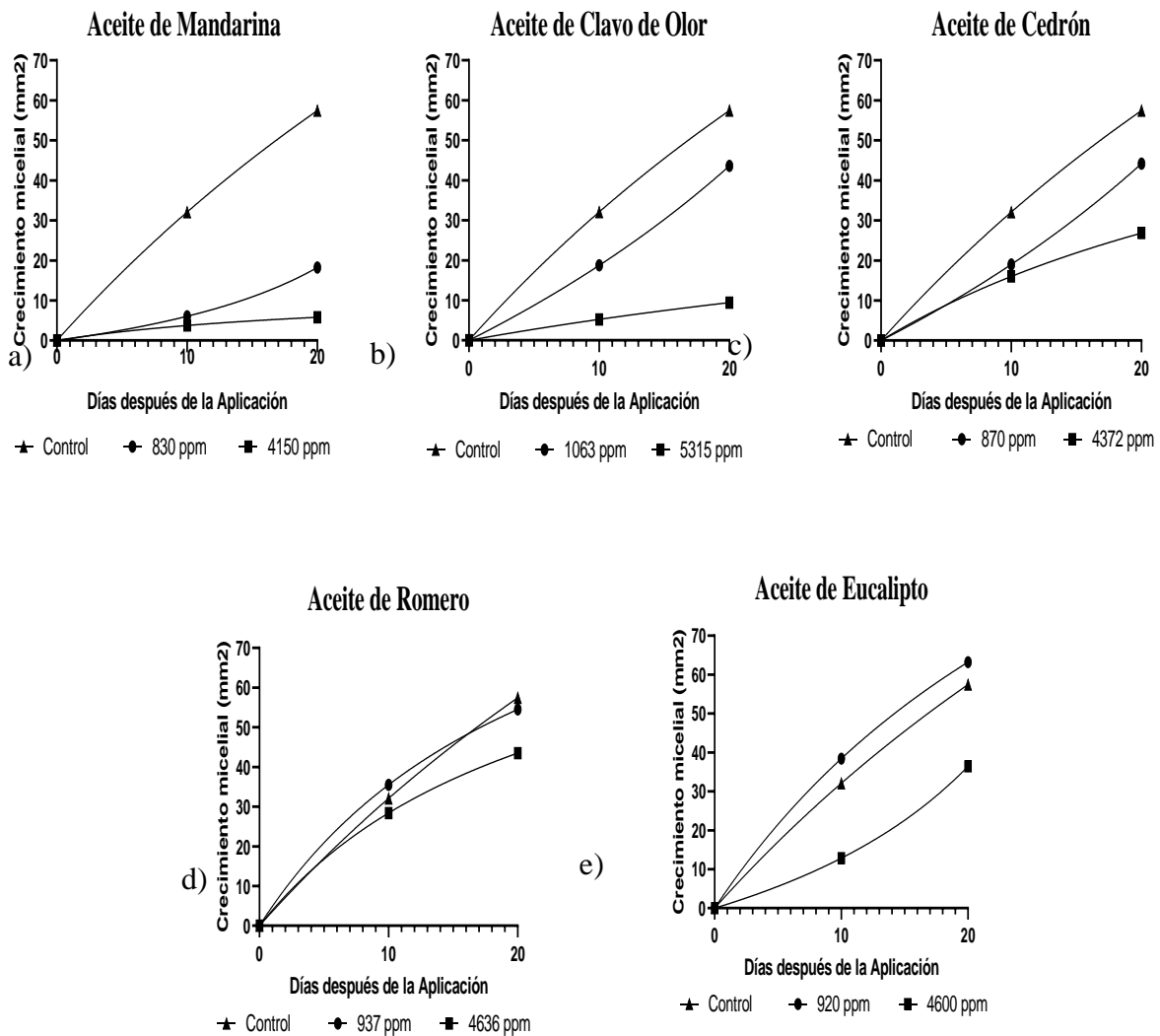
*Tabla 1. Concentraciones de los aceites esenciales al 0.5% y 0.1% expresados en partes por millón (ppm)*

En el cálculo del EC<sub>50</sub> se encontró que en el aceite de mandarina fue de 349 ppm mientras que el de Clavo de olor de 1832 ppm y en el cedrón de 3717 ppm; esto da a entender que el aceite de mandarina es más eficaz en el control del desarrollo de la infección del hongo, en relaciona las concentraciones utilizadas. Las gráficas nos muestran claramente que en la mandarina ocurre una caída rápida en el tamaño del área de infección entre las concentraciones de 0 a 1000 ppm en cambio en el clavo de olor y cedrón, el tamaño de la infección va disminuyendo conforme se incrementa la concentración.



**Figura 4.** Cálculo de  $EC_{50}$  en el control del desarrollo de *Hemileia vastatrix*, en la hoja de café a) Aceite mandarina b) Aceite Clavo de olor c) Aceite Cedrón

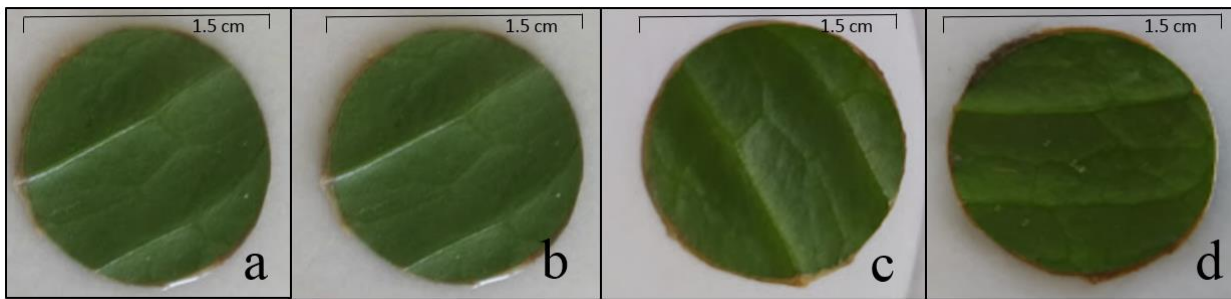
Al graficar la línea de tendencia que siguen el crecimiento utilizando los datos del control, se puede inferir como es el crecimiento normal de *H. vastatrix* y a la vez permite poder comparar con las líneas de tendencia que siguen el crecimiento de los tratamientos días después de aplicación del aceite esencial. En la Figura 4-a, referente al efecto del aceite de mandarina sobre el crecimiento de *Hemileia vastatrix*, en ambas concentraciones las líneas de tendencias se encuentran con valores relativamente pequeños en comparación con el tratamiento control; otro caso con valores similares el en la Figura 4-b, grafica del tratamiento de aceite de clavo de olor, en el resto de graficas de la Figura 4, las líneas de tendencia no difieren en gran medida de la línea de tendencia del crecimiento normas del hongo (tratamiento control).



**Figura 5.** Gráficos de las líneas de tendencia del crecimiento de los tratamientos. a) Aceite de mandarina b) Aceite de clavo de olor c) Aceite de cedrón d) Aceite de romero e) Aceite de eucalipto

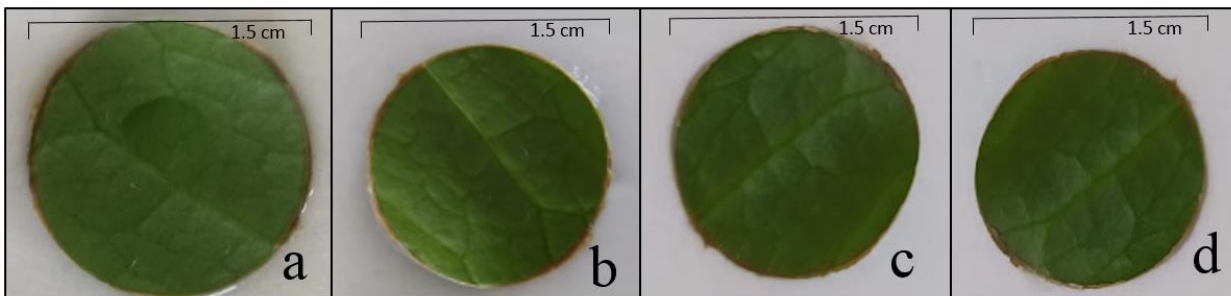
En la fase de laboratorio establecida como complemento a los resultados anteriores, misma que consistía en trabajar con metodologías de la infección y desarrollo de *H. vastatrix*, sobre discos de hojas de café en cajas Petri. Además, estableciendo un control positivo (disco de hoja infectado), un control negativo (disco hoja sin infectar y sin aceite) y un blanco (disco con aceite esencial) a evaluar dentro de condiciones controladas.

En los controles negativos se determinó que un disco de hoja de café, puede llegar a mantenerse en un estado fisiológico funcional por un periodo de 40 días (figura 6), al ser colocados en cajas Petri con papel filtro, manteniendo la humedad con agua destilada. Además, al no presentarse ningún síntoma sobre la superficie de los discos, se entiende que el método de esterilización fue efectivo, ya que no se desarrolló ningún tipo de hongo durante el tiempo del ensayo.



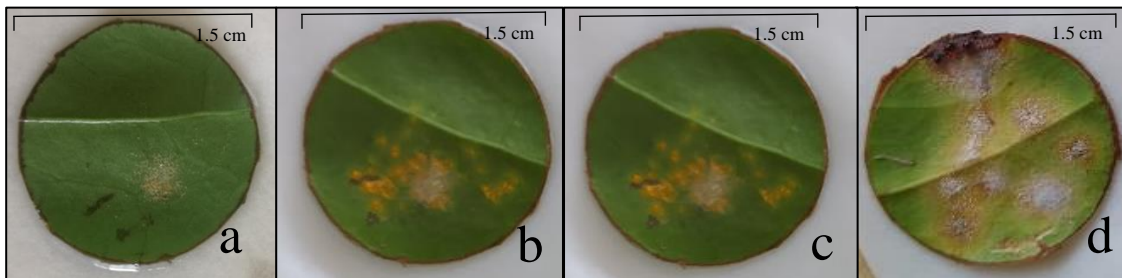
**Figura 6.** Discos de hojas de café colocados en las cajas Petri: a) A los 4 días; b) a los 14 días; c) 32 días; d) a los 47 días.

En los tratamientos blancos en cambio se determina que ninguno de los aceites esenciales en estas concentraciones 0.5% y 0.1% causa un daño en la estructura al disco de la hoja de café (figura 7, a y b) ya que durante el periodo de evolución este tratamiento no mostró ningún tipo de alteración.



**Figura 7.** Discos de hojas de café aplicados con aceites esenciales a dos concentraciones: a) A los 4 días; b) A los 14 días; c) 32 días; d) A los 47 días.

Como último tenemos que los tratamientos de los controles positivos, se logran infectar al colocar 40µL de suspensión de esporas a una concentración  $1 \times 10^6$ , presentado los primeros síntomas a los 14 desde la inoculación, este método fue evaluó durante 47 días donde se observó los primeros daños en los discos de las hojas (figura 8, d), en el cual el hongo de *H. vastatrix* fue creciendo paulatinamente por lo cual, se puede afirmar que utilizando este método se podría realizar ensayos con la roya del café dentro del laboratorio por periodos de 40 días. Además de *H. vastatrix*, también se desarrolló *Verticillium spp.* A partir de la suspensión de esporas, estos dos hongos crecieron mutuamente durante el periodo de evaluación.



**Figura 8.** Discos de hojas inoculados con esporas de *H. vastatrix*: a) A los 4 días; b) A los 14 días; c) 32 días; d) A los 47 días.

En base a los resultados obtenidos, se observa que los aceites esenciales de mandarina, clavo de olor y cedrón; poseen la capacidad de afectar el desarrollo y la supervivencia de *H. vastatrix*.

En el análisis del efecto de los aceites sobre el control del desarrollo de *H. vastatrix* sobre hojas de café, se determinó que el aceite mandarina y clavo de olor presentan porcentajes elevados en la reducción del crecimiento de la infección sobre el tejido de las hojas, mientras que el aceite de cedrón tiene un porcentaje menor; en cambio los resultados de los aceites de romero y eucalipto son similares al tratamiento control, denotando una

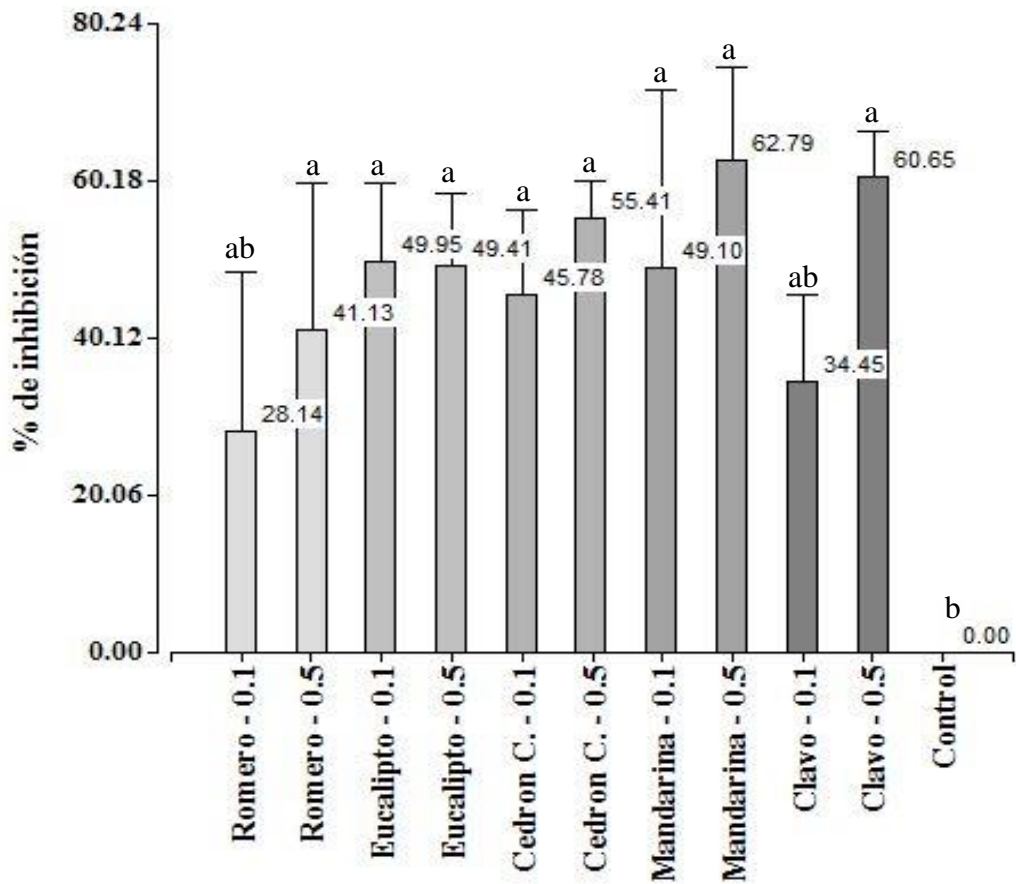


completa falta de actividad inhibitoria contra la infección (Figura 2). Esto se puede observar claramente en los gráficos donde se representan las líneas de tendencia del crecimiento de *H. vastatrix* en tratamientos con los aceites esenciales (Figura 5), la tendencia de crecimiento de los aceites de mandarina, clavo de olor y cedrón, difieren en gran medida con el control, lo que indica una acción inhibitoria por parte de los compuestos de los aceites; mientras que los aceites de romero y eucalipto siguen una tendencia de crecimiento similar al control con respecto al crecimiento de *H. vastatrix* sobre el tejido de la hoja, es decir que estos últimos no afectan el desarrollo normal de la infección.

#### **4.2. Evaluar la viabilidad de las esporas de *Hemileia vastatrix* sometidas a los aceites esenciales.**

El efecto de los aceites esenciales en la germinación de esporas de *H. vastatrix*, se muestra en la figura 9, refleja el porcentaje de inhibición de cada aceite esencial a concentraciones de 0,1 y 0,5%, resultados que se obtuvieron de aplicar la ecuación 4, al número de esporas germinado en cada uno de los tratamientos. Además, antes de transformar en porcentaje y graficar los resultados, se procedió a realizar un análisis de varianza donde se encontró un *p-valor* menor a 0,0393, decir que los tratamientos difieren estadísticamente del control y la prueba comparación múltiple de Tukey expresada en la figura 9.

*Porcentaje de Inhibición de esporas de Hemileia vastatrix*



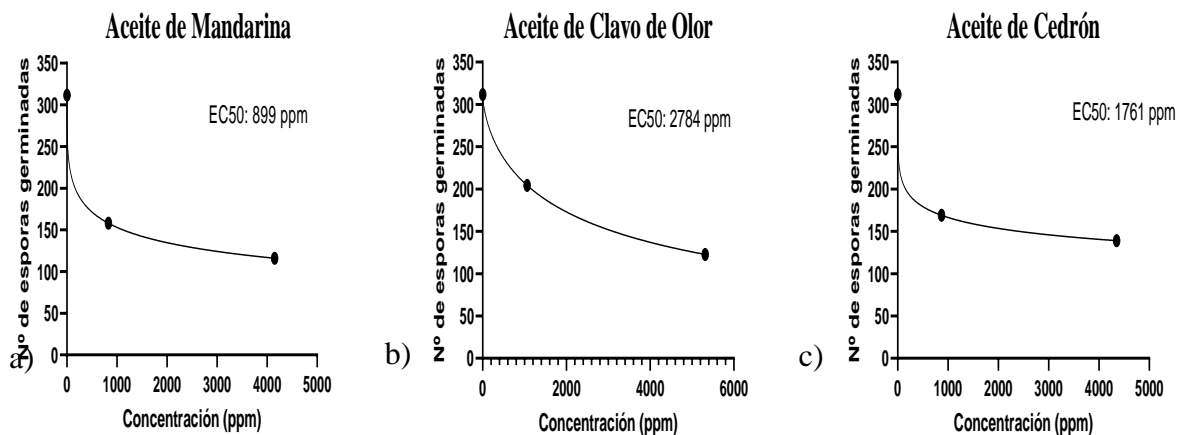
*Figura 9. Porcentaje de Inhibición de esporas de Hemileia vastatrix sometidas a los aceites esenciales por 24 horas en portaobjetos. Barras sobre las columnas indican el error estándar.*

En la inhibición de esporas de manera general podemos decir que los aceites esenciales disminuyen la cantidad de esporas germinadas, siendo los aceites de mandarina y Clavo de olor a una concentración de 0.5%, de los que mejores resultados se obtuvo llegando a superar el 60% de inhibición de esporas, en cambio los aceites de romero y clavo de olor a concertación de 0.1% fueron los que presentaron los valores más bajos con valores menores a 40%, mientras que el restos de los tratamientos, fueron capaces de inhibir la germinación de esporas en porcentajes mayores

al 40% , demostrando de esta manera que los aceites esenciales tienen una alta capacidad de inhibición al estar con de esporas de *H. vastatrix* en las primeras 24 horas.

Terminado el análisis estadístico del porcentaje de inhibición de los aceites esenciales, se procedió a calcular el EC<sub>50</sub> de los aceites de Cedrón, Mandarina y Clavo de olor, graficando el número de esporas germinadas contra la concentración del aceite esencial en ppm. Al igual que en el caso del control del desarrollo de *H. vastatrix*, no se grafica el EC<sub>50</sub> del aceite de romero y eucalipto, ya que ninguna de las concentraciones utilizadas llega a inhibir la germinación de esporas más del 50% de esporas germinadas en tratamiento control.

Al igual que en el control del desarrollo de *H. vastatrix* con aceites esenciales, en la inhibición de esporas, el aceite de mandarina fue el más eficaz marcando como resultado un EC<sub>50</sub> de 899 ppm, seguido del cedrón y por último con clavo de olor con EC<sub>50</sub> de 1761 ppm y 2784 ppm respectivamente.













**Figura 10.** Poder inhibitorio de aceites esenciales contra la germinación de esporas de *H. vastatrix*, expresado en términos de EC<sub>50</sub> a) Aceite Mandarina. b) Aceite de clavo de olor c) Aceite de cedrón

Al comparar los resultados de EC<sub>50</sub> del control del desarrollo y de inhibición de esporas, se observa que en ambos casos el aceite de mandarina es el más eficiente seguido del clavo de olor y el cedrón; en cambio los aceites de romero y Eucalipto no permiten graficar y calcular el EC<sub>50</sub> (No aplica), debido a que el efecto que manifiestan es mínimo o nulo sobre *Hemileia vastatrix*. Al repetirse los resultados en los dos ensayos, se ratifica el efecto que tienen los aceites de mandarina, clavo de olor y cedrón sobre este patógeno.

#### **4.3. Determinar el efecto de los aceites esenciales sobre las esporas *Hemileia vastatrix***

En base a los resultados obtenidos de los tratamientos 24 horas antes, 24 horas después y control, se determina que los aceites esenciales de mandarina, clavo de olor, cedrón, romero y eucalipto utilizados a concentraciones de 0.5% y 0.1%, carecen de la capacidad de detener el por completo el desarrollo de la infección de *H. vastatrix*, ya que a los 5 días que se hizo la evaluación, en los 2 tipos de tratamientos se desarrolló la infección, las esporas de *Hemileia vastatrix* se encontraban intactas y mantenían su característico color amarillento (Tabla 2).

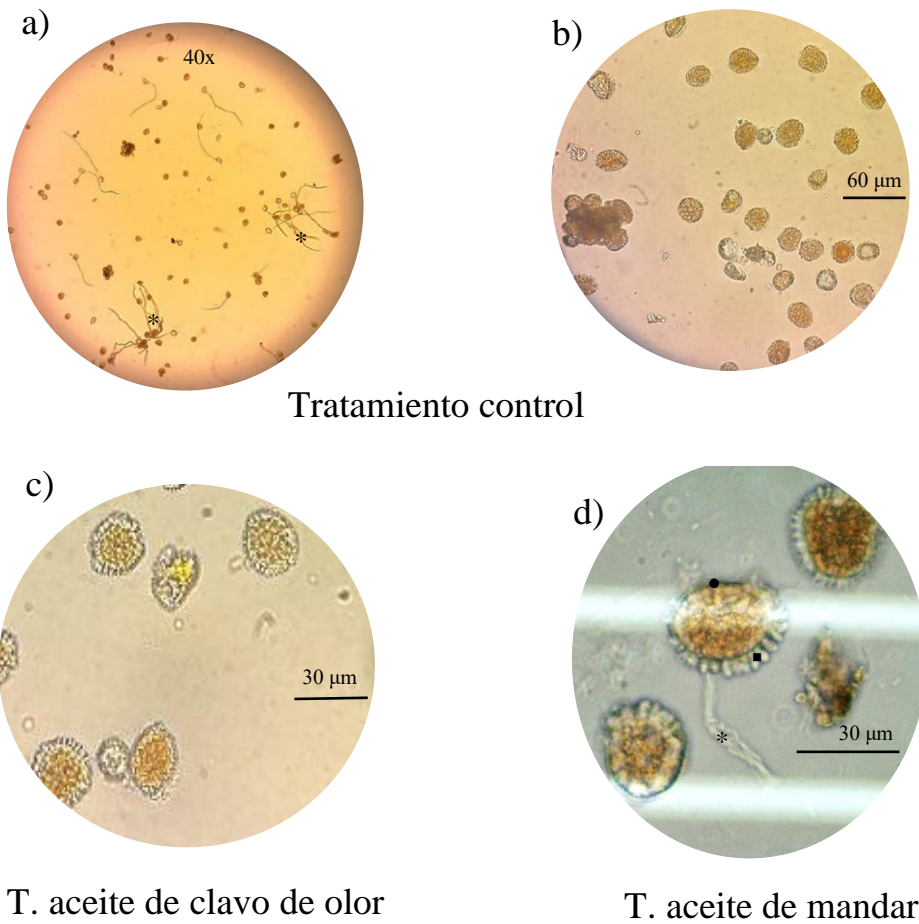
	Aceite de Mandarina	Aceite de Clavo de olor	Aceite de Cedrón	Aceite de Romero	Aceite de Eucalipto
24 horas antes					
24 horas después					

**Tabla 2.** Discos de hojas de los tratamientos 24 horas antes y 24 horas después, donde se desarrolla el hongo *Hemileia vastatrix*.

#### **4.4. Identificar los posibles daños producidos en la pared celular de las esporas de *Hemileia vastatrix* por los aceites esenciales.**

Con los resultados anteriores se tomó como candidatos a los aceites de aceites de mandarina y clavo de olor para determinar posibles daños en la estructura de las esporas, se realizaron varios ensayos que consistían en colocar las esporas de *Hemileia vastatrix* en contacto con estos aceites para luego observar en el microscopio.

En ninguno de los ensayos realizados, se observó que las esporas de *Hemileia vastatrix*, presentarán formas atípicas o algún tipo de daño estructural (figura 11), tanto las esporas como de las hifas del hongo mantenían su integridad. Por lo cual se considera que los aceites esenciales utilizados están afectando la cadena metabólica del hongo más no destruyendo sus estructuras.



**Figura 11.** Esporas de *Hemileia vastatrix* vistas en el microscopio a) y b) Esporas del tratamiento control, Esporas 24 horas después de ser colocadas en agua destilada c) T. aceite de clavo de olor, esporas 24 horas después de ser colocadas en agua destilada con aceite esencial de clavo de olor; d) T. aceite de mandarina, esporas 24 horas después de ser colocadas en agua destilada con aceite esencial de Mandarina. (\* =Hifas del hongo; ■ = cara rugosa; • = cara lisa)

## 5. DISCUSIÓN

Los aceites esenciales mandarina, clavo de olor y cedrón, manifestaron diferentes niveles de inhibición, además poseen tanto un protector como efecto curativo y curativo, esto está íntimamente ligado sus compuestos secundarios presentes en cada uno de los aceites, la concentración en que se encuentran en cada aceite y como es su acción contra el hongo.

El potencial de inhibición de los aceites esenciales expresado en términos de  $EC_{50}$  deja como resultado que el aceite de mandarina es el más eficaz, tanto en el controlar del crecimiento de la infección sobre las hojas (Figura 3), como en inhibir el número esporas germinadas de *H. vastatrix* (Figura 9), seguido en mejor medida por los aceites de clavo de olor y cedrón; mientras que el  $EC_{50}$  del control en crecimiento de la infección sobre las hojas y el  $EC_{50}$  en inhibición del número esporas germinadas de los aceites de romero y eucalipto, no presentaron actividad inhibitoria. Al presentarse los mismos resultados en ambos ensayos, se ratifica el efecto que tienen estos 3 aceites esenciales sobre *H. vastatrix*.

Al no observarse daños en la estructura externa de las esporas (Figura 11), se concluye que la inhibición de la germinación de las esporas producidas por los aceites esenciales; se debe a que están afectando de forma interna, es decir interviene con el metabolismo del organismo; lo que impediría su normal desarrollo, llegando a afectar su geminación e incluso provocar la apoptosis de las esporas (Pereira *et al.*, 2012).

El efecto de los compuestos activos presentes en productos derivados las plantas sobre *H. vastatrix*, ha sido probada previamente por Cerna *et al.* (2019), quien en lugar de aceites esenciales probó 5 diferentes extractos vegetales, sobre plantas de café establecidas dentro de un cultivo, logrando disminuir significativamente la severidad de la infección.

Existen pocos estudios dirigidos a investigar el efecto de los aceites esenciales sobre *H. vastatrix*, entre los que tenemos a Pereira *et al.* (2012), quien encontró que los aceites de tomillo, clavo y citronela a una concentración de 0.1%, eran capaces de detener el crecimiento de la infección en plantas de café, dentro de un invernadero en un periodo de 85 días, específicamente el clavo de olor llegó a reducir hasta el 54% del área infectada lo que concuerda con lo encontrado durante la investigación, en donde el aceite esencial de clavo de olor a una concentración de 0.1% redujo el crecimiento de *H. vastatrix* sobre las hojas de café en un 56% y a una concentración de 0.5% en un 86% (Figura 2). Otro de los aceites probados por Pereira *et al.* (2012) fue el de eucalipto, el cual al igual que este ensayo no constrato del tratamiento control al aplicarse a una concentración de 0.1%. En cambio, Caetano *et al.* (2020); probó los aceites esenciales de 4 especies diferentes de eucalipto, en plantas de café dentro de invernadero; a una concentración 0.25% y 1,5% llegando inhibir la propagación de infección desde 50% hasta el 100% y concluyó que los componentes activos presentes en estos aceites esenciales no son los mismos, por lo cual el efecto de inhibición del aceite de eucalipto sobre *H. vastatrix*, depende tanto de la especie que proviene como de la concentración utilizada. Esto resulta coherente con lo descrito por Alzate *et al.* (2009) y Ortiz (2018) quienes sostienen que la actividad del aceite esencial sobre los hongos fitopatógenos, depende de la concentración, pudiendo en algunos casos inhibir por completo su crecimiento; esto luego de observar el comportamiento de algunos hongos fitopatógenos en someterlos a diferentes concentraciones de los aceites. Esto lleva a concluir que los resultados del aceite esencial de eucalipto sobre *H. vastatrix* en esta investigación, se debe a la procedencia y la concentración utilizada del aceite.



Los aceites de mandarina, cedrón y romero no han sido utilizados para el control de *H. vastatrix*, sin embargo; existen publicaciones del efecto de estos aceites esenciales sobre otros hongos fitopatógenos y bacterias causantes de enfermedades.

En esta investigación el aceite esencial de mandarina, mostró reducir el crecimiento de la infección sobre hoja de café en un 89.9% (Figura 3) y disminuir el número de esporas geminadas en 62% (Figura 9) a una concentración de 0.5% al contacto con *H. vastatrix*; un efecto similar se observó por Baque *et al.* (2017) al inhibir esporas de *Colletotrichum gloeosporioide*, hongo fitopatógeno del Aguacate, a una concentración de 0.1%. Mientras que Velásquez *et al.* (2014) obtuvo resultados favorables al controlar el hongo fitopatógeno *Penicillium sp.*; en cambio, Argote *et al.* (2017), afirmó que el aceite de mandarina posee un efecto bactericida, ya que inhibe el crecimiento *Escherichia coli* y *Staphylococcus*, bacterias causantes de enfermedades. Tanto estas investigaciones como los resultados obtenidos durante el desarrollo de todos los ensayos, demuestran el potencial del aceite de mandarina para combatir agentes patógenos.

El aceite esencial de cedrón no fue tan determinante como el caso del aceite de mandarina, pero mostraron tener cierto nivel inhibitorio contra *H. vastatrix*; con resultados a nivel del aceite de clavo de olor; estos resultados pueden estar íntimamente relacionados con las concentraciones usadas, ya que un estudio realizado por Anaya (2018), donde usó aceite esencial de cedrón a concentraciones de 100%, 75%, 50% y 25% para el control de cepas *Staphylococcus aureus* en cajas Petri, determinó que las concentraciones eficaces, eran las mayores a 75%. Por lo cual se podrían mejorar los resultados contra *H. vastatrix* con dosis más altas del aceite esencial de cedrón.

Por último, el aceite esencial de romero a concentraciones de 0.1% y 0.5, mostró ser poco eficientes en el control del desarrollo de infección y en la inhibición de esporas de *H. vastatrix*, llegó a inhibir solo un 41% de su geminación, lo que concuerda con Ruilova (2007), al probar el

aceite esencial de romero para inhibir el crecimiento de las bacterias *Pseudomonas syringae* y *Erwinia sp.*, y los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Alternaria sp.* se probó diferentes porcentajes de concentración 0,85%, 4.90%, 0.31% y 0.63% respectivamente, que son las necesarias para lograr observar su acción antimicrobiana en estos organismos. En cambio, García (2020), utilizó concentraciones más altas de 25%, 50% 75% y 100% de aceite de romero para inhibir el crecimiento de cepas de *Streptococcus Pyogenes* cultivadas en cajas Petri; en todas concentraciones empleadas se redujo su crecimiento. El comportamiento y resultados del romero son similares al del aceite de eucalipto, ya que en ambos casos la inhibición de los agentes patógenos depende directamente concentración utilizada y se necesitaría una concentración mayor para observar un efecto significativo al estar en contacto con *H. vastatrix*.

Durante la evaluación en la fase de campo y la base de laboratorio, no se observó ningún tipo de daño en el tejido de las hojas de café (Figura 7), utilizadas en los ensayos, donde se hizo la aplicación de los aceites; esto nos lleva a pensar que no poseen compuestos tóxicos para la estructura de las hojas de café y que las concentraciones utilizadas son las óptimas; lo cual concuerda con lo obtenido con Celis *et al.* (2007) donde manifiesta que los aceites pueden ser nocivos, con baja toxicidad o no presentar toxicidad alguna. Los aceites esenciales con efecto sobre la infección de *H. vastatrix*, nos acerca a encontrar moléculas dentro de su composición que permitan el control efectivo y específico de la roya, lo cual permitiera mejorar la calidad de producción (Chamorro *et al.* 2017; Mendoza y Fernando 2017; Zapata *et al.* 2020) y evitar los efectos secundarios producidos al utilizar agroquímicos para su control (Salamanca 2020; Ibarra *et al.* 2019).

Neth y Path (1982), afirman que el tiempo de desarrollo de *H. vastatrix* varía según la temperatura, puede ir de 24 a 44 días; uno de los resultados importantes en esta investigación es el

tiempo que pueden mantenerse funcionales los discos de hojas, en cajas Petri con papel filtro humedecido, que es de 40 días dentro de un laboratorio (Figura 8); ya que al utilizar hojas enteras estas comienza a necrosar su tejido a partir de los 15 días y en cambio al usar hojas de campo que están sometidas a factores externos, puede afectar los datos o provocar la caída prematura de la hoja, por lo cual la metodología de discos de hojas, sería la adecuada para evaluar ensayos de *H. vastatrix*; ya que abarca todo el periodo de desarrollo del hongo, dentro del laboratorio y bajo condiciones controladas.

Para futuras investigaciones destinadas a determinar el tipo de efecto que tiene los aceites esenciales, curativo o protector, hay que tener en cuenta que, la concentración empleada sea la adecuada para detener por completo la actividad del hongo y además considerar lo obtenido por Silva *et al.* (2018) el cual sostiene que, debido a que la infección por el hongo en la hoja se produce durante las primeras 24 horas de contacto, la posterior presencia de los tratamientos no causa ninguna diferencia y en el caso de 24 horas antes, los tratamientos deben presentar la capacidad de formar una película protectora sobre la hoja, ya que los fungicidas protectores tienen una dosis mínima para ser efectivos como lo explican Ruano y López (2015).

## 6. CONCLUSIONES.

- ▲ Los aceites esenciales de mandarina, clavo de olor y cedrón mostraron ser eficientes en el control *in-situ* del desarrollo de *Hemileia vastatrix* sobre las hojas de café, reduciendo el crecimiento de la infección en 89.9%, 83.5% y 53.2% respectivamente en comparación con el control; el potencial inhibitorio se ve reflejado en el EC<sub>50</sub>, donde se obtuvo 349 ppm para mandarina, 1832 ppm para clavo de olor y 3717 ppm para cedrón. Los aceites de romero y eucalipto manifestaron un efecto mínimo o nulo en el control del desarrollo de la infección sobre hojas de café.
- ▲ La metodología de discos de hojas dentro del laboratorio, resulta ser más eficiente para evaluar el comportamiento de *Hemileia vastatrix* al estar sometida a aceites, ya que permite un periodo de evaluación de 40 días, mientras que en campo el periodo de evolución se reduce a 20 días.
- ▲ Los aceites esenciales mandarina, clavo de olor y cedrón poseen la capacidad de inhibir la germinación de esporas hasta 62.79%, 60.65% y 55.41% respectivamente, el efecto de los aceites sobre la inhibición de esporas se refleja claramente en el EC<sub>50</sub> de cada uno; siendo mandarina el mejor con un EC<sub>50</sub> 899 ppm, 2784 ppm para clavo de olor y 1761 ppm para cedrón. Los aceites de romero y eucalipto tuvieron un efecto mínimo al inhibir esporas de *Hemileia vastatrix*.
- ▲ En la determinación de los efectos de los aceites esenciales sobre las esporas *Hemileia vastatrix*, se encontró que los aceites esenciales de mandarina, clavo de olor y cedrón mostraron tener tanto un efecto curativo como protector, al ser aplicados a concentraciones de 0.5% y 0.1%.

- ▲ Al observar en el microscopio las esporas de *Hemileia vastatrix* que estuvieron en contacto con los aceites esenciales luego de los ensayos, no se identificó ningún tipo de daños causados por la acción directa del aceite sobre la pared celular de las esporas, así como tampoco formas atípicas o irregulares.

## 7. RECOMENDACIONES

- Continuar con la evaluación de los aceites a través de un screening in vivo con propiedades fungicidas contra *Hemileia vastatrix*, para la determinación de sus propiedades y el efecto que estos tienen en el desarrollo de la enfermedad.
- Desarrollar un método de esterilización para las esporas de *Hemileia vastatrix*, ya que como mostro esta investigación es posible que, al obtener las esporas, estas estén comprometidas con otros hongos.
- Utilizar aceites esenciales como medio de control para *Hemileia vastatrix* en fincas cafetaleras con el fin de determinar si sus efectos son iguales en una escala mayor a la empleada en esta investigación.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, GN. 1998. Fitopatología. 2 ed. México, Editorial Limusa (Fisiología de las enfermedades de las plantas). p. 11-12.
- Alvarado Soto, M., & Rojas Cubero, G. (2007). El cultivo y beneficiado del café.
- Alzate, N. A. G. (2009). Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, Myrtaceae) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, Rutaceae) sobre algunos hongos fitopatógenos. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 1(4).
- Amraoui, B., El Wahidi, M., & Fassouane, A. (2014). Cribado in vitro de la actividad antifúngica de extractos de esponjas marinas contra cinco hongos fitopatógenos. SpringerPlus. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-629>
- Anaya Huánuco, E. R. (2018). Efecto Antibacteriano del Aceite Esencial de *Aloysia Triphylla* “Cedrón” sobre *Staphylococcus Aureus* ATCC25923 comparado con Oxacilina.
- APS. (2011). Coffee rust. The Plant Health Instructor. <https://doi.org/10.1094/phi-i-2000-0718-02>
- Argote, F. E., Montenegro, Z. J. S., Delgado, M. E. T., Alvarez, J. A. P., Hurtado, A., & Ospina, J. D. (2017). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 15(2), 52-60
- Ascunce Elizaga, N. (2015, April). Cribado: para qué y cómo. In *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* (Vol. 38, No. 1, pp. 5-7). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.
- Avelino, J; Rivas, G. 2013. La roya anaranjada del cafeto. Disponible en <http://hal.archivesouvertes.fr/hal01071036>. p. 1-47
- Avelino, J; Muller, R; Eskes, A; Santacreo, R; Holguin, F. 1999. La roya anaranjada del cafeto: mito y realidad. *Desafíos de la caficultura en Centroamérica*. In Bertrand, B; Rapidel, B (eds.). *Desafíos de la caficultura en Centroamérica*. San José, Costa Rica, IICA. p. 194-241.
- Baque, F. J. N., Miranda, S. B., Vásquez, F. M. F. F., Chévez, M. M., Mosquera, J. A. N., & Llaguno, S. N. S. (2017). Potencial antifúngico de *Citrus sinensis* y *Citrus nobilis* sobre el crecimiento de *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya. *Revista ciencia y tecnología*, 10(1), 41-46.
- Bard, G. C., Taveira, G. B., Souza, T. A., Mello, E. O., Souza, S. B., Ramos, A. C., ... & Gomes, V. M. (2018). Péptidos de *Coffea canephora* en tratamiento combinatorio con fluconazol: Actividad antimicrobiana contra hongos fitopatógenos. *International journal of microbiology*, 2018
- Brooks, S. (2018). Investigation of Diverse Cryopreservation Techniques for Long Term Storage of Coffee Leaf Rust *Hemileia vastatrix*. *Science & Technology Asia*, (March), 23–29. <https://doi.org/10.14456/scitechasia.2018.4>
- Díaz Solares, M., Lugo Morales, Y., Fonte Carballo, L., Castro Cabrera, I., López-Vigoa, O., &

- Montejo Sierra, I. L. (2017). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos frescos de hojas de *Morus alba* L. *Pastos y Forrajes*, 40(1), 43-48
- DGSV-SINAVEF-LANREF, 2015. Escalas de severidad de roya del café en hoja y planta. En línea: <http://www.royacafe.lanref.org.mx/Documentos/EscalaSeveridadDefoliacio>
- Caetano, A. R. S., Chalfoun, S. M., Resende, M. L. V., Angélico, C. L., Santiago, W. D., Magalhães, M. L., ... & Cardoso, M. D. G. (2020). Caracterización química y determinación de la actividad antifúngica in vivo e in vitro de aceites esenciales de cuatro especies de *Eucalyptus* contra el hongo *Hemileia vastatrix* Berk y Br, agente de la roya del café. *Australian Journal of Crop Science*, 14(9), 1379-1384.
- Canet Brenes, G., Soto Viquez, C., Ocampo Tomason, P., Rivera Ramírez, J., Navarro Hurtado, A., Guatemala Morales, G., & Villanueva Rodríguez, S. (2016). La situación y tendencias de la producción de café en América Latina y el Caribe. In *Iica*. Retrieved from <http://www.iica.int/sites/default/files/publications/files/2017/BVE17048805e.pdf>
- Carmona, M., & Sautua, F. (2017). La problemática de la resistencia de hongos a fungicidas. Causas y efectos en cultivos extensivos. *Revista de La Facultad de Agronomía UBA*, 37(1), 1-19. Retrieved from <http://ri.agro.uba.ar/files/download/revista/agronomiayambiente/2017carmonamarcelo.pdf>
- Carvalho, C. R., Fernandes, R. C., Carvalho, G. M. A., Barreto, R. W., & Evans, H. C. (2011). Criptosexualidad y la paradoja de la diversidad genética en la roya del café, *Hemileia vastatrix*. *PLoS ONE*, 6(11), 1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026387>
- Celis, C. N., Rivero, P. E., Isaza, J. H., Martínez, J. R., & Stashenko, E. (2007). Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia organoides* y *Phyla dulcis*, especies de la familia Verbenaceae. *Scientia et Technica*, 13(33), 103-105.
- Celis, A., Mendoza, C. F., & Pachón, M. E. (2009). Uso de extractos vegetales en el manejo integrado de plagas, enfermedades y arvenses
- Cerda, R., Avelino, J., Gary, C., Tixier, P., Lechevallier, E., & Allinne, C. (2017). Primary and secondary yield losses caused by pests and diseases: Assessment and modeling in coffee. *PloS one*, 12(1), e0169133
- Cerna-Chávez, E., Magaña-Arteaga, R., Velázquez-Guerrero, J. J., Ochoa-Fuentes, Y. M., Cepeda-Siller, M., & Hernández-Bautista, O. (2019). Evaluación de extractos vegetales sobre incidencia y severidad de *Hemileia vastatrix* en cultivo de café. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 6(18), 557-563.
- Chamorro, L., Chamorro, L., & Pérez, A. (2017). Actividad antifúngica de aceite esencial de *Lippia organoides* contra *Colletotrichum gloeosporioides* causante de la enfermedad antracnosis del cultivo de ñame en el departamento de Sucre. *Revista Teinova*, 2, 13-16.
- Costa, W. M., Eskes, A. B., & Ribeiro, I. J. A. (1978). Evaluación del nivel de resistencia de los cafetos a *H. vastatrix*. *Bragantia*, 37(1), 23-29.
- Croce Portocarrero, M. A., da Costa Manso, E. R., Gambale, W., Takayama, L., Oliveira Andrade, C. E., Pereira Pinto, J. H., ... & Croce, J. (2001). Sensibilización al hongo *Hemileia vastatrix*



- (roya del café). *Allergy*, 56(7), 684-687
- Deepak, K., Hanumantha, B. T., & Sreenath, H. L. (2012). Viabilidad de las urediniosporas de la roya del café (*Hemileia vastatrix*) almacenadas a diferentes temperaturas. *J Biotechnol Biomater*, 2(5), 1-3.
- Escobar O., C., & Cristancho A., M. (2007). Estudio de metodologías para la conservación de urediniosporas de la roya del cafeto. *Cenicafé*, 58(4), 324–332.
- Eskes, A. B. (1982). El uso de inoculaciones de discos foliares para evaluar la resistencia a la roya del café (*Hemileia vastatrix*). *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 88(4), 127-141.
- FAO. (2016). Manejo agroecológico de la roya del café. In *Memorias del seminario científico internacional*: <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1011.8484>
- Gandarilla-Pacheco, F. L., Torres-Caraballo, S., de Luna-Santillana, E. J., Quintero-Zapata, I., & Arroyo-González, N. (2020). Efecto inhibitorio de aceites esenciales en el crecimiento micelial de *Penicillium digitatum* (pers.) sacc. aislado de naranja dulce (*Citrus sinensis* osbeck). *Agrociencia*, 54(2), 209-225.
- Garcia, A. (2013). Incidencia y severidad de la roya de café (*hemileia vastratrix*) y la evaluación de alternativas químicas para el control (Universidad Rafael Landívar; Vol. 1). Retrieved from <http://biblio3.url.edu.gt/Tesario/2013/06/17/Garcia-Deyvid.pdf>
- García Horna, J. A. (2020). Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Rosmarinus Officinalis* (Romero) sobre *Streptococcus Pyogenes* ATCC 19615 comparado con amoxicilina in vitro.
- Guanoluisa Guachamin, J. F. (2019). Efecto inhibitorio del aceite esencial de eucalyptus globulus l.(eucalipto) vs gluconato de clorhexidina sobre cepas de *aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Estudio in vitro* (Bachelor's thesis, Quito: UCE).
- Gutiérrez, Sofia;Trujillo, L. (2019). Revisión y análisis macroscópico y microscópico de las cepas de la colección de hongos de la universidad católica de manizales para verificar su contenido, viabilidad y pureza. Universidad Católica de Manizales.
- Herrera Zúñiga, J. S. (2016). Efecto bactericida de desinfectantes sobre cepas de *Escherichia coli* y *Listeria innocua* en superficies de uso en la Industria Alimentaria.
- Ibarra, J. A., López, C. A. V., Moreno, M. R. C., Reyes, P. D. L., Servin, J. A. B., Apodaca, M. E. M., & Sandoval, N. C. R. (2019). Agroquímicos organofosforados y su potencial daño en la salud de trabajadores agrícolas del campo sonoreño. *CIENCIA ergo-sum*, 26(1), 8.
- Jiménez R., Á. A., Rodríguez R., L. D., Murillo A., W., Méndez A., J. J., & Rueda L., E. A. (2013). Actividad anti-alimentaria de metabolitos secundarios de residuos cítricos sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 39(1), 113–119.
- Kushalappa, A. C. (1989). Biología y epidemiología. La roya del café: epidemiología, resistencia y gestión, 13-80
- Kushalappa, A. C., & Eskes, A. B. (1989). La roya del café: epidemiología, resistencia y gestión. CRC Press.
- Loureiro, A., Azinheira, H. G., Silva, M. do C., & Talhinhos, P. (2015). Un método para la

- obtención de ARN a partir de apresorios de *Hemileia vastatrix* producidos en planta, adecuado para los análisis transcriptómicos. *Fungal Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.08.008>
- MAG. (2017) Informe al congreso cafetalero. Sector agrícola alimentario. Gobierno de la república de Costa Rica
- Mahfud, M., Mior Ahmad, Z., Meon, S., & Kadir, J. (2006). Pruebas in vitro e in vivo del parasitismo de *Verticillium psalliotae* Treschow en *Hemileia Vastatrix* BERK. and BR. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2(1), 46–50.
- Mena Echevarría, A., Mujica Pérez, Y., Fernández Suárez, K., Rodríguez, A., & Dell, J. (2015). Viabilidad de esporas y funcionamiento de un inoculante líquido a base de *Glomus cubense* en *Sorghum bicolor* L. cv. Moench. *Cultivos Tropicales*, 36(3), 27-33.
- Mendoza, R., & Fernando, A. (2017). Efecto biofungicida de aceites esenciales en el control de la sigatoka negra *mycosphaerella fijiensis* en el cultivo de banano (Bachelor's thesis, Machala: Universidad Técnica de Machala).
- Mora, G. (2016). Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome). ficha técnica N° 40. Servicio nacional de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria. Dirección General de Sanidad Vegetal.(40), 23p.
- Ochoa Fuentes, Y. M., Hernández Pérez, A., Delgado Ortiz, J. C., Hernández Bautista, O., Cerna Chavez, E., Aguirre Uribe, L. A., & Tapia Vargas, L. M. (2019). Control orgánico in vitro de *Phytophthora cinnamomi* con aceites esenciales de orégano y clavo. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(4), 961-968
- Onaran, A., & Didem, H. (2016). Actividad antifúngica de algunos extractos contra algunos hongos patógenos de las plantas. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8(3), 413–417. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2005.413.417>
- Ordaz-Trinidad, N., Dorantes-Álvarez, L., Salas-Benito, J., Barrón-Romero, B. L., Salas-Benito, M., & Nova-Ocampo, M. De. (2018). Citotoxicidad y actividad antiviral de los extractos de pimiento (*Capsicum* spp). *Polibotánica*, 0(46), 273–285. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.46.18>
- Ortiz Núñez, A. D. (2018). Evaluación de aceites esenciales y antibióticos sobre los índices productivos y morfometría de las vellosidades intestinales en pollos de engorde (Bachelor's thesis).
- Paladines, S. (2013). Vulnerabilidad a nivel Municipal del cantón Loja.
- Panstruga, R. (2003). Establecimiento de la compatibilidad entre plantas y patógenos biotróficos obligados. *Opinión actual en biología vegetal*, 6(4), 320-326
- Pereira, R. B., Lucas, G. C., Perina, F. J., & Alves, E. (2012). Aceites esenciales para el control de la roya en los cafetos. *Ciência e Agrotecnologia*, 36(1), 16-24.
- Pérez, M. A., Navarro, H., & Miranda, E. (2013). Residuos de plaguicidas en hortalizas: problemática y riesgo en México. *Revista Internacional de contaminación ambiental*, 29, 45-64

- Pino-Benitez, C. N., & Valencia, C. M. (2015). Evaluación de extractos totales como repelente para el control de *Tribolium castaneum* Herbst, 1799 (Coleoptera: Tenebrionidae). *Revista Biodiversidad Neotropical*, 6(1), 22. <https://doi.org/10.18636/bioneotropical.v6i1.124>
- Porto, B. N., Caixeta, E. T., Mathioni, S. M., Vidigal, P. M. P., Zambolim, L., Zambolim, E. M., ... de Resende, M. L. V. (2019). La secuenciación del genoma y el análisis de los transcritos de *Hemileia vastatrix* revelan una dinámica de expresión de los efectores candidatos que depende de la compatibilidad del huésped. *PLoS ONE*, 14(4), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215598>
- Rayner, R. W. (1961). Liberación de esporas y dispersión de la roya del café *Hemileia vastatrix* B. et Br. *Nature*, 191(4789), 725-725.
- Rivillas, C. A., Serna, C. A., & Gaitan, A. (2011). La roya del cafeto en Colombia: Impacto manejo y costos del control.
- Rodríguez, A. T., Morales, D., & Ramírez, M. A. (2000). Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de hongos fitopatógenos. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portuga*.
- Ruano Rosa, D., & López Herrera, C. (2015). Adecuación de la dosis mínima efectiva del fungicida Fluazinam para su uso combinado con *Trichoderma atroviride* en el control de la podredumbre blanca del aguacate
- Rubio Ortega, A., Travieso Novelles, M. D. C., Riverón Alemán, Y., Martínez Vasallo, A., Espinosa Castaño, I., & Pino Pérez, O. (2020). Efecto del aceite esencial de *Thymus vulgaris* sobre la permeabilidad celular de *Salmonella enterica*. *Revista de Salud Animal*, 42(3).
- Ruilova Reyes, A. G. (2007). Determinación de la concentración inhibitoria mínima de aceites esenciales ante bacterias y hongos fitopatógenos (Bachelor's thesis, Universidad del Azuay).
- SAGARPA. (2016). *Roya del cafeto Hemileia vastatrix Berkeley & Broome Ficha Técnica No. 40*. 1–23. Retrieved from <http://www.cesaveson.com/files/docs/campanas/vigilancia/fichas2016/ROYAcafeto.pdf>
- SAGARPA. (2018). Estrategia operativa del programa fitosanitario contra la roya del cafeto.
- Salamanca Castillo, G. F. (2020). Efecto de los agroquímicos en salud pública y medio ambiente.
- Silva-Castro, I., Barreto, R. W., Rodriguez, M. C. H., Matei, P. M., & Martín-Gil, J. (2018, July). Control de la roya del café mediante el uso de oligómeros de quitosano y propóleo. En las actas de la conferencia "Agriculture for Life, Life for Agriculture". (Vol. 1, No. 1, pp. 311-315). Sciendo.
- Silva, M. C., Nicole, M., Rijo, L., Geiger, J. P., & Rodrigues, Jr, C. J. (1999). Aspectos citoquímicos de la interfaz planta-hongo durante la interacción compatible *Coffea arabica* (cv. Caturra)–*Hemileia vastatrix* (race III). *International Journal of Plant Sciences*, 160(1), 79-91.
- Silva, D. N., Várzea, V., Paulo, O. S., & Batista, D. (2018). Huellas genómicas poblacionales de adaptación al huésped, introgresión y recombinación en la roya del café. *Patología vegetal molecular*, 19(7), 1742–1753. <https://doi.org/10.1111/mpp.12657>

- Solares, M. D., Morales, Y. L., Carballo, L. F., & Cabrera, I. C. (2017). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos frescos de hojas de *Morus alba* L. *leaves*. *40*(1), 43–48.
- Velásquez, M. A., Álvarez, R. M., Tamayo, P. J., & Carvalho, C. P. (2014). Evaluación in vitro de la actividad fungistática del aceite esencial de mandarina sobre el crecimiento de *Penicillium* sp. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, *15*(1), 7-14.
- Vieira, A., Talhinhos, P., Loureiro, A., Thürich, J., Duplessis, S., Fernandez, D., ... & Azinheira, H. G. (2012). Perfil de expresión de los genes implicados en la colonización biotrófica de las hojas de *Coffea arabica* por *Hemileia vastatrix*. *Revista europea de patología vegetal*, *133*(1), 261-277.
- Villarreyña Acuña, R. A. (2014). Análisis de las condiciones de manejo que propiciaron el impacto de la roya (*Hemileia vastatrix*) en la zona cafetalera de los municipios de Jinotega, el Tuma-La Dalia y San Ramón, Nicaragua. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.32511.20642>
- Zapata-Narváez, Y. A., Gómez-Marroquín, M. R., & Botina-Azain, B. L. (2020). Evaluación de antagonistas microbianos y aceites esenciales en el control de *Sclerotium cepivorum* en ajo en condiciones controladas. *Revista mexicana de fitopatología*, *38*(2), 182-197.
- Zhao, D. L., Wang, D., Tian, X. Y., Cao, F., Li, Y. Q., & Zhang, C. S. (2018). Actividades antifitopatogénicas y citotóxicas de extractos crudos y metabolitos secundarios de hongos de origen marino. *Marine Drugs*. <https://doi.org/10.3390/md16010036>

## 9. Anexos:

### Anexo 1: Prueba del metodo de esterilizacion



**Anexo 2: Cajas de Petri colocadas a luz de forma continua**



**Anexo 3: Discos de hojas infectados, 5 días después de la inoculación**

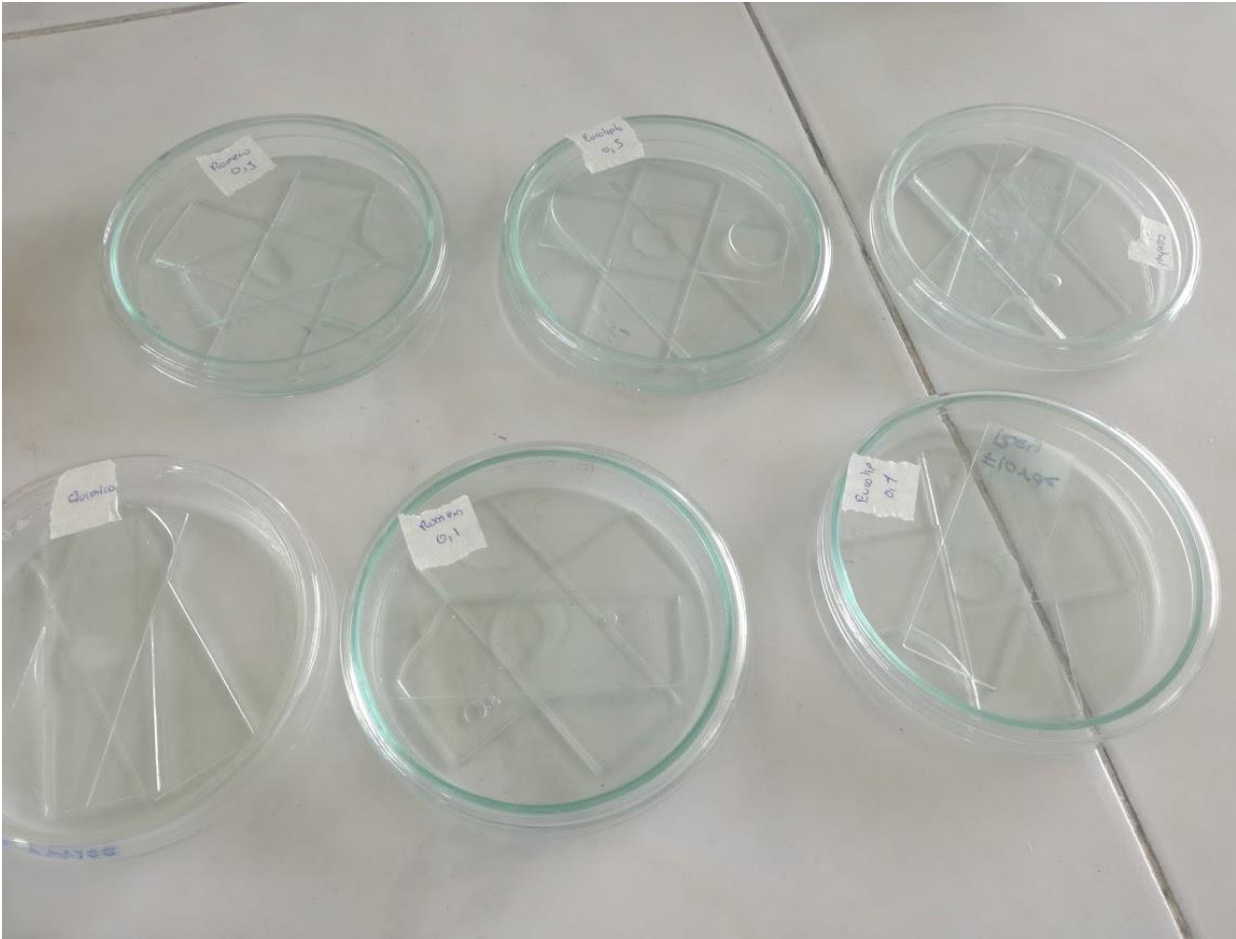


**Anexo 4: Discos de hojas 15 días después de la inoculación: a) Tratamiento aceite de romero b) Tratamiento aceite de eucalipto.**

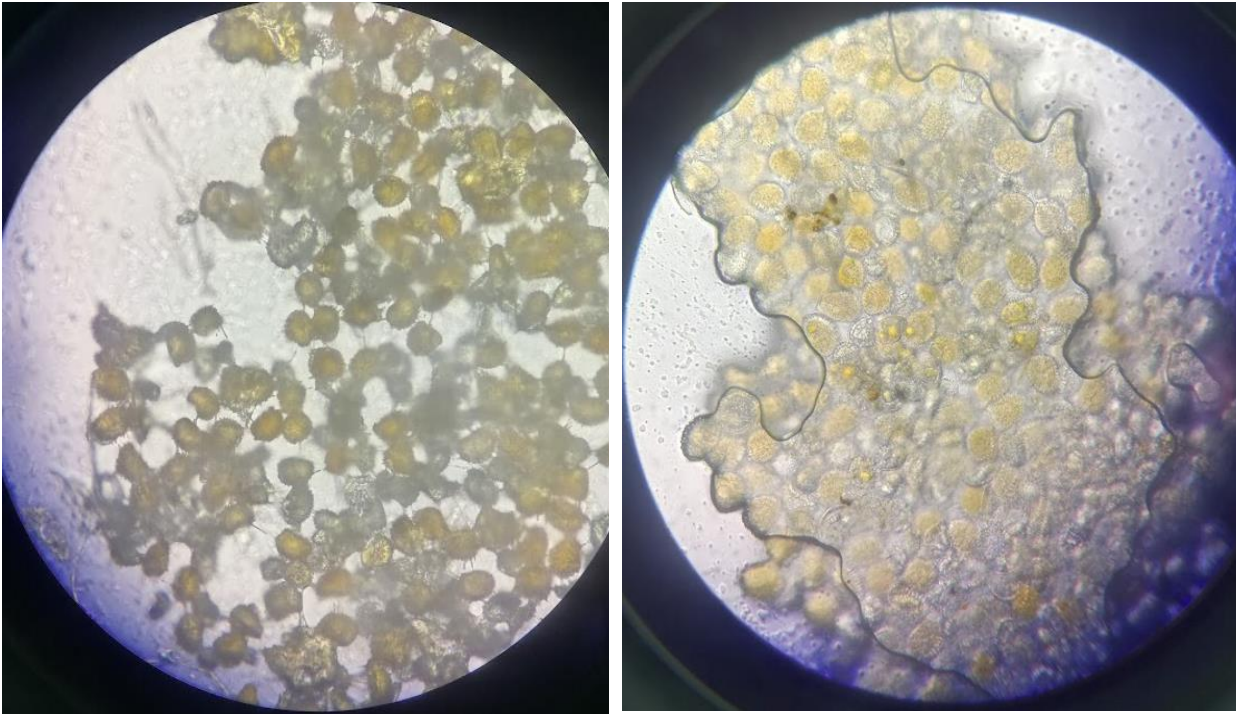




**Anexo 5: Suspensión de esporas colocadas en porta objetos dentro de cajas de Petri que contienen agua destilada (Ensayo de germinación de esporas).**



**Anexo 6: Esporas de *Hemileia vastatrix* colocadas en agua destilada y vistas en un microscopio optico: a) Repeticion 1 b) Repeticion 2.**



**Anexo 7: Selección y etiquetado de plantas de café.**





**Anexo 8: Aplicación de aceites y toma de fotografías: a) Primera medicion b) Segunda medicion.**



**Anexo 9: Fotografías de las hojas de café utilizadas para el calculo del crecimiento de las infeccion: a) Tratamiento aceite de mandarina b) Tratamiento aceite de cedrón c) Tratamiento aceite de clavo de olor.**



**Anexo 10: Grupo de investigación “Identificación de targets moleculares para el desarrollo de inhibidores enzimáticos en el control de la roya del café (*Hemileia vastatrix*)”.**

