



UNL

Universidad
Nacional
de Loja

Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Carrera de Ingeniería Ambiental

Evaluación del potencial inhibitorio de aceites esenciales de plantas cítricas contra el crecimiento de *Hemileia vastatrix* (roya del café) en condiciones *in vitro*

Trabajo de Integración Curricular previa a la obtención del título de Ingeniera Ambiental

AUTORA:

Jennifer Adriana Ludeña Luzón

DIRECTOR:

Jorge I. Armijos-Rivera, PhD

Loja – Ecuador

2024

Certificación

Loja, 20 de marzo de 2024

Jorge I. Armijos-Rivera, PhD

DIRECTOR DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo el proceso de elaboración del Trabajo de Integración Curricular denominado: **Evaluación del potencial inhibitorio de aceites esenciales de plantas cítricas contra el crecimiento de *Hemileia vastatrix* (roya del café) en condiciones *in vitro***, previo a la obtención del título de Ingeniera Ambiental, de la autoría de la estudiante **Jennifer Adriana Ludeña Luzón**, con **cédula de identidad Nro. 1106005059**, una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja, para el efecto, autorizo la presentación del mismo para su respectiva sustentación y defensa.

Jorge I. Armijos-Rivera, PhD

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Autoría

Yo, **Jennifer Adriana Ludeña Luzón**, declaro ser autora del presente Trabajo de Integración Curricular y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos y acciones legales, por el contenido del mismo. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi Trabajo de Integración Curricular, en el Repositorio Digital Institucional–Biblioteca Virtual.

Firma:

Cédula de Identidad: 1106005059

Fecha: 28 de mayo de 2024

Correo electrónico: jennifer.a.ludena@unl.edu.ec

Teléfono: 095 921 6468

Carta de autorización por parte de la autora, para consulta, reproducción parcial o total y/o publicación electrónica del texto completo, del Trabajo de Integración Curricular.

Yo, **Jennifer Adriana Ludeña Luzón**, declaro ser autora del Trabajo de Integración Curricular denominado: **Evaluación del potencial inhibitorio de aceites esenciales de plantas cítricas contra el crecimiento de *Hemileia vastatrix* (roya del café) en condiciones *in vitro***, como requisito para optar por el título de **Ingeniera Ambiental**, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Institucional, 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 del Trabajo de Integración Curricular que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, suscribo, en la ciudad de Loja, a los veintiocho días del mes de mayo del dos mil veinticuatro.

Firma:

Autora: Jennifer Adriana Ludeña Luzón.

Cédula: 1106005059

Dirección: Yahuarquina, calles Romerillos y Eucaliptos.

Correo electrónico: jennifer.a.ludena@unl.edu.ec

Teléfono: 095 921 6468

DATOS COMPLEMENTARIOS:

Director del Trabajo de Integración Curricular: Jorge I. Armijos-Rivera, PhD

Dedicatoria

A Dios, el pilar de mi vida, y a la Virgen del Cisne por su cuidado y protección. A mi mami Mayra, por su incondicional apoyo y esfuerzo incansable, y a mi abuelita Mariana, por sus sabios consejos durante esta etapa.

Jennifer Adriana Ludeña Luzón

Agradecimiento

Agradezco a Dios por concederme vida, salud y sabiduría para alcanzar una meta más en mi formación profesional. A mi mami y abuelita por estar siempre a mi lado, celebrar cada momento de alegría conmigo y no dejarme rendir en este arduo camino.

Expreso mi más sincero agradecimiento a mi director de Tesis, Jorge I. Armijos-Rivera, PhD; su guía y mentoría fueron indispensables para completar mi trabajo de titulación. De igual manera, al Grupo de Investigación “Genética y Biología Molecular” por los valiosos conocimientos que me han transmitido. Mi gratitud sincera con la planta docente de la Carrera de Ingeniería Ambiental, por todas las enseñanzas y gratas experiencias que llevo conmigo. Gracias a mis familiares y amigos por su cariño y motivación constantes

Jennifer Adriana Ludeña Luzón

Índice de contenidos

Portada.....	i
Certificación.....	ii
Autoría.....	iii
Carta de autorización.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento.....	vi
Índice de contenidos.....	vii
Índice de tablas.....	ix
Índice de figuras.....	x
Índice de anexos.....	xi
1. Título	1
2. Resumen.....	2
Abstract	3
3. Introducción.....	4
4. Marco Teórico	8
4.1. El café.....	8
4.2. Origen y evolución del café	8
4.3. Cultivo de café en Ecuador	9
4.4. La roya del café	10
4.5. Impacto económico y productivo	11
4.6. Ciclo de vida de <i>H. vastatrix</i>	11
4.7. Urediniosporas	13
4.8. Identificación de <i>Hemileia vastatrix</i>	13
4.9. Tratamientos para la roya de café	14
4.10. Actividad de aceites esenciales	15
4.11. Aceites esenciales de plantas críticas	16
4.12. Perspectivas futuras en la producción de café.....	17
5. Metodología	17

5.1.	Área de estudio.....	17
5.2.	Metodología para el primer objetivo: “Realizar la identificación molecular de esporas de la roya del café”.....	19
5.3.	Metodología contra para el segundo objetivo: “Obtener la curva de crecimiento de <i>Hemileia vastatrix</i> en condiciones <i>in vitro</i> ”.....	23
5.4.	Metodología para el tercer objetivo: “Identificar el potencial de inhibición de aceites esenciales de plantas cítricas el crecimiento de <i>Hemileia vastatrix</i> y el desarrollo de la roya del café mediante el índice EC 50”.....	31
6.	Resultados	33
6.1.	Resultados para el primer objetivo: “Realizar la identificación molecular de esporas de la roya del café”.....	33
6.2.	Resultados para el segundo objetivo: “Obtener la curva de crecimiento de <i>Hemileia vastatrix</i> en condiciones <i>in vitro</i> ”.....	36
6.3.	Resultados para “Identificar el potencial de inhibición de aceites esenciales de plantas cítricas contra el crecimiento de <i>Hemileia vastatrix</i> y el desarrollo de la roya del café mediante el índice EC 50”.....	38
7.	Discusión	47
8.	Conclusiones	53
9.	Recomendaciones	54
10.	Bibliografía	55
11.	Anexos	71

Índice de tablas

Tabla 1. Cuantificación de la muestra de ADN en NanoDrop™ 2000c	21
Tabla 2. Diluciones de los aceites esenciales	27
Tabla 3. Repeticiones de los tratamientos.	30
Tabla 4. Área de infección a los 28 días.....	42

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>H. vastatrix</i>	12
Figura 2. Finca Agroecológica “El Naranjo”	18
Figura 3. Ubicación del cantón Quilanga.....	18
Figura 4. Hojas recolectadas con infección por <i>Hemileia vastatrix</i>	20
Figura 5. Identificación morfológica de las esporas de <i>H. vastatrix</i>	21
Figura 6. Primeras suspensiones de esporas	23
Figura 7. Discos de hojas activos previo a la inoculación	26
Figura 8. Discos inoculados y en condiciones de crecimiento.....	29
Figura 9. Etiquetado de las cajas Petri correspondientes a los tratamientos con aceites esenciales.....	30
Figura 10. Suspensiones de esporas con tratamientos (Ae)	32
Figura 11. Morfología de las esporas tomadas del envés de hojas infectadas	33
Figura 12. Electroforesis en ENDURO™ GDS Gel Documentation.	34
Figura 13. Cuantificación de la muestra amplificada mediante PureLink™ (invitrogen).....	35
Figura 14. Resultado de la secuenciación de <i>H. vastatrix</i>	36
Figura 15. Cinética de crecimiento de <i>H. vastatrix</i> en condiciones in vitro	37
Figura 16. Crecimiento de <i>H. vastatrix</i> con el aceite de mandarina	38
Figura 17. Crecimiento de <i>H. vastatrix</i> con el aceite de naranja.....	39
Figura 18. Crecimiento de <i>H. vastatrix</i> con el aceite de limón	40
Figura 19. Crecimiento nulo de <i>H. vastatrix</i> en los controles negativos y blancos	41
Figura 20. Curva de decaimiento del área de infección por concentración de aceite esencial e Índice EC50.....	43
Figura 21. Germinación de esporas con aceite de mandarina.....	44
Figura 22. Germinación de esporas con aceite de naranja	44
Figura 23. Germinación de esporas con aceite de limón	45
Figura 24. Germinación de esporas en los controles positivo, negativo y blanco	46

Índice de anexos

Anexo 1. Aceites esenciales utilizados.	71
Anexo 2. Composición de los aceites esenciales.	72
Anexo 3. Cajas Petri utilizadas ubicadas en la cámara de ensayos en condiciones controladas.	74
Anexo 4. Registro de datos del diámetro infectado en el software Image J.	75
Anexo 5. Certificado de traducción del abstract.	76

1. Título

Evaluación del potencial inhibitorio de aceites esenciales de plantas cítricas contra el crecimiento de *Hemileia vastatrix* (roya del café) en condiciones *in vitro*

2. Resumen

El cultivo de café es fundamental en la economía de Ecuador; sin embargo, enfrenta desafíos significativos dada su susceptibilidad al ataque de plagas y enfermedades, como la roya del café (*Hemileia vastatrix*), la cual puede causar reducciones de rendimiento de hasta el 50%. Los mecanismos de control como plaguicidas químicos, no brindan una eficacia sostenida debido a la variabilidad fisiológica del patógeno y además generan efectos ambientales adversos. Este estudio tiene como objetivo evaluar el potencial inhibitorio de tres aceites esenciales cítricos contra el crecimiento y desarrollo de *H. vastatrix*. La metodología constó de tres etapas: la identificación molecular de esporas, la generación de la curva de crecimiento en condiciones *in vitro*, y la evaluación del potencial inhibitorio de los aceites esenciales mediante el índice EC50. Los resultados mostraron concordancia con las descripciones del patógeno en cuanto a su morfología y curva de crecimiento, aunque se enfrentaron dificultades en la identificación de su genoma. En la tercera etapa, se observaron reducciones importantes en el diámetro de las colonias a partir de la concentración mínima (0,025%), siendo el aceite esencial de limón el de mayor eficacia, con una reducción del 95,45% (EC=0.004), seguido por los aceites de mandarina y naranja con 66,33% (EC=0.01160), y 48% (EC=0.02017) respectivamente y aumentando hasta un 99% en la concentración máxima (0,8%). Los aceites esenciales estudiados demostraron un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento y desarrollo de *H. vastatrix* en condiciones *in vitro*, así como sobre la germinación de esporas, sugiriendo su potencial como una alternativa viable para el control de la roya del café, en la búsqueda de moléculas altamente específicas que ofrezcan una opción más sostenible y menos dañina para el medio ambiente.

Palabras clave: *Hemileia vastatrix*, inhibición, aceite esencial, cítricos, *in vitro*

Abstract

Coffee planting is fundamental in the economy of Ecuador; however, it deals with significant challenges due to its susceptibility to attack by pests and diseases, such as the coffee rust (*Hemileia vastatrix*), which can cause yield reductions of up to 50%. Control mechanisms such as chemical pesticides do not provide a sustained efficacy because of the physiological variability of the pathogen and in addition to this they generate adverse environmental effects. The objective of this study is to evaluate the inhibitory potential of three citrus essential oils against the growth and development of *H. vastatrix*. The methodology consisted of three stages: molecular identification of spores, generation of the growth curve under in vitro conditions, and evaluation of the inhibitory potential of the essential oils using the EC50 index. The results showed agreement with the descriptions of the pathogen regarding its morphology and growth curve, although difficulties were encountered in the identification of its genome. In the third stage, significant reductions were observed in the colony diameter from the minimum concentration (0.025%), with the lemon essential oil being the most effective, with a reduction of 95.45% (EC=0.004), followed by mandarin and orange oils with 66.33% (EC=0.01160) and 48% (EC=0.02017), respectively, increasing up to 99% at the maximum concentration (0.8%). The studied essential oils demonstrated a significant inhibitory effect on the growth and development of *H. vastatrix* under in vitro conditions, as well as on the spore germination, suggesting their potential as a viable alternative for controlling the coffee rust, in the search of highly specific molecules that offer a more sustainable and less harmful option for the environment.

Keywords: Ecosystems, Distribution of ecosystems, Climate change scenarios, biodiversity

3. Introducción

El café, originario de Etiopía, se expandió por el mundo árabe en el siglo XV, llegando a Europa en el XVII y siendo introducido en América en el XVIII (Enríquez et al., 2020; Tocancipá-Falla, 2002). Actualmente, es una de las bebidas más consumidas a nivel global, con una historia que ha marcado profundamente la sociedad, cultura y comercio (Echeverri et al., 2005).

A nivel mundial, el café es uno de los cultivos más significativos, generando réditos anuales superiores a los 15 mil millones de dólares (Canet et al., 2016) y apoyando la subsistencia de más de 20 millones de personas como segundo producto de exportación más importante (García, 2013). Más del 60% de la producción global se concentra en América Latina (Macías, 2018); en Ecuador es uno de los cultivos que más ingresos genera por sus exportaciones (Barrezueta-Unda et al., 2018), gracias a las más de 199,215 hectáreas cultivadas, de las cuales el 68% es de la especie *Coffea arabica* y el 32% de *Coffea canephora* (Steeven Arreaga-Ronquillo et al., 2021). La producción de café en sistemas agroforestales (SAF) beneficia al medio ambiente al mantener la fertilidad del suelo, conservar el agua y la biodiversidad en paisajes fragmentados, así como capturar carbono y reducir la erosión (Montagnini et al., 2015; Beer et al., 2003).

Sin embargo, también enfrenta desafíos críticos al igual que otros cultivos, entre los cuales destacan fitopatologías, cambio climático, inestabilidad de precios, fenómenos naturales, entre otros, que ponen en peligro su producción (Ponce Vaca et al., 2016). La susceptibilidad de la planta al ataque de plagas y enfermedades (García, 2013) plantea nuevos retos sobre su producción como el bajo rendimiento (Juarez et al., 2010), aumento de costos vinculados al control de enfermedades, resistencia a fungicidas, impactos ambientales, insostenibilidad de prácticas agrícolas tradicionales y efectos en la demanda de productos. Enfrentar estos desafíos se convierte en una tarea crucial para los cultivadores, ya que deben precautelar su inversión inicial y buscar estrategias efectivas para mitigar los efectos perjudiciales causados, como la clorosis, la marchitez o incluso la pérdida total de las plantaciones (Spren et al., 2013).

La roya del café, originada por el hongo patógeno obligado *Hemileia vastatrix*, representa una de las enfermedades más perjudiciales para los cultivos de café, conlleva la pérdida temprana del follaje y, si no se controla adecuadamente, puede resultar en la muerte de la planta. La defoliación de las hojas infectadas reduce significativamente el rendimiento hasta

en un 50%, afectando gravemente la producción de café (Palacios-Reyes et al., 2023). Se considera como una de las siete enfermedades más catastróficas de las plantas tropicales por su capacidad para acabar con plantaciones enteras cuando avanza hasta un nivel severo (Kushalappa y Eskes, 2019). Las especies de *Coffea arabica* y *Coffea liberica* son sus principales hospederos, los mismos que pueden ser infectados por diferentes razas fisiológicas del hongo (Araño-Leyva y Rodríguez-Patterson, 2017), debido a que existen individuos con diferentes cantidades de genes de virulencia en la población de *Hemileia vastatrix* y a nivel global se han reportado más de 50 tipologías de razas fisiológicas (Quispe-Apaza et al., 2017a).

En la provincia de Loja se han identificado los morfotipos I, II y III de *H. vastatrix* (Calderón, 2016). Desde su aparición en el año 2012, la roya ha sido un problema persistente a lo largo de los años al afectar de manera significativa la producción de café en Loja, generando pérdidas económicas importantes para los caficultores locales (MAG, 2020). Según Bustamante (2013), la combinación de la roya con otros desafíos como el contrabando y la fluctuación de precios ha complicado aún más la situación. Estos problemas se agravan con los cambios drásticos en el clima, el aumento y resistencia de plagas y la debilidad gremial; lo que resulta en una disminución significativa en el rendimiento por hectárea (Cumbicus, 2012). Otros problemas de los cafetales lojanos es la presencia de plantaciones longevas, reducida área de cultivo y plantaciones con mayor susceptibilidad al ataque de plagas y enfermedades (Bustamante, 2013).

En los cultivos de café, la medida de control más accesible y común de la roya es el uso de productos a base de cobre o el cultivo de ejemplares resistentes (Correa, 2014). Sin embargo, la variabilidad fisiológica del patógeno dificulta la resistencia en el tiempo (Herrera et al., 2009) de modo que la mayoría de las áreas están sembradas con cultivos susceptibles. Esto fomenta el uso de plaguicidas químicos sistémicos o de contacto, aplicados en diferentes estados fenológicos de la planta, cuya efectividad es baja y no controlan por completo la enfermedad (Pérez López, 2012). La aplicación de productos químicos puede afectar colateralmente a organismos no considerados como objetivos (Patyka et al., 2016), como los microorganismos promotores del crecimiento vegetal, que contribuyen a la regulación de fitopatógenos (Castillo-Reyes et al., 2015); además, pueden provocar impactos medioambientales negativos debido a su residualidad y baja degradabilidad (Olea y Fernández, 2001). La corta duración de su eficacia, conduce al apareamiento de poblaciones de plagas y patógenos resistentes, generadas mediante un proceso de selección por el uso constante y excesivo de estos plaguicidas (Vargas-

González et al., 2019), y que adquieren resistencia en diferentes niveles, producida por mutaciones genéticas (Ishii y Hollomon, 2015). Por otro lado, generan una contaminación ambiental evidente, al pasar a la atmósfera o ser retenidos en el suelo por periodos prolongados de tiempo, acumularse en el agua o los alimentos (Martínez, 2011) (Pinedo Taboada, 2021) y producir efectos adversos en la salud de las personas por contacto e inhalación y dar paso a malformaciones congénitas o incluso cáncer (Wolansky, 2011).

Ante la reducción de fungicidas aprobados y en línea con las regulaciones ambientales y de salud, existe una creciente demanda de investigaciones que busquen soluciones innovadoras, eficaces y sostenibles para el control de enfermedades como la roya del café (Martínez, 2011). Este fenómeno ha impulsado un mayor interés en la investigación de fungicidas botánicos, debido a su capacidad para contrarrestar los efectos negativos de los fungicidas sintéticos, reduciendo así la presencia de residuos en los alimentos, la contaminación ambiental y la resistencia de los patógenos (Pérez-Soto et al., 2015). Por consiguiente, el empleo de derivados botánicos emerge como una alternativa prometedora, respaldada por los principios activos presentes en las plantas. Estos principios incluyen mecanismos de defensa como la lignificación y suberización (Montes, 2009), así como procesos químicos como la síntesis de fitoalexinas, que se acumulan en el sitio de penetración del patógeno, conduciendo a la apoptosis (Ordeñana, 2002) (Villa-Martínez et al., 2015). Además, los metabolitos secundarios sintetizados por las plantas, como fenoles, terpenos, alcaloides y aceites esenciales, pueden dañar las biomembranas y afectar los procesos vitales de las células del patógeno (Lauzardo et al., 2007). Dada la rápida propagación y agresividad de *H. vastatrix*, así como sus devastadoras consecuencias en los cultivos, la identificación de estos objetivos se vuelve de suma prioridad (Maia et al., 2017).

En los últimos años, el estudio de los aceites esenciales ha cobrado mayor relevancia debido a sus diversas propiedades beneficiosas, tales como su capacidad antibacteriana, fungicida y antioxidante (Argoti et al., 2017), antivirales (Ordaz-Trinidad et al., 2018), antimicrobianos (Solares et al., 2017), y repelentes (Deza Borau, 2019; Durán Aguirre et al., 2020; Ringuelet et al., 2014). Estos productos representan una opción efectiva en una amplia gama de condiciones, especies de plagas y sistemas de cultivo (Mesa et al., 2019), y sirven como base para el desarrollo de moléculas específicas dirigidas a identificar objetivos enzimáticos que, mediante su actividad enzimática, puedan alterar el ciclo infeccioso de *H. vastatrix* sin afectar al cultivo u otros organismos (Cardona Serrate, 2020).

La presente investigación forma parte del Proyecto "Identificación de targets moleculares para el desarrollo de inhibidores enzimáticos en el control de la roya del café (*Hemileia vastatrix*)", y tiene como objetivo evaluar el potencial inhibitorio de los aceites esenciales de tres cítricos en diferentes concentraciones contra el crecimiento de *Hemileia vastatrix*, el hongo causante de la roya del café. Mediante ensayos *in vitro*, buscamos proporcionar evidencia científica que impulse la búsqueda de objetivos enzimáticos de estos aceites en el control de esta enfermedad que afecta gravemente los cultivos de café, y sentar precedentes para el desarrollo de fungicidas botánicos que puedan utilizarse en la lucha contra este y otros hongos reduciendo los impactos negativos asociados al uso de plaguicidas sintéticos; por ello, la pregunta de investigación planteada es: "¿Cuál es el potencial inhibidor de los aceites esenciales de plantas cítricas contra el crecimiento de *Hemileia vastatrix* y desarrollo de la roya del café en el tejido foliar de *Coffea arabica* en condiciones *in vitro*?"

Con ello se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Evaluar el potencial de inhibición de aceites esenciales de plantas cítricas contra crecimiento y desarrollo de *Hemileia vastatrix*, causante de la roya del café, en condiciones *in vitro*.

Objetivos específicos:

- Realizar la identificación molecular de esporas de la roya del café.
- Obtener la curva de crecimiento de *Hemileia vastatrix* en condiciones *in vitro*.
- Identificar el potencial de inhibición de aceites esenciales de plantas cítricas contra el crecimiento de *Hemileia vastatrix* y el desarrollo de la roya del café mediante el índice EC 50.

4. Marco Teórico

4.1. El café

El café es una bebida, producto de la infusión de semillas de cafeto tostadas y procesadas, constituye un mercado en expansión que genera beneficios económicos en todos los niveles de la cadena de valor a nivel global, desde productores hasta consumidores. En las últimas dos décadas, la producción mundial de café ha experimentado un notable incremento, aumentando aproximadamente un 61% entre 1990 y el período 2012-2016 (OIC, 2018).

El cafeto, un arbusto tropical con hojas verdes, forma parte de la familia *Rubiaceas* y género *Coffea spp.* Se desarrolla en zonas de humedad moderada y altitudes que oscilan entre 600 y 1.200 metros. Abarca 500 géneros y más de 6000 especies, siendo la Arábica y Robusta las más cultivadas. Al madurar, produce frutos carnosos rojos o púrpuras conocidos como cerezas de café, que poseen dos núcleos y cada uno contiene un grano o semilla de café de color verde (Pérez-Soto et al., 2015).

4.2. Origen y evolución del café

El café se originó en África, en la ciudad de Kaffa, de la cual se deriva su nombre. Se conoce que se produjo de forma silvestre en el altiplano de Abisinia, actual Etiopía. En el siglo XIII se popularizó como una bebida estimulante debido a la restricción islámica de bebidas alcohólicas. En el siglo XV, fue introducido a Persia, Egipto y Turquía por los musulmanes. Posteriormente, llegó a Europa en el siglo XVII por los mercaderes venecianos, transformándose en una bebida de gran demanda. En el siglo XVIII, los grandes cultivos se desplazan a Ceilán, Indonesia y América del Sur, en esta última, Brasil se constituye como la sede de la primera plantación en 1727 (Alvarado y Rojas, 1994).

Actualmente, el café es cultivado en más de 70 países del mundo, siendo Brasil, Colombia, Indonesia, India y Vietnam los pioneros en su producción (Pérez-Soto et al., 2015). La introducción del café en Ecuador se remonta al siglo XIX, y para la década de 1970 se convirtió en uno de los principales cultivos de exportación del país. La provincia de Manabí, se destacó como una zona de tierras versátiles para grandes cultivos de café. Gracias a su ubicación geográfica estratégica, Ecuador se encuentra en el ranking de productores con un potencial de crecimiento en cafés especiales a nivel mundial.

4.3. Cultivo de café en Ecuador

Ecuador es reconocido como uno de los pocos países en el mundo donde es posible cultivar café en prácticamente toda su extensión territorial, debido a sus aptitudes agroecológicas privilegiadas de Ecuador facilitando el cultivo de café desde la provincia de Loja hasta la zona del Carchi, e incluso en las islas Galápagos. Según el INIAP (2013), Tungurahua es el único territorio identificado donde no se cultiva café.

En Ecuador, el café se introdujo en 1830, cuando los primeros cafetos de la variedad típica (café Arábica) se ubicaron en los recintos de Las Maravillas y El Mamey, en el cantón de Jipijapa, en la provincia de Manabí. Para el año de 1951 llegó el café Robusta al país, iniciando su producción en la Estación Experimental Tropical Pichilingue, en Quevedo, provincia de Los Ríos (MAG, 2020).

Las primeras exportaciones de café en el país comienzan en 1903 y empiezan a crecer a partir de 1960. Actualmente, este producto se integra en la lista de productos clave en las iniciativas de comercio exterior y producción libre de deforestación, respondiendo a la demanda en Europa y en el continente asiático (INIAP, 2014).

Las zonas productoras de café arábigo más significativas del país se sitúan en las provincias de Manabí, Loja, El Oro, Zamora Chinchipe, Morona Santiago, Pastaza, Bolívar, Chimborazo, Azuay, Cañar, Cotopaxi, Pichincha, Santo Domingo, Imbabura, Carchi, Los Ríos, Guayas Esmeraldas y Galápagos (INIAP, 2014). El café ecuatoriano contribuye significativamente a la economía del país y es parte fundamental de su sector agrícola. Se trata de un cultivo de gran importancia económica, con un total de 199,215 hectáreas cultivadas, según datos de PROECUADOR en 2019. De esta área cultivada, el 68% corresponde a la especie *Coffea arabica*, mientras que el 32% corresponde a *Coffea canephora* (PROECUADOR, 2019).

Los suelos de los distintos cantones de la provincia de Loja, son aptos para el cultivo de café, pues posee altitudes desde los 800 hasta los 2000 msnm. Su producción ha sido reconocida como una importante contribución a la economía local y regional, lo que ha permitido a los productores obtener precios superiores en el mercado internacional, dando paso a que el café lojano sea un referente destacado dentro de la industria cafetalera a nivel nacional, presente en las mejores cafeterías especializadas alrededor del mundo. (MAG, 2020).

Sin embargo, la producción de café puede afrontar diversos desafíos que incluyen plagas y enfermedades. La terminología “plagas” se refiere a la presencia de insectos que atacan los frutos cuando alcanzan la madurez. Por otro lado, las enfermedades pueden afectar el crecimiento y desarrollo de las plantas. Entre las enfermedades más comunes se encuentran el mal de hilachas, el ojo de pollo y la roya del café (CEPAL, 2013). Esta última, ha sido reconocida como una enfermedad de gran relevancia que genera un impacto notable en la productividad, provocando disminuciones drásticas en los rendimientos de los cultivos de café (Batista, 2018).

4.4. La roya del café

El nombre científico del hongo que causa la Roya del café es, *Hemileia vastatrix*; deriva del latín "vastare" o "vastador" (*vastatrix*) y "mitad lisa" (*hemileia*), haciendo referencia a la mitad lisa de sus esporas y su devastador efecto en los cafetos (Hernández, 2017). Se trata de un hongo patógeno obligado, perteneciente al reino *Fungi*, filo *Basidiomycota*, orden *Pucciniales* y familia *Mikronegeriaceae*.

H. vastatrix se dirige a las especies del género *Coffea*, impactando principalmente las hojas maduras vivas y, en casos de infección severa, también afecta las hojas jóvenes (Batista, 2018). Una vez que las hojas se ven comprometidas, se produce una caída masiva o una disminución en su capacidad fotosintética, lo que puede llevar a la regresión o muerte de las ramas o incluso de la planta en su totalidad. Las variedades de café que son más susceptibles a este patógeno son: Caturra, Catuaí, Bourbon, Típica, Pache, entre otras. (Sistema Nacional De Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria 2013).

Se originó en las montañas de Etiopía y Uganda, en el noroeste de África, en 1869. Luego, se propagó por todo el continente africano y asiático, ocasionando importantes pérdidas en las plantaciones de café (Subero, 2005). En Ceilán, actual Sri Lanka, se emitió el primer reporte sobre la enfermedad, en donde afectó la exportación de 41 855 toneladas en 1879, que descendió a 9 000 toneladas en 1884 y 2 300 toneladas en 1893 (Avelino y Rivas, 2013).

La llegada de la roya a América generó una gran preocupación entre los productores de café. En 1970, se informó de la presencia de esta enfermedad en todas las variedades arábica en Brasil, y posteriormente se extendió a otros países de la región, como Costa Rica, Nicaragua, El Salvador, Honduras, Guatemala, Panamá, Colombia, Brasil, el Caribe, Perú y Ecuador. En 2012, la epidemia de la roya afectó gravemente a los países de Centroamérica y América del

Sur. En 2013, Perú y Ecuador experimentaron una reducción significativa en la cantidad y calidad de la producción de café, además de sufrir importantes pérdidas económicas y daños en las plantaciones debido a esta enfermedad (Subero, 2005).

4.5. Impacto económico y productivo

La roya del café ha representado un desafío significativo para la industria cafetalera en Ecuador, con registros de la enfermedad que datan desde 1981 en Zamora Chinchipe, seguido de detecciones en Loja y El Oro en 1983. Durante el período de 2002 a 2011, la producción de café en Ecuador mostró una tendencia creciente, pero en 2012 se produjo una caída drástica del 69% en comparación con el año anterior, atribuida principalmente a la disminución de la superficie plantada y el rendimiento.

En 2013, una epidemia de roya afectó a los cafetales de Ecuador y Perú (Libert-Amico et al., 2018), causando la pérdida del 30% de la cosecha de café a nivel nacional. Como respuesta a esta crisis, el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) decretó el estado de emergencia para el sector cafetalero del Ecuador, con el objetivo de mitigar los efectos negativos causados por el hongo de la roya (*Hemileia vastatrix*) en las provincias cafetaleras del país.

Esta enfermedad continúa impactando la producción, especialmente en variedades susceptibles como Típica, Caturra, Bourbon, Villalobos, Catuaí, San Salvador y Pache (Duicela Guambi & Ponce Vaca, 2015); comprometiendo su estabilidad económica y disminuyendo la calidad del producto. Además, el uso excesivo de químicos para combatir esta enfermedad ha generado preocupaciones sobre la contaminación ambiental (Mantuano et al., 2022).

4.6. Ciclo de vida de *H. vastatrix*

El ciclo de vida de *Hemileia vastatrix* consta de 5 etapas: i) Diseminación, ii) Germinación, iii) Penetración, iv) Colonización y v) Colonización. Durante la primera etapa, la roya del café se disemina a través de uredosporas, las cuales llegan al envés de las hojas y se establecen dentro de la planta, generando un polvillo amarillo o naranja característico de la infección. Esta etapa se inicia con la liberación de uredosporas, dispersión e infección de hojas nuevas (Rivillas et al., 2011).

En la fase de germinación, *H. vastatrix* se deposita en el reverso de la hoja y en un lapso de 6 a 12 horas emite cuatro tubos germinativos. Para multiplicarse, el hongo requiere temperaturas cercanas a 28°C y condiciones adecuadas de humedad y luz. Una vez que obtiene los nutrientes necesarios, se reproduce y desencadena los síntomas característicos en la planta. La duración de esta etapa bajo el sol es de 21 a 24 días y bajo sombra 18 a 22 días (Rivillas et al., 2011).

En la tercera etapa, el hongo ingresa a la planta a través de los estomas, prefiriendo aquellos bien desarrollados. Las hojas jóvenes son más receptivas a la infección en comparación con las hojas adultas, resultando en menos heridas de inoculación en estas últimas. Esta preferencia del hongo por las hojas jóvenes indica una mayor capacidad para infectar y establecerse en ellas (Avelino y Rivas, 2013).

La infección se produce cuando las hifas del hongo ingresan y se desarrollan en las hojas, dando inicio a la fase de colonización de la planta. Las hifas germinan y dan lugar a la formación de lesiones amarillentas características. Es importante señalar que hay una etapa de incubación en la que no se observa actividad infecciosa visible, pero durante la cual el hongo se desarrolla internamente en la planta (Porto et al., 2019).

Finalmente, la esporulación de la roya del café sigue un ciclo de aproximadamente 10 a 14 días, durante el cual se desarrollan nuevas uredinias y se producen nuevas urediniosporas. Durante un período de 2 a 3 semanas, los daños causados por la esporulación se intensifican. En este tiempo, se estima que se dispersan alrededor de 300.000 esporas en un lapso de 5 meses, a través de 6 ciclos de esporas, como resultado de las lesiones causadas por el hongo. Estas esporas contribuyen a la propagación y diseminación de la enfermedad en las plantaciones de café (Avelino y Rivas, 2013).



Figura 1. Ciclo de vida de *H. vastatrix*.

4.7. Urediniosporas

Las urediniosporas de *H. vastatrix* son microscópicas (30 mm de largo y 20 mm de ancho), poseen forma angosta y triangular redondeada, aunque algunas pueden tener forma piramidal. Tienen una pared corta convexa a lo ancho y, en menor medida, a lo largo de la espora. Las dos partes laterales que entran en contacto son casi planas, a excepción del ápice y la base que son redondeados. La parte más redondeada está cubierta por pequeñas espinas erectas de 3 a 4 micrómetros de grosor, que son menos densas en la parte lisa de la espora (Deepak, 2012). Se dispersan en grandes cantidades, formando un polvillo distintivo de color amarillo a anaranjado (Rivillas et al., 2011).

Los efectos de la infección se manifiestan a medida que las esporas se dispersan y el hongo se multiplica, ya que estas últimas son los órganos reproductores de la enfermedad y emergen en un período de 3 a 12 horas; requieren de un tubo germinativo que se desplaza sobre una gota de agua hasta encontrar el envés de una hoja con estomas accesibles. Una vez allí, comienzan a desarrollarse a través de los espacios intercelulares, formando estructuras llamadas haustorios, que les permiten alimentarse del tejido de la hoja. Aproximadamente luego de 10 a 15 días, aparecen manchas amarillentas en la hoja, que eventualmente adquieren un color café (Avelino y Rivas, 2013).

4.8. Identificación de *Hemileia vastatrix*

La presencia de *H. vastatrix* en las plantas de café se manifiesta a través de signos visuales como clorosis (amarillamiento de las hojas), necrosis (muerte de los tejidos), marchitez, pudriciones secas o húmedas, disolución de tejidos y crecimiento anormal. Estos síntomas están vinculados a desequilibrios fisiológicos, como la alteración en la fotosíntesis o respiración, el aumento de transpiración y la inmovilización de nutrientes, hormonas o precursores de vías metabólicas (Gomez, 2015). Según Rozo-Peña y Cristancho-Ardila (2011), es posible distinguir la infección por *H. vastatrix* de otros hongos fitopatógenos mediante identificación morfológica y pruebas moleculares.

Identificación morfológica

Los aislamientos se identifican morfológicamente en base a la forma y dimensiones de uredosporas. Mediante el examen microscópico de las estructuras características del hongo, se puede confirmar la presencia de *H. vastatrix* en la planta infectada.

Pruebas moleculares

El uso de técnicas de biología molecular, como la amplificación de fragmentos de ADN específicos del hongo mediante la reacción en cadena de la polimerasa, puede ayudar a identificar y diferenciar *H. vastatrix* de otros hongos patógenos presentes en las plantas de café.

4.9. Tratamientos para la roya de café

El manejo tradicional de la roya del café se basa en el uso de fungicidas sistémicos, como triazoles, estrobilurinas e hidróxido de cobre, aplicados mediante un cronograma detallado para la prevención y monitoreo de la enfermedad y cuyo objetivo principal es controlar la propagación de la roya y minimizar los daños en las plantaciones de café (Ishii y Hollomon, 2015). Sin embargo, su uso conlleva una serie de efectos colaterales, como la contaminación de sustratos, destrucción de hábitats, efectos tóxicos sobre la fauna, contaminación de aguas superficiales y subterráneas, biomagnificación, pérdida de biodiversidad, erosión y degradación del suelo, entre otros (García, 2016).

Con el compromiso de reducir los efectos derivados de los plaguicidas sintéticos, numerosos estudios se han enfocado en evaluar la eficacia de productos ecológicos en el tratamiento de plagas y enfermedades fúngicas (Caetano et al., 2020). Estos fungicidas naturales se caracterizan por su bajo potencial tóxico, alta eficiencia y la ausencia de residuos dañinos en el ambiente.

De acuerdo a Silva et al. (2014), el control de plagas con productos ecológicos presenta un menor impacto ambiental y humano debido a su baja toxicidad, lo que reduce el riesgo de contaminación y protege la salud pública. Además, al ser compuestos biodegradables, los bioplaguicidas ofrecen seguridad relativa para los organismos benéficos y reducen el riesgo de generación de resistencia en comparación con los fungicidas sintéticos (Fajardo-Franco et al., 2020). Su uso se alinea con las restricciones de la sostenibilidad en la agricultura moderna,

mitigando los costos sociales y ecológicos asociados con el uso de insecticidas sintéticos (Devine et al., 2008).

Desde una perspectiva económica, según Celis et al. (2008) y García (2016), los biopesticidas son opciones de menor costo en comparación con los fungicidas sintéticos, lo que los hace más accesibles para los productores. Además de resolver el problema de bajo rendimiento en los cultivos, su uso en la producción orgánica del café puede aumentar su valor en el mercado mundial, permitiendo a los productores acceder a mercados orgánicos altamente demandados y valorados.

Para el control de *H. vastatrix*, se han explorado diferentes métodos botánicos. Por ejemplo, Fajardo-Franco et al. (2020), investigaron el uso de biofungicidas elaborados con Neem (*Azadirachta indica*), árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*) y Clavo de Olor (*Syzygium aromaticum*). Otro enfoque evaluado ha sido el uso de extractos; Silva et al (2014), evaluaron la eficiencia del extracto de ajo (*Allium sativum*) y extracto de Yerba de cabra (*Vernonia polysphaera*), ambos demostraron inhibiciones de la germinación de esporas superiores al 92%. Extractos supercríticos, como el de orégano (*Lippia graveolens*) fueron estudiados por Rodas Arzét et al. (2015), mostrando resultados prometedores para el tratamiento de esta plaga.

4.10. Actividad de aceites esenciales

Dentro de los biofungicidas, se ha analizado también el empleo de aceites esenciales, los cuales poseen una amplia variedad de principios activos con propiedades antifúngicas, incluyendo terpenoides, iridoides, sesquiterpenos, saponinas, compuestos azufrados o nitrogenados (alcaloides, aminos, amidas), alifáticos y aromáticos (fenoles, flavonoides, estilbenos, bibenzilos, xantonas y benzoquinonas), sesquiterpénicas, cumarinas, indoles, bibenzilos, derivados del ácido antranílico, estilbenos, flavanonas, diterpenos, antocianidinas, cromonas, isoflavonas, isoflavonoides, antraquinonas, fenilpropanoides y sesquiterpenos (Montes, 2009).

La eficacia de aceites esenciales se atribuye a su complejidad química, que favorece la sinergia entre sus componentes y aumenta su efectividad en el control de hongos. A pesar de que su uso ha sido limitado debido a que la industria agrícola encuentra más eficaz la producción de compuestos sintéticos, en los últimos años el estudio y la aplicación de los aceites esenciales para el control de hongos fitopatógenos se ha intensificado (Pérez-Soto et al., 2015).

Son relevantes estudios como los realizados por; Pawar y Thaker (2007), Necha y Barrera (2009), y Villa-Martínez et al. (2015), quienes demostraron la eficacia de aceites esenciales de plantas como canela, epazote, hierbabuena, ruda y tomillo en el control del hongo *Fusarium oxysporum f. sp. cicer*.

Para *H. vastatrix*, Pereira et al. (2012a) examinaron el efecto in vitro de varios aceites esenciales, incluyendo canela, citronela, limoncillo, clavo, árbol de té, tomillo, neem y eucalipto, sobre la germinación de uredinosporas de *H. vastatrix*. Silva et al., 2014 evaluó la eficiencia del aceite esencial de Hierba limón (*Cymbopogon citratus*), en ambos casos la inhibición de germinación de esporas superó el 97%. Por otro lado, Rodríguez-Peña (2022) evaluó aceites esenciales de la familia Myrtaceae y propiconazole, los cuales demostraron reducir el porcentaje de germinación de las uredosporas incluso en concentraciones tan bajas como el 0.02%.

Los aceites esenciales desempeñan un papel crucial como agentes protectores de las plantas contra una variedad de amenazas, incluyendo bacterias, virus, hongos e insectos, así como en la atracción o repulsión de ciertos insectos para la dispersión de polen o semillas, con el fin de evitar efectos no deseados (Usano-Alemanly et al., 2014).

4.11. Aceites esenciales de plantas críticas

Los cítricos pertenecen a la clase Angiospermae, a la subclase dicotiledónea, a la orden *rutae* y a la familia *rutacea*, las cuales poseen un alto contenido en vitamina C y ácido cítrico en sus frutos. Además, se clasifican dentro del género *Citrus*, el cual incluye especies como la naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*), limón (*Citrus aurantifolia*), y pomelo (*Citrus paradisi*) (Grosse R et al, 2000).

Los aceites esenciales consisten principalmente en monoterpenos, siendo los más usuales son el limoneno y el mentol. Empleados frecuentemente por sus características aromáticas, propiedades antibacterianas o en ámbitos como la medicina tradicional y los remedios herbolarios (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009). Los aceites esenciales de plantas cítricas, exhiben un elevado contenido de limoneno (90%-96%), y en menor proporción, otros monoterpenos oxigenados como linalol (1%-2%) y cineol (1%). Estos compuestos han mostrado capacidad para inhibir el crecimiento de diversos hongos que afectan a las plantas (Alzate et al, 2009).

4.12. Perspectivas futuras en la producción de café

Las problemáticas derivadas de las enfermedades de café demandan una atención urgente y un enfoque científico riguroso para su manejo. En este sentido, es fundamental establecer perspectivas futuras y áreas de investigación que impulsen y salvaguarden la producción de café. En la investigación actual, un área importante es el manejo integrado de plagas y enfermedades (Ramírez Rojas & Cerda, 2021). Este enfoque busca desarrollar y perfeccionar métodos de control biológico, cultural y químico para gestionar las plagas y enfermedades de manera sostenible y respetuosa con el medio ambiente; implica una comprensión profunda de los sistemas agrícolas, así como la evaluación continua de prácticas y tecnologías emergentes (Iglesias, 2009; Guharay, 2001).

Además, es imperativo explorar el papel de la biotecnología y la genética en la resistencia de las plantas a enfermedades (Ortega et al., 2023). La identificación y caracterización de genes asociados con la resistencia a enfermedades específicas podrían conducir al desarrollo de variedades de café más resilientes y adaptadas a condiciones cambiantes (Fernández et al., 2010; Moreno Ruiz, 2023; Villalta-Villalobos & Gatica-Arias, 2019). Asimismo, se requiere mayor investigación en la salud del suelo y microbiología agrícola para comprender la relación entre ellas y la incidencia de enfermedades en los cultivos de café (Gómez López, 2021). Implementar estrategias de manejo que promuevan la biodiversidad del suelo y la actividad microbiana podrían ayudar a mitigar el impacto de enfermedades y mejorar la salud de las plantaciones (León Avilés Doris, 2020).

El manejo de las enfermedades en los cultivos de café requiere un enfoque interdisciplinario que abarque varios campos técnicos, así como la colaboración entre científicos, agricultores y organismos gubernamentales para desarrollar estrategias integrales y sostenibles que protejan la producción de café.

5. Metodología

5.1. Área de estudio

El presente trabajo de investigación, de tipo descriptivo y experimental, se desarrolló en dos fases: fase de campo y fase de laboratorio.

La fase de campo se realizó en la Finca Agroecológica “El Naranja” (Figura 2), dedicada al cultivo de café arábigo de especialidad con características de cultivo orgánico, la misma que se encuentra ubicada en el cantón Quilanga, provincia de Loja (Figura 3).



Figura 2. Finca Agroecológica “El Naranja”

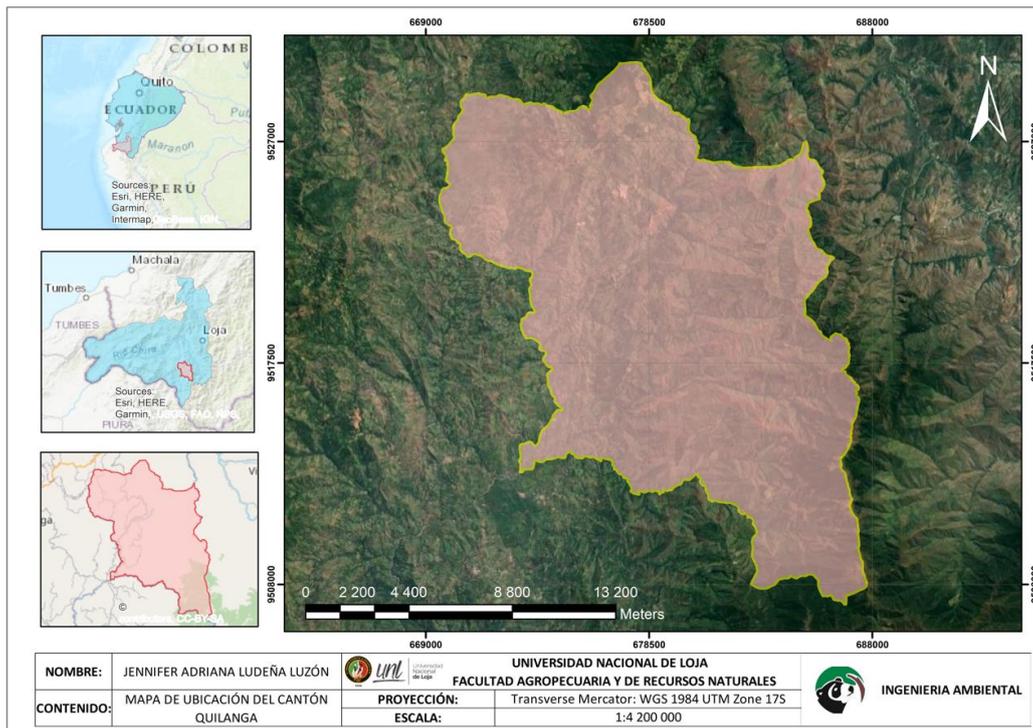


Figura 3. Ubicación del cantón Quilanga

El cantón Quilanga se encuentra ubicado en la parte sur de la Provincia de Loja a una distancia de 91 km de la ciudad de Loja. Presenta un clima templado subtropical, con una altura entre los 1140 hasta los 3406 msnm, una temperatura promedio de 19,8 °C y con una superficie

total de 268 km². Se caracteriza por la presencia de suelos con pendientes pronunciadas cubiertos por pastos, utilizados para sistemas silvopastoriles, suelos forestales y suelos agrícolas; estos últimos son aptos para los cultivos de caña de azúcar y café. Además, cuenta con cafetales que en su mayoría están cultivados bajo sistemas agroforestales, los mismos que abarcan una extensión de 624,02 ha (GAD Quilanga, 2023) y son de gran importancia ecológica y económica al constituir el hábitat de diferentes especies de flora y fauna nativas (García, 2018).

La segunda fase de este proyecto se desarrolló en el Laboratorio de Análisis Químico de la Universidad Nacional de Loja.

5.2. Metodología para el primer objetivo: “Realizar la identificación molecular de esporas de la roya del café”

Recolección de hojas infectadas

Estudios por publicar del Grupo de Investigación: Genética y Biología Molecular, sugieren que en las plantas que presentan infección, esta se da por un mismo morfotipo. De este modo, mediante un muestreo aleatorio simple, se recolectaron veinte hojas de *Coffea arabica* infectadas en la Finca Agroecológica “El Naranjo”, considerando la principal característica física de la infección por *Hemileia vastatrix*, tal como la presencia de polvillo amarillo o naranja (Figura 4 a). Además, se utilizó la escala diagramática de siete clases para severidad en hoja de Sinavef-Lanref (2015) para recolectar únicamente hojas que presenten una severidad mayor al 45% (Figura 4 b). Estas hojas se colocaron en fundas plásticas herméticas, separándolas con papel bond para evitar la pérdida de esporas y fueron trasladadas al Laboratorio de Análisis Químico de la Universidad Nacional de Loja.

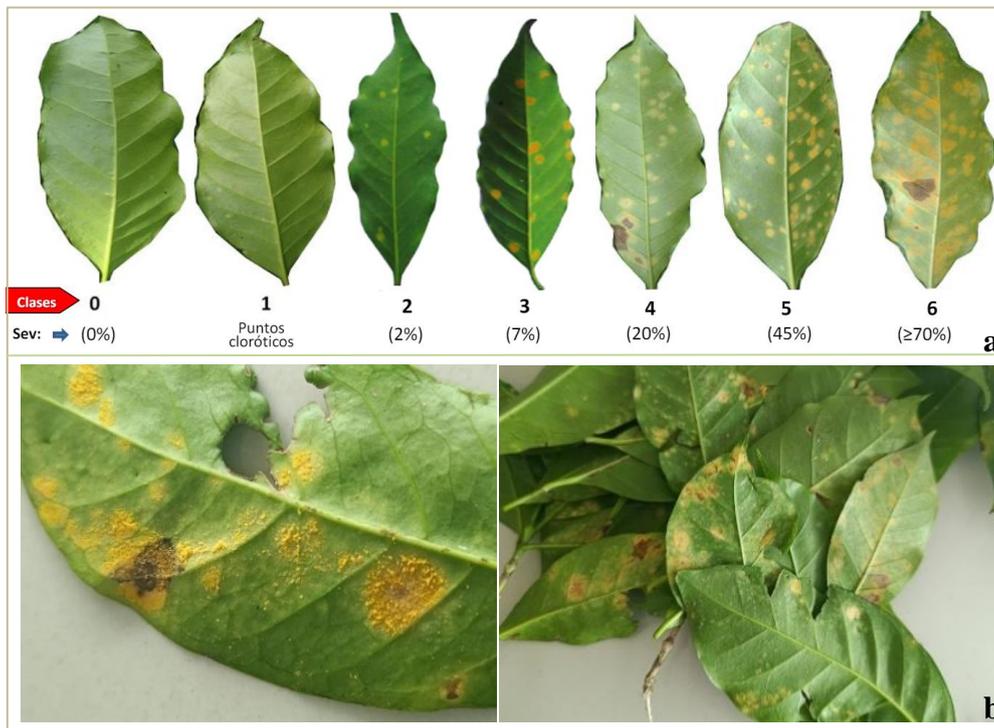


Figura 4. Hojas recolectadas con infección por *Hemileia vastatrix*, a) Escala diagramática de severidad de Sinavef-Lanref, b) Hojas con presencia de polvillo amarillo e infección mayor a 45%

Identificación morfológica de *Hemileia vastatrix*

Con las hojas infectadas recolectadas en campo, se realizó la identificación morfológica de *H. vastatrix* para corroborar la presencia de este hongo mediante sus esporas. Con un bisturí esterilizado se tomaron cuidadosamente las esporas de las hojas y se colocaron en un porta y cubre objetos que contenía 20 μL de agua destilada para facilitar la observación bajo el microscopio y la identificación de las esporas de *H. vastatrix* (Figura 5). Además, esto permitió observar detalles como el tipo de esporas, forma, tamaño, color y estructuras reproductivas.

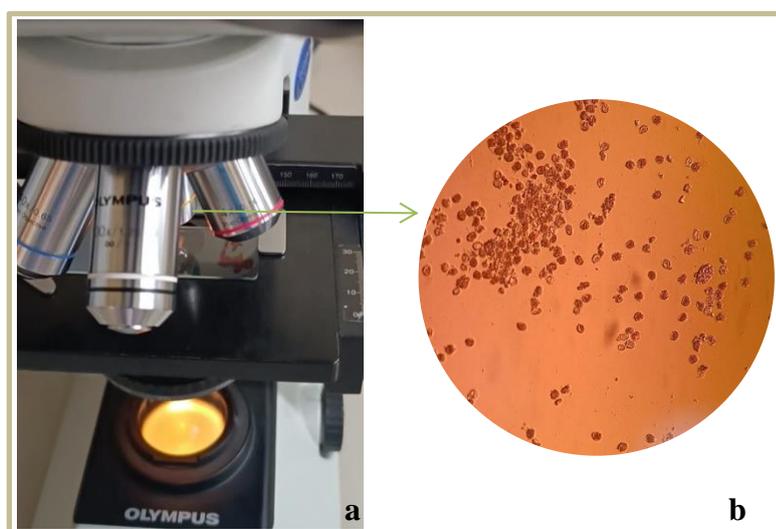


Figura 5. Identificación morfológica de las esporas de *H. vastatrix*, a) Microscopio binocular OLYMPUS, b) Esporas de *H. vastatrix* bajo el microscopio, lente de 20x.

Identificación molecular de *Hemileia vastatrix*

Para conocer la raza fisiológica de *Hemileia vastatrix* presente en este estudio, se desarrolló una identificación molecular.

Para esto, se realizó la extracción de ADN ribosomal mediante la técnica de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Se obtuvieron cuatro muestras de ADN de *Hemelia vastatrix*. Posteriormente se utilizó 1,0 μ L de producto de extracción de ADN de la muestra B para cuantificar en espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c. La Tabla 1 muestra la cuantificación de la muestra B.

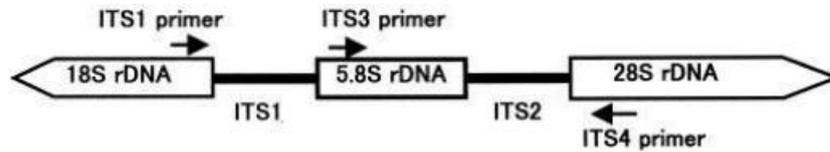
Tabla 1. Cuantificación de la muestra de ADN en NanoDrop™ 2000c

Muestra	Concentración	260/280	260/230
B	124,5 ng/ μ L	1,74	1,70

Nota: Las concentraciones altas en ocasiones necesitan diluirse para mejorar la PCR, en este caso la muestra normal no amplificó la PCR por lo que se realizó una dilución 1:10.

Amplificación por PCR región ITS1/ITS4

El ADN se amplificó mediante PCR usando primers universales ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3' (White et al., 1990) e ITS4 (5'TCCTCCGCTTA TTGATATGC-3' (White et al., 1990), esperando obtener un fragmento de 400 a 600 pb.



La amplificación por PCR se realizó con un volumen de 20 μ L. Se agregaron dos microlitros de muestra diluida (1 μ L en 9 μ L de H₂O), a la mezcla maestra de PCR, que consistía en 10 μ L de Phusion High Fidelity PCR master mix (Thermo Fisher Scientific) (1x), 0,5 μ L de cada cebador (25 pmol), 0,4 μ L BSA al 1% y el volumen restante consistió en agua ultrapura de grado molecular. La amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 98 °C durante 30 s; 35 ciclos de desnaturalización a 98 °C por 10 s, alineamiento a 60 °C por 20 s y extensión a 72 °C por 30 s; y una extensión final a 72°C por 10 min; para ello se utilizó el Applied Biosystems™ Termociclador MiniAmp. Se llevaron a cabo simultáneamente reacciones de control negativo sin ningún ADN molde.

Electroforesis en gel de agarosa al 1%

La electroforesis en gel de agarosa al 1% se realizó con tampón TBE 1x (Tris 0,1 M, ácido bórico 0,09 M, EDTA 1 mM) y 1,5 μ L de SYBR safe como intercalante, las condiciones fueron 30 minutos, 300 mA y 110 V. Se ejecutó una escalera de ADN de 1 Kb (Invitrogen) simultáneamente con los amplicones para dimensionar las bandas. Finalmente se reveló la imagen en el equipo ENDURO™ GDS Gel Documentation.

Debido a que la banda resultó tenue, se decidió repetir el proceso de PCR para obtener dos productos amplificados, los cuales se unificaron para aumentar la concentración durante la purificación.

Purificación de la muestra

Una vez unificado las dos réplicas de la muestra amplificada, se procedió a purificar la muestra empleando el Kit de purificación de PCR PureLink™(invitrogen). Posteriormente se volvió a cuantificar el producto.

Etiquetado y envío

Las muestras se empaquetaron y enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen SeoulKorea.

5.3. Metodología para el segundo objetivo: “Obtener la curva de crecimiento de *Hemileia vastatrix* en condiciones *in vitro*”

Inoculación y desarrollo de la infección por *Hemileia vastatrix*

Se utilizaron hojas infectadas con roya previamente recolectadas para preparar suspensiones de esporas que permitan inocular discos de hojas sanas. Para esto, se ejecutaron los siguientes pasos según la metodología descrita por Jiménez (2021):

1. **Recolección y preparación de esporas:** Se tomaron las esporas con un bisturí esterilizado y se colocaron en 1 mL de agua destilada estéril en microtubos de 1,5 mL de capacidad, junto con un control blanco sin esporas para identificar posibles contaminaciones (Figura 6).

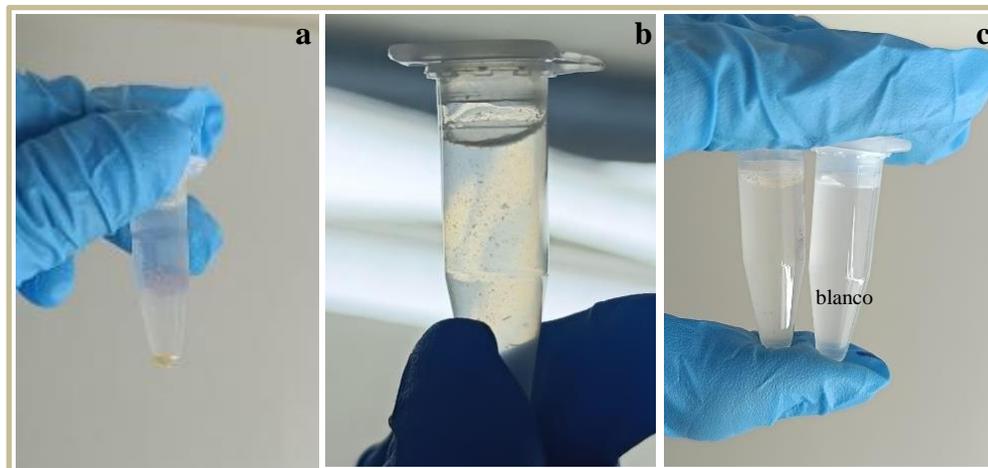


Figura 6. Primeras suspensiones de esporas, a) Esporas colocadas en 1 mL de agua destilada, **b)** Esporas suspendidas en agua destilada, **c)** Comparación entre una suspensión de esporas y el control blanco.

2. **Conteo de esporas:** Se realizó un conteo de las esporas en las primeras suspensiones utilizando la cámara de Neubauer.
3. **Ajuste de la concentración:** Con el número de esporas obtenido, se realizó una segunda dilución para obtener una concentración de 1×10^6 esporas en 1 mL de agua destilada.

Se prepararon un total de cuatro suspensiones de 1 mL de agua destilada, cada una con la concentración mencionada.

A continuación, se presentan las ecuaciones y los cálculos empleados para obtener las nuevas suspensiones:

$$\text{Concentración celular} = \text{Prom Nro. células} \times 10^4 \times \text{FD}$$

Donde:

Prom Nro. células: promedio de esporas contadas en la cámara de Neubauer

FD: Factor de conversión (10^4)

$$C1.V1 = C2.V2$$

Donde:

C1= Concentración celular

C2= 1×10^6 esporas (requerida)

V2= 1 mL (requerido)

Suspensión 1:

$$\text{Concentración celular} = \text{Prom Nro. células} \times 10^4 \times \text{FD}$$

$$\text{Concentración celular} = 19 \times 10^4 \times 10^1$$

$$\text{Concentración celular} = 1,9 \times 10^6 \text{ cel/mL}$$

$$C1.V1 = C2.V2$$

$$1,9 \times 10^6.V1 = 1 \times 10^6 \times 1 \text{ mL}$$

$$V1 = 0,52 \text{ mL}$$

- Se necesitan 520 μL de esta suspensión de esporas y 480 μL de agua destilada para obtener una nueva suspensión de esporas de 1 mL con una concentración de 1×10^6 esporas.

Suspensión 2:

$$\text{Concentración celular} = \text{Prom Nro. células} \times 10^4 \times \text{FD}$$

$$\text{Concentración celular} = 22,75 \times 10^4 \times 10^1$$

$$\text{Concentración celular} = 22,2 \times 10^6 \text{ cel/mL}$$

$$C1.V1 = C2.V2$$

$$22,2 \times 10^6.V1 = 1 \times 10^6 \times 1 \text{ mL}$$

$$V1 = 0.045 \text{ mL}$$

- Se necesitan 45 μL de esta suspensión de esporas y 955 μL de agua destilada para obtener una nueva suspensión de esporas de 1 mL con una concentración de 1×10^6 esporas.

Suspensión 3:

$$\text{Concentración celular} = \text{Prom Nro. células} \times 10^4 \times \text{FD}$$

$$\text{Concentración celular} = 10,75 \times 10^4 \times 10^1$$

$$\text{Concentración celular} = 1,07 \times 10^6 \text{ cel/mL}$$

$$C1.V1 = C2.V2$$

$$1,07 \times 10^6.V1 = 1 \times 10^6 \times 1 \text{ mL}$$

$$V1 = 0,93 \text{ mL}$$

- Se necesitan 930 μL de esta suspensión de esporas y 70 μL de agua destilada para obtener una nueva suspensión de esporas de 1 mL con una concentración de 1×10^6 esporas.

Suspensión 4:

$$\text{Concentración celular} = \text{Prom Nro. células} \times 10^4 \times \text{FD}$$

$$\text{Concentración celular} = 23 \times 10^4 \times 10^1$$

$$\text{Concentración celular} = 2,3 \times 10^6 \text{ cel/mL}$$

$$C1.V1 = C2.V2$$

$$2,3 \times 10^6.V1 = 1 \times 10^6 \times 1 \text{ mL}$$

$$V1 = 0,43 \text{ mL}$$

- Se necesitan 430 μL de esta suspensión de esporas y 570 μL de agua destilada para obtener una nueva suspensión de esporas de 1 mL con una concentración de 1×10^6 esporas.

- 4. Esterilización de hojas sanas:** Se tomaron hojas sanas de una planta aislada y se esterilizaron sumergiéndolas en alcohol al 70 % y agua destilada estéril durante un minuto.
- 5. Preparación de discos de tejido foliar:** Las hojas esterilizadas se dejaron secar sobre papel filtro y se cortaron en discos de 1,5 cm de diámetro utilizando un molde metálico.
- 6. Preparación de cajas Petri:** Se colocaron dos discos en cada caja Petri con papel filtro humedecido con agua destilada en la base (para mantener fisiológicamente activos los discos)

7. **Condiciones de incubación:** Conforme las condiciones óptimas de adaptación de los discos de tejido foliar establecidas por (Ramón, 2024), las cajas Petri se ubicaron en una cámara de ensayos diseñada con tres lámparas LED, cubierta con plástico mica transparente de 1 mm para mantener una temperatura de 22,8 °C y luz constante (Figura 7).



Figura 7. Discos de hojas activos previo a la inoculación

Los aceites esenciales utilizados fueron de mandarina (*Citrus reticulata*), naranja (*Citrus sinensis*), y limón (*Citrus limon*) con una concentración inicial de 100% en estado puro. Estos fueron adquiridos mediante el proveedor doTerra, los cuales fueron obtenidos por el método de prensado en frío utilizando las cáscaras de cada cítrico para garantizar la integridad y fiabilidad de los componentes de los aceites esenciales (dōTerra, 2023)

Para la inoculación de los discos, se utilizaron las nuevas suspensiones previamente obtenidas con la concentración de esporas requerida y se realizaron cálculos para conocer la cantidad de cada concentración de los aceites esenciales necesaria para obtener las suspensiones finales para la inoculación. Estos cálculos se muestran a continuación:

Cálculo de concentraciones de los aceites esenciales

Los aceites esenciales utilizados, con una concentración inicial del 100 % en estado puro, se llevaron a dilución con agua destilada para conseguir concentraciones más bajas y manejables. Las diluciones previas a los cálculos para todos los aceites esenciales se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Diluciones de los aceites esenciales
Tabla de diluciones de aceites esenciales (Ae)

Ae	H2O destilada	C2	V2	Vf
50 uL (100 %)	50 uL	50 %	100 uL	50 uL
50 uL (50 %)	50 uL	25 %	100 uL	50 uL
50 uL (25 %)	50 uL	12,50 %	100 uL	50 uL
50 uL (12,5 %)	50 uL	6,25 %	100 uL	50 uL
50 uL (6,25 %)	50 uL	3,13 %	100 uL	100 uL

Cálculo de la cantidad de suspensión de esporas más aceite o tratamiento

Con los aceites esenciales diluidos a concentraciones más bajas y con las nuevas suspensiones de esporas previamente obtenidas, se realizaron cálculos para conocer el volumen necesario de aceite esencial y de suspensión de esporas que permitan obtener suspensiones finales de un volumen de 200 μL con una concentración de esporas de 1×10^6 para cada una de las concentraciones de aceites esenciales de 0,025, 0,1, 0,4 y 0,8 %. Estos cálculos se muestran a continuación:

Concentración 1 (0,025 %)

$$C1 = 3,125 \%$$

$$C2 = 0,025 \%$$

$$V2 = 200 \mu\text{L}$$

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

$$3,125 \% \cdot V1 = 0,025 \% \cdot 200 \mu\text{L}$$

$$V1 = 1,6 \mu\text{L}$$

- Se necesitan 1,6 μL del aceite esencial en cuestión diluido al 3,125 % más 198,4 μL de las nuevas suspensiones de esporas para obtener una suspensión final de 200 μL con una concentración de esporas de 1×10^6 con el tratamiento incluido.

Concentración 2 (0,1 %)

$$C1 = 6,25 \%$$

$$C2 = 0,1 \%$$

$$V2 = 200 \mu\text{L}$$

$$C1.V1 = C2.V2$$

$$6,25 \%.V1 = 0,1 \%. 200 \mu L$$

$$V1 = 3,2 \mu L$$

- Se necesitan 3,2 μ L del aceite esencial en cuestión diluido al 6,25 % más 196,8 μ L de las nuevas suspensiones de esporas para obtener una suspensión final de 200 μ L con una concentración de esporas de 1×10^6 con el tratamiento incluido.

Concentración 3 (0,4 %)

$$C1 = 25 \%$$

$$C2 = 0,4 \%$$

$$V2 = 200 \mu L$$

$$C1.V1 = C2.V2$$

$$25 \%.V1 = 0,4 \%. 200 \mu L$$

$$V1 = 3,2 \mu L$$

- Se necesitan 3,2 μ L del aceite esencial en cuestión diluido al 25 % más 196,8 μ L de las nuevas suspensiones de esporas para obtener una suspensión final de 200 μ L con una concentración de esporas de 1×10^6 con el tratamiento incluido.

Concentración 4 (0,8 %)

$$C1 = 25 \%$$

$$C2 = 0,8 \%$$

$$V2 = 200 \mu L$$

$$C1.V1 = C2.V2$$

$$25 \%.V1 = 0,8 \%. 200 \mu L$$

$$V1 = 6,4 \mu L$$

- Se necesitan 6,4 μ L del aceite esencial en cuestión diluido al 25 % más 193,6 μ L de las nuevas suspensiones de esporas para obtener una suspensión final de 200 μ L con una concentración de esporas de 1×10^6 con el tratamiento incluido.

De este modo, se realizaron un total de doce suspensiones finales de 200 μ L cada una, cantidad necesaria para inocular cuatro discos de hojas que corresponden a una concentración.

Posteriormente, de cada una las suspensiones finales realizadas se tomaron 45 μ L para inocular cada disco en el centro del mismo por el envés. Las cajas Petri con los discos inoculados fueron cubiertas con papel aluminio por seis horas para que esta oscuridad estimule el crecimiento del hongo y luego se mantuvieron con luz constante y una temperatura de 22 °C durante el desarrollo de los ensayos (Figura 8).



Figura 8. Discos inoculados y en condiciones de crecimiento, a) Discos de hojas sanas con el inóculo, **b)** Cajas Petri dentro de la cámara de ensayos expuestas a condiciones de crecimiento de *H. vastatrix*.

Las cajas Petri que contenían los discos cuya inoculación se realizó con las diferentes concentraciones de los aceites esenciales (Ae) se denominaron cajas de tratamientos, las mismas que se identificaron con los códigos: MC 1, 2, 3, 4, para el aceite esencial de mandarina; NC 1, 2, 3, 4, para el aceite esencial de naranja y LC 1, 2, 3, 4, para el aceite esencial de limón. Además, se establecieron tres controles con dos repeticiones cada uno.

El control positivo (P1, P2) cuyos discos fueron inoculados con suspensión de esporas en agua destilada sin ningún tratamiento, el control negativo (N1, N2) cuyos discos fueron inoculados con suspensión de esporas y un fungicida cúprico comúnmente utilizado para el control de la roya en una concentración de 0,8 % (según sus especificaciones técnicas) y un control blanco (B1, B2) cuyos discos no fueron inoculados. Para diferenciar los discos, se etiquetó como I y II en cada caja.

Los ensayos se realizaron por duplicado, utilizando un total de 60 discos (30 cajas Petri), de los cuales 48 discos corresponden a los tratamientos (Ae) y 12 a los controles positivo, negativo y blanco (Figura 9).

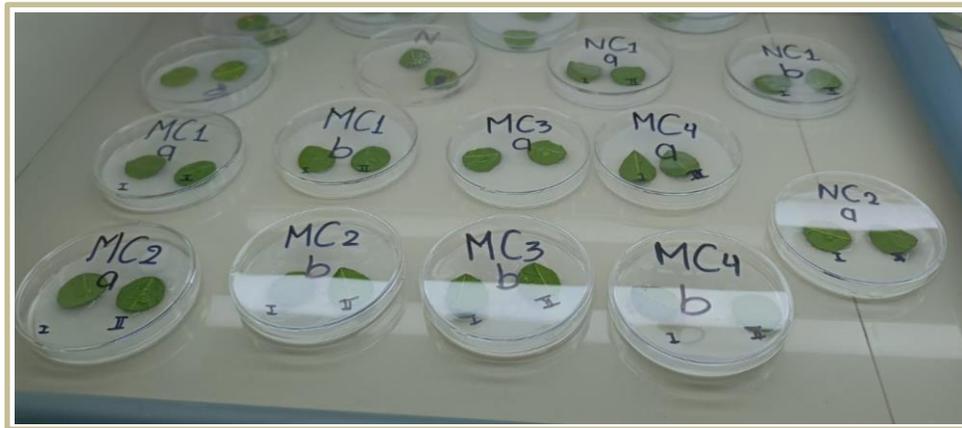


Figura 9. Etiquetado de las cajas Petri correspondientes a los tratamientos con aceites esenciales.

La Tabla 3 muestra el total de repeticiones realizadas y el etiquetado de cada una.

Tabla 3. Repeticiones de los tratamientos.

Tabla de Tratamientos					
Aceite esencial	Concentraciones (%)	Código	Réplicas (cajas)	Repeticiones (discos)	
Mandarina	0,025	MC1	a	I	II
			b	I	II
	0,1	MC2	a	I	II
			b	I	II
	0,4	MC3	a	I	II
			b	I	II
	0,8	MC4	a	I	II
			b	I	II
Naranja	0,025	NC1	a	I	II
			b	I	II
	0,1	NC2	a	I	II
			b	I	II
	0,4	NC3	a	I	II
			b	I	II
	0,8	NC4	a	I	II
			b	I	II
Limón	0,025	LC1	a	I	II
			b	I	II
	0,1	LC2	a	I	II
			b	I	II
	0,4	LC3	a	I	II
			b	I	II
	0,8	LC4	a	I	II
			b	I	II

Obtención de la curva de crecimiento

Para representar el crecimiento de *H. vastatrix* en condiciones *in vitro*, se generó la curva de cinética de crecimiento microbiano. Los valores diarios de esta curva son el resultado de la media calculada a partir de 4 repeticiones biológicas. Estos datos se obtuvieron mediante el software Image J (Versión 1.8.0) (Image J, 2023), a partir de un registro fotográfico diario por un periodo de 28 días de los discos del control positivo, cuyas condiciones permitieron el crecimiento óptimo del hongo. Los datos obtenidos fueron tabulados y organizados en una base de datos para generar la curva de crecimiento utilizando R (Versión 4.1.1) (R Core Team, 2021). En esta curva, el tiempo (en días) se representó en el eje x y el promedio del crecimiento (diámetro de la colonia) en el eje y.

5.4. Metodología para el tercer objetivo: “I identificar el potencial de inhibición de aceites esenciales de plantas cítricas contra el crecimiento de *Hemileia vastatrix* y el desarrollo de la roya del café mediante el índice EC 50”

Obtención de la curva de inhibición mediante el índice EC 50

Se utilizó el registro fotográfico diario de todos los discos con tratamientos (Ae) para identificar el desarrollo de la infección mediante el software Image J (Versión 1.8.0) (Image J, 2023).

Con los datos obtenidos en Image J, se creó una base de datos para generar una curva de crecimiento para cada aceite esencial con las diferentes concentraciones aplicadas. Posteriormente, estas curvas se compararon estas curvas con los controles positivo, negativo y blanco.

Para evaluar el potencial de inhibición de los aceites esenciales de las tres plantas cítricas, se calculó el potencial de inhibición de cada uno con respecto al crecimiento del área infectada por *H. vastatrix*. Para esto se utilizó la base de datos previamente generada para calcular el índice EC50 mediante el software GraphPad Prism® (Versión 10.1.2) (GraphPad, 2023) para conocer la concentración de aceite necesaria para reducir el crecimiento normal de la infección al 50 %. Las concentraciones utilizadas fueron: 0,025 %, 0,1 %, 0,4 % y 0,8 % para cada aceite candidato. Cada concentración representó un punto en la curva de inhibición para cada aceite candidato. Posteriormente, mediante una correlación no lineal, se graficó el área de infección en mm² en relación con la concentración del aceite esencial aplicado.

Se utilizó la siguiente ecuación:

$$v=V/(1+(I/Ec50))$$

Donde:

v: Crecimiento medido del área infecta; V: Crecimiento máxima aparente del área afectada en el inhibidor; I: concentración del inhibidor; ID50: dosis inhibitoria del 50 %.

Identificación de cambios inducidos sobre las esporas de *H. vastatrix*

Para observar de forma detallada si las concentraciones de los aceites esenciales aplicadas producían daño estructural o evitaban la germinación de las esporas, se realizaron las disoluciones con suspensión de esporas y agua destilada con tratamiento (Ae) para cada una de las concentraciones de los tres aceites por triplicado, con un total de 36 suspensiones con tratamientos y 9 suspensiones para los controles (positivo, negativo y blanco). Estas suspensiones colocadas en microtubos se dejaron en la misma cámara de ensayos (Figura 12). Transcurrido un periodo de 24 horas se realizó un conteo de cada repetición (microtubo) tomando 20 μ L de la disolución y contando las esporas que ese volumen contenía. El número de esporas obtenido en las tres repeticiones de cada concentración se promedió y representa un punto en la gráfica de germinación para cada aceite esencial.



Figura 10. Suspensiones de esporas con tratamientos (Ae)

6. Resultados

6.1. Resultados para el primer objetivo: “Realizar la identificación molecular de esporas de la roya del café”

Identificación morfológica de *Hemileia vastatrix*

La presencia de *Hemileia vastatrix* se pudo evidenciar mediante la identificación morfológica de las esporas tomadas de las hojas infectadas previamente recolectadas, las mismas que presentaban lesiones de color amarillo y naranja en el envés. Se diferenciaron esporas de tipo *urediniósporas*, con un tamaño relativamente pequeño que osciló entre los 20 a 30 micrómetros de longitud. Su forma fue elipsoidal u ovoide y presentaban una coloración de amarillo claro con una superficie se rugosa y lisa en algunas muestras. En las esporas que se examinaron antes de su germinación, no se evidenció presencia de estructuras vegetativas (Figura 11 a). Por otro lado, en las esporas examinadas dos días después de la germinación, es posible observar su conexión al micelio que es la estructura vegetativa del hongo, sus hifas fueron bastante notorias, las mismas que se extendían por el tejido de la hoja (Figura 11 b). En cuanto a la pared celular, todas las esporas presentaron una pared delgada y de color marrón oscuro.

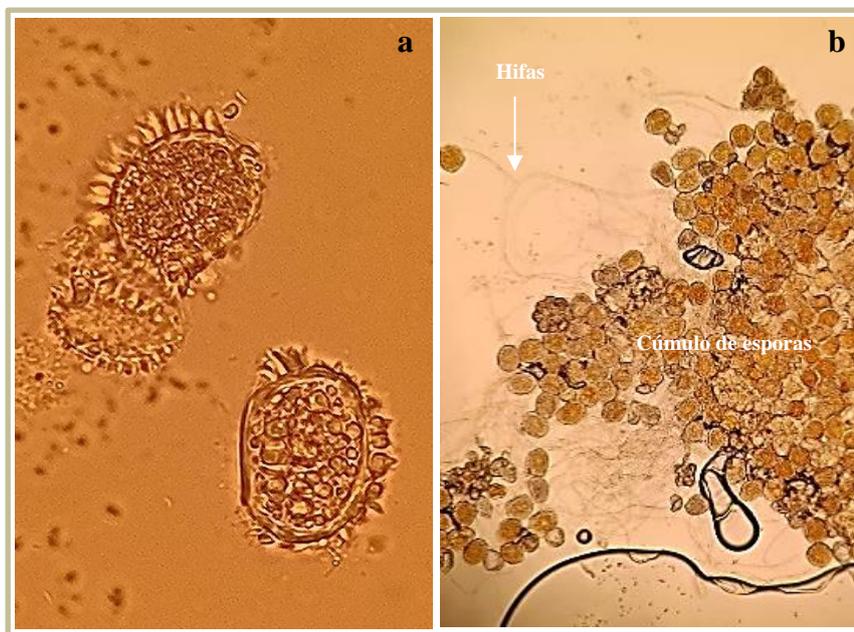


Figura 11. Morfología de las esporas tomadas del envés de hojas infectadas, a) Esporas de forma elipsoidal y coloración naranja, **b)** Presencia de estructuras vegetativas (como hifas) en las esporas de *Hemileia vastatrix* 24 h después de ser colocadas en suspensión de agua destilada, en condiciones de oscuridad y 22 °C.

Identificación molecular de *Hemileia vastatrix*

La Figura 12 muestra el resultado de la electroforesis de PCR, en donde, se visualizan los fragmentos de ADN amplificados con las bandas resultantes en comparación con el marcador.

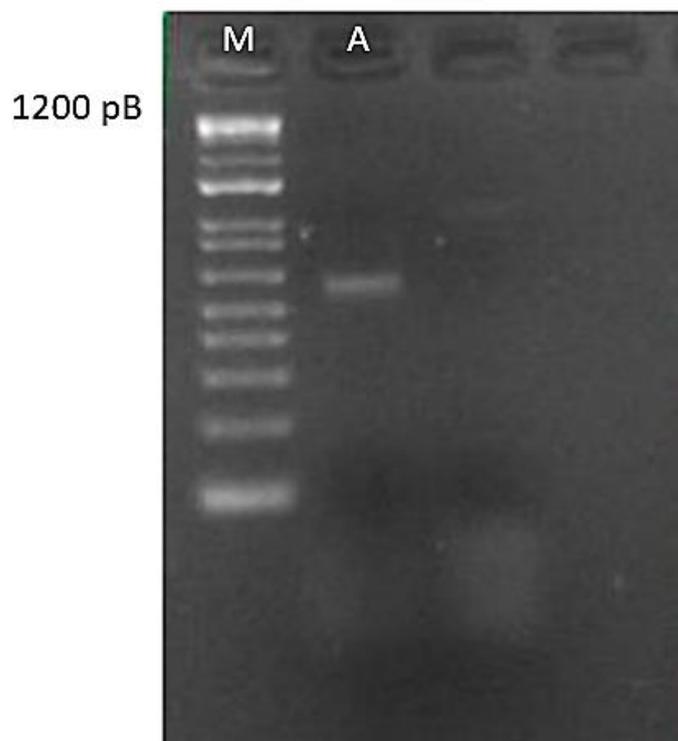


Figura 12. Electroforesis en ENDURO™ GDS Gel Documentation.

La cuantificación de la muestra amplificada se muestra en la Figura 13, en donde se obtuvo el siguiente resultado:

Concentración: 18,2 ng/μL

260/280: 1,92

260/230: 2,48

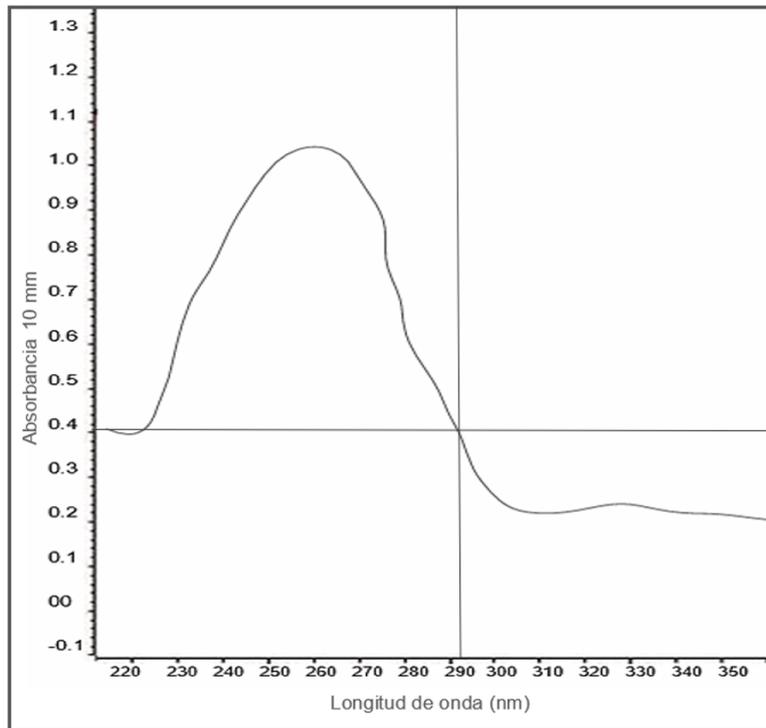


Figura 13. Cuantificación de la muestra amplificada mediante PureLink™ (invitrogen)

La secuenciación de la muestra de ADN presenta un nivel significativo de ruido, tal como se muestra en la Figura 14, en donde los picos representan las señales de fluorescencia que indican la presencia de diferentes bases nitrogenadas en la muestra de ADN. Estos picos muy altos sugieren una alta concentración de ADN en la muestra, lo cual podría ser el resultado de una posible contaminación de la muestra con material genético de otros hongos, de manera que los picos correspondientes al ADN de *Hemileia vastatrix* pueden estar superpuestos con los picos de la contaminación, dificultando la identificación precisa de la secuencia genética específica de *H. vastatrix* en el análisis.

hongo en diferentes DDI (días después de la infección). En general, la aparición de otros hongos fue muy escasa; solo se pudo evidenciar la presencia del hongo *Verticillium spp* en dos discos de hojas, entre las decenas que formaron parte de esta investigación. Este hongo se identificó por sus características manchas blancas (Espinoza, 2017) y sus colonias no fueron medidas para evitar sesgos o falsos positivos.

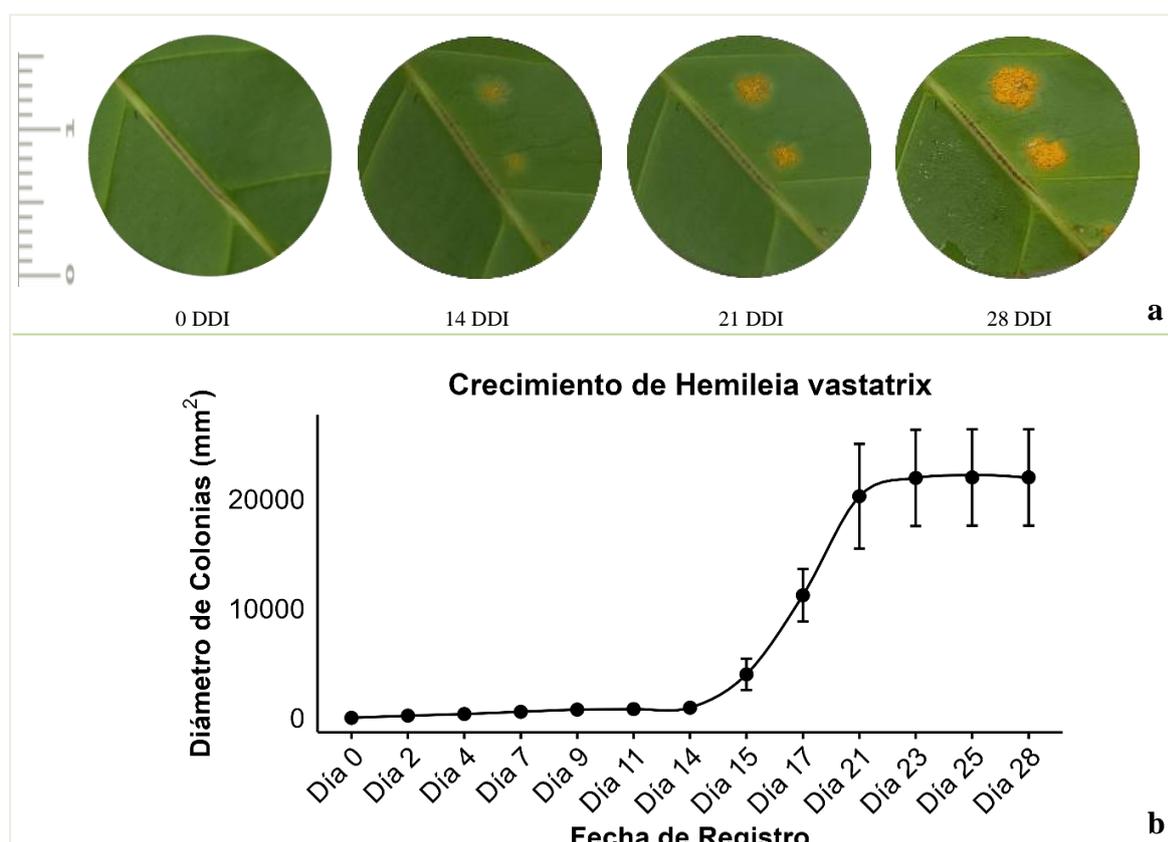


Figura 15. Cinética de crecimiento de *H. vastatrix* en condiciones in vitro, a) Desarrollo de la infección por *H. vastatrix* en los discos de tejido foliar de *Coffea arábica* var. típica, **b)** Curva de cinética de crecimiento microbiano de *H. vastatrix*. Los puntos en la gráfica representan la media de 4 repeticiones biológicas independientes. Las barras de error representan \pm SD

En la primera etapa de la investigación, se identificó una fase de latencia que se prolongó hasta el día 14 del registro. Durante esta fase, *H. vastatrix* exhibió un comportamiento caracterizado por una adaptación al entorno de cultivo.

Al concluir el período de latencia (día 14) y hasta el día 22, se produjo la fase logarítmica del crecimiento de *H. vastatrix*. Durante esta etapa, las células del hongo experimentaron una reproducción activa (Benintende, 2002), caracterizada por un crecimiento exponencial.

Al partir del día 23, se evidenció el comienzo de la fase estacionaria, la cual exhibe un decaimiento poco pronunciado de las colonias. Durante esta investigación y después de 28 DDI, *H. vastatrix* se desarrolló en un promedio de 21,98 mm² de área infectada. Es relevante destacar que, dentro del período de estudio, aún no se ha observado la reducción, desaparición o cambios físicos que denoten la muerte de las colonias de *H. vastatrix* o la necrosis de los discos de hojas.

6.3. Resultados para “Identificar el potencial de inhibición de aceites esenciales de plantas cítricas contra el crecimiento de *Hemileia vastatrix* y el desarrollo de la roya del café mediante el índice EC 50”

Las Figuras 16 y 17 representan el seguimiento de las áreas infectadas en diversas etapas temporales utilizando una concentración del 0,025 %, junto con las curvas de crecimiento obtenidas para los aceites esenciales de mandarina y naranja respectivamente.

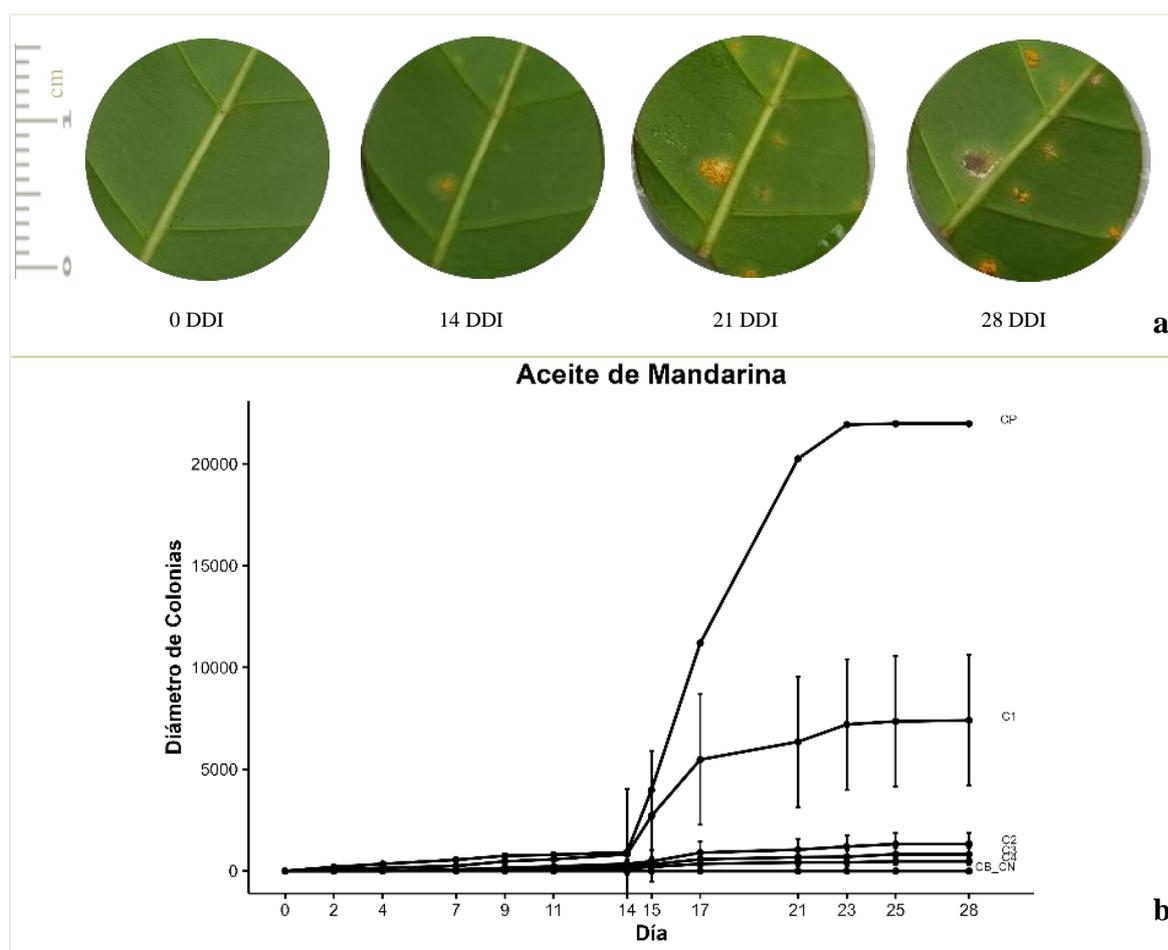


Figura 16. Crecimiento de *H. vastatrix* con el aceite de mandarina, a) Desarrollo de la infección por *H. vastatrix* en el disco de hoja II de la caja b, con concentración 0,025 % del aceite de mandarina, **b)** Curva de crecimiento de *H. vastatrix* con el aceite de mandarina (concentraciones: C1= 0,025 %, C2= 0,0125 %, C3= 0,00625 %, C4= 0,003125 %, C5= 0,0015625 %, C6= 0,00078125 %, C7= 0,000390625 %, C8= 0,0001953125 %, C9= 0,00009765625 %, C10= 0,000048828125 %, C11= 0,0000244140625 %, C12= 0,00001220703125 %, C13= 0,000006103515625 %, C14= 0,0000030517578125 %, C15= 0,00000152587890625 %, C16= 0,000000762939453125 %, C17= 0,0000003814697265625 %, C18= 0,00000019073486328125 %, C19= 0,000000095367431640625 %, C20= 0,0000000476837158203125 %).

C2= 0,1 %, C3= 0,4 % y C4=0,8 %) en comparación con los controles positivos (CP), negativos (CN) y blancos (CB). Los puntos en la gráfica representan la media de 4 repeticiones biológicas independientes para cada concentración. Las barras de error representan \pm SD

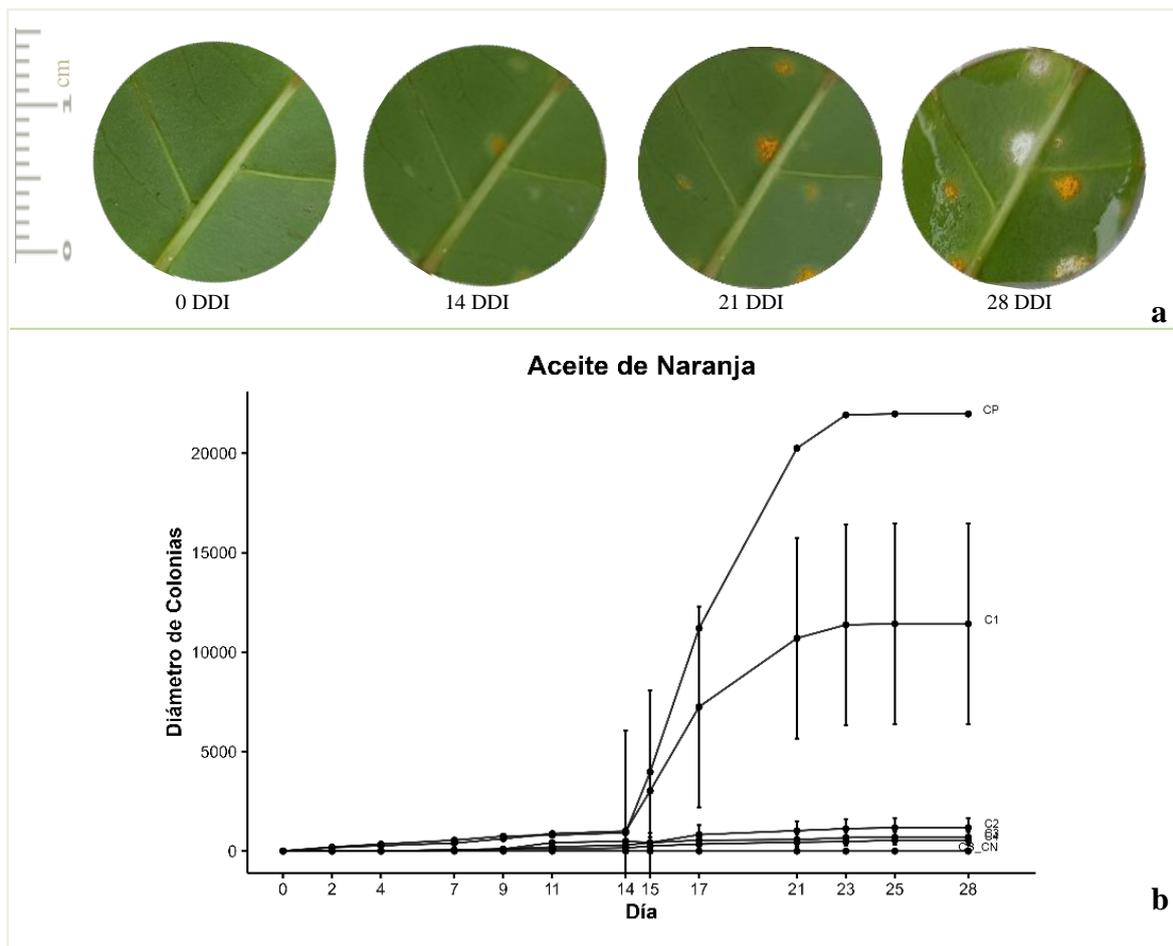


Figura 17. Crecimiento de *H. vastatrix* con el aceite de naranja, a) Desarrollo de la infección por *H. vastatrix* en el disco de hoja II de la caja a, con concentración 0,025 % del aceite de naranja, **b)** Curva de crecimiento de *H. vastatrix* con el aceite de naranja (concentraciones: C1= 0,025 %, C2= 0,1 %, C3= 0,4 % y C4=0,8 %) en comparación con los controles positivos (CP), negativos (CN) y blancos (CB). Los puntos en la gráfica representan la media de 4 repeticiones biológicas independientes para cada concentración. Las barras de error representan \pm SD

Se evidencia una disminución significativa en el área infectada por el hongo en comparación con los controles positivos. Es importante destacar que esta reducción fue más notoria para el aceite de limón (Figura 18).

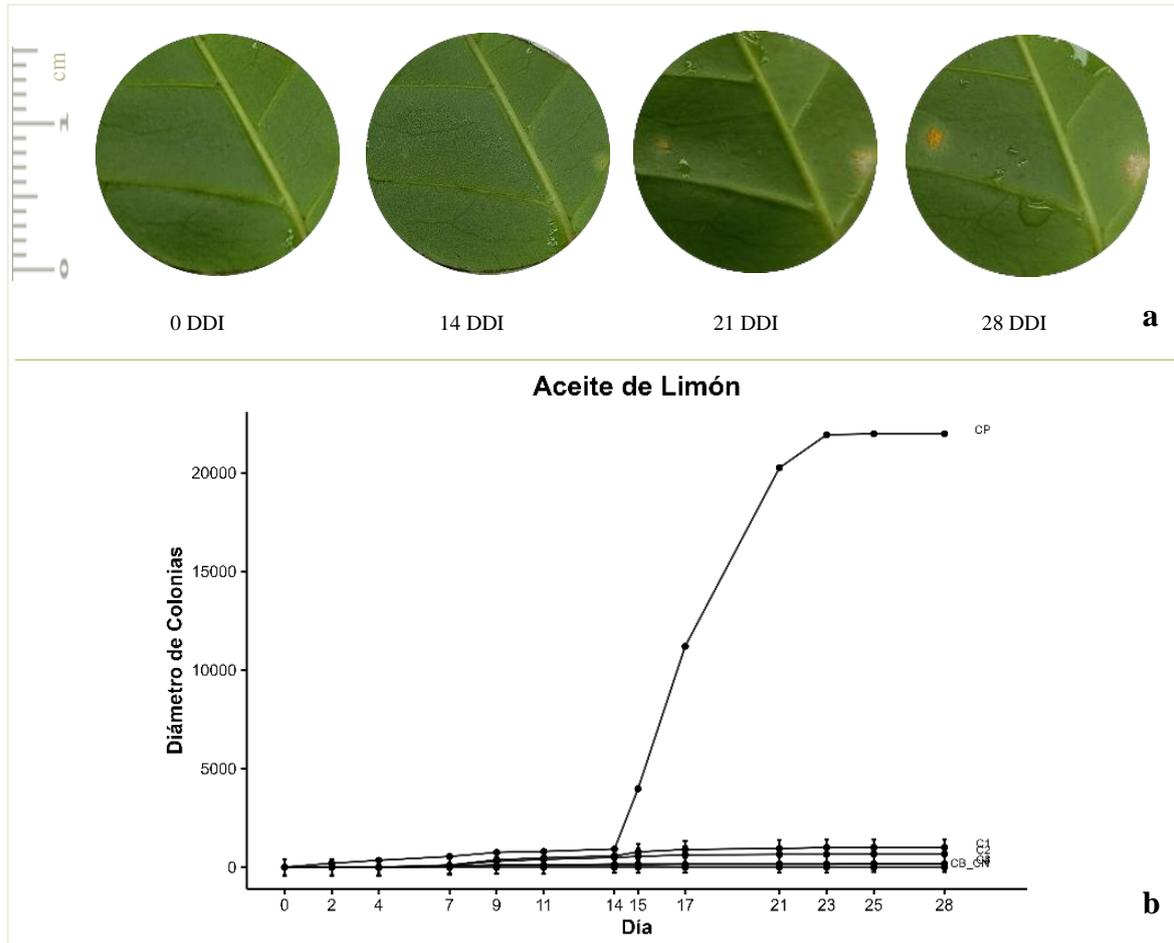


Figura 18. Crecimiento de *H. vastatrix* con el aceite de limón, a) Desarrollo de la infección por *H. vastatrix* en el disco de hoja I de la caja a, con concentración de 0,025 % de aceite de limón, **b)** Curva de crecimiento de *H. vastatrix* con el aceite de limón (concentraciones: C1= 0,025 %, C2= 0,1 %, C3= 0,4 % y C4=0,8 %) en comparación con los controles positivos (CP), negativos (CN) y blancos (CB). Los puntos en la gráfica representan la media de 4 repeticiones biológicas independientes para cada concentración. Las barras de error representan \pm SD

En los discos de control negativo (Figura 19 a), se observó ausencia del hongo, sin embargo, se evidenció la presencia de manchas rojas en los discos. Esta observación plantea la posibilidad de la formación de hojas necróticas, lo que podría indicar una respuesta fisiológica o algún otro fenómeno. Por otro lado, en el control blanco se evidenció que no existe contaminación (Figura 19 b).

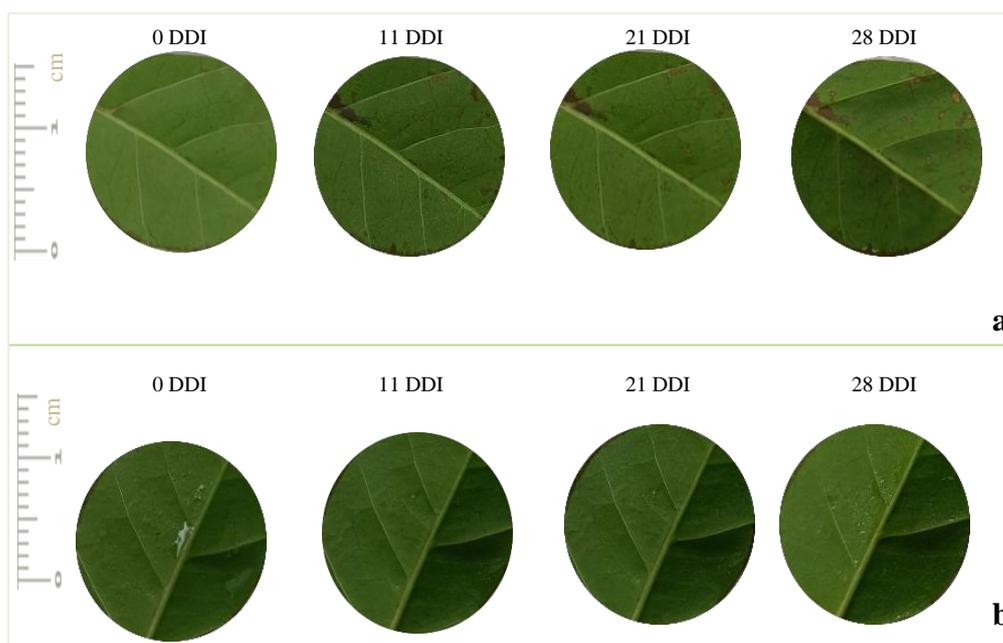


Figura 19. Crecimiento nulo de *H. vastatrix* en los controles negativos y blancos, a) Presencia de pequeñas manchas en el disco II de la caja a, correspondiente al control negativo, **b)** Disco de hoja I de la caja b correspondiente al control blanco sin la presencia de ningún hongo.

A partir de los datos recopilados, se generaron las curvas de crecimiento para cada uno de los controles. A nivel general, se observa una disminución significativa en el diámetro de las colonias. Los resultados obtenidos con la concentración del 0,025 % para los aceites de mandarina y naranja revelan un efecto inhibitorio notable sobre el crecimiento del hongo, evidenciado por la reducción en el diámetro de las colonias.

A pesar de esto, el comportamiento de las curvas de crecimiento para esta concentración se asemeja al control positivo, sugiriendo un mantenimiento marcado de los períodos de latencia, crecimiento exponencial y estacionario. Las concentraciones del 0,1 %, 0,4 %, y 0,8 %, demuestran una capacidad notable para inhibir el crecimiento del hongo, sobre todo en la fase de crecimiento exponencial, evidenciado en la reducción sustancial del diámetro de las colonias.

Este efecto inhibitorio más pronunciado sugiere que a concentraciones más elevadas, los aceites de mandarina y naranja ejercen una acción más fuerte sobre la reproducción y expansión del hongo.

Por otro lado, el aceite de limón mostró cambios importantes en la curva de crecimiento del hongo a partir de la concentración mínima del aceite. El diámetro de las colonias muestra una reducción notable en comparación con el control positivo, indicando una efectiva supresión del desarrollo fúngico a partir de las concentraciones mínimas del aceite.

Se documentó también el crecimiento promedio total de *H. vastatrix* para todas las concentraciones de los aceites. Para ello, se registró el área infectada a los 28 días en los controles sin la presencia de aceites esenciales y en aquellos expuestos a concentraciones de 0,025 %, 0,1 %, 0,4 % y 0,8 %.

Tabla 4. Área de infección a los 28 días.

Concentración %	Área de infección (mm ²)		
	Mandarina	Naranja	Limón
CP	21,98	21,98	21,98
0,025	74,00	11,43	10,00
0,1	13,25	11,75	6,75
0,4	8,25	7,00	1,75
0,8	4,75	5,50	1,75

Según los datos presentados en la Tabla 4, se destaca que la concentración más baja de los aceites esenciales resultó en disminuciones significativas en el área infectada por el hongo. En particular, el aceite esencial de limón mostró la mayor eficacia, con una disminución del 95,45 % en el área infectada en comparación con el control positivo. Le siguen el aceite de mandarina con una reducción del 66,33 % y el de naranja con un 48 % menos. A partir de estos datos se puede observar una disminución paulatina del área infectada conforme aumenta las concentraciones utilizadas.

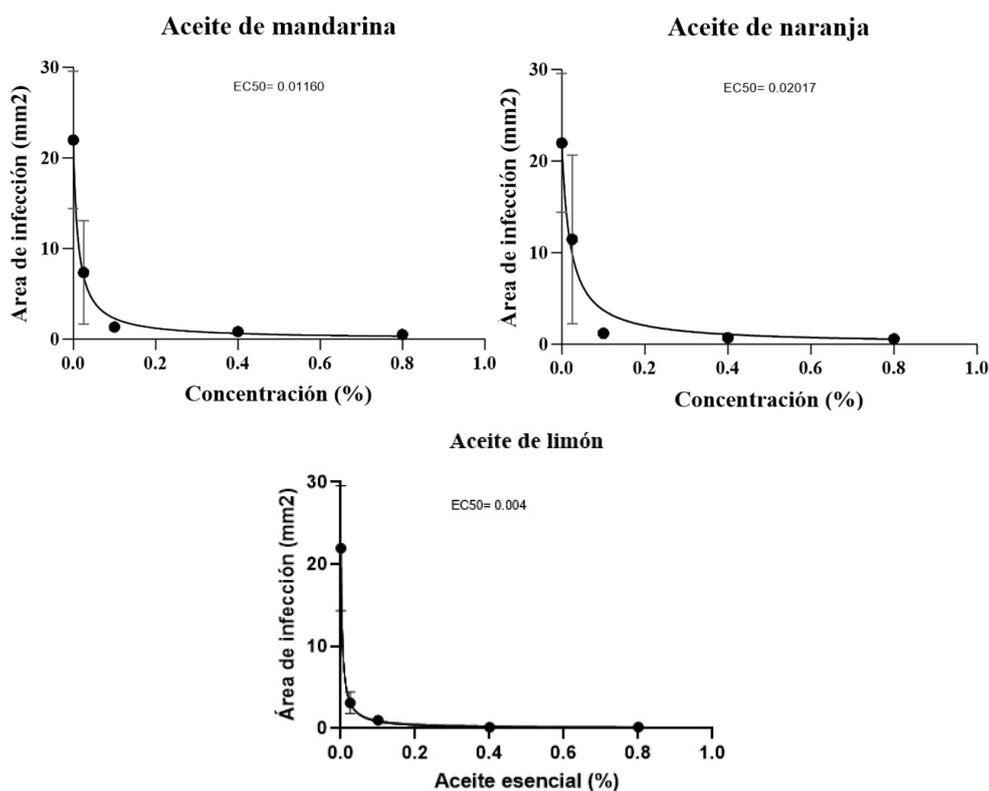


Figura 20. Curva de decaimiento del área de infección por concentración de aceite esencial e Índice EC50.

En cuanto a los resultados obtenidos para EC50 (Figura 20), se puede observar que su valor varía desde 0.004 a 0.02, los cuales indican una eficacia razonablemente fuerte, siendo el aceite de limón el mas indicado con un EC50= 0.004, indicando que se requiere una concentración baja para alcanzar la mitad de la respuesta biológica deseada.

Cambios producidos en las esporas de *H. vastatrix*

Se pudo evidenciar que, luego de aplicar los tratamientos con aceites esenciales sobre las esporas de *Hemileia vastatrix* en concentraciones de 0,025, 0,1, 0,4 y 0,8 %, estos no permitieron que la germinación de este hongo ocurra en las próximas 24 horas, sobre todo en las concentraciones más altas, donde se pudo observar daño estructural de las esporas, las mismas que presentaban una forma anormal. Con los datos obtenidos se realizaron generaron las curvas de germinación para cada aceite esencial, incluyendo los controles positivo, negativo y blanco.

Las Figuras 21 y 22 muestran las esporas que consiguieron germinar luego de 24 horas en suspensión de agua destilada más aceite esencial de mandarina y naranja respectivamente y con la concentración del 0,025 %.

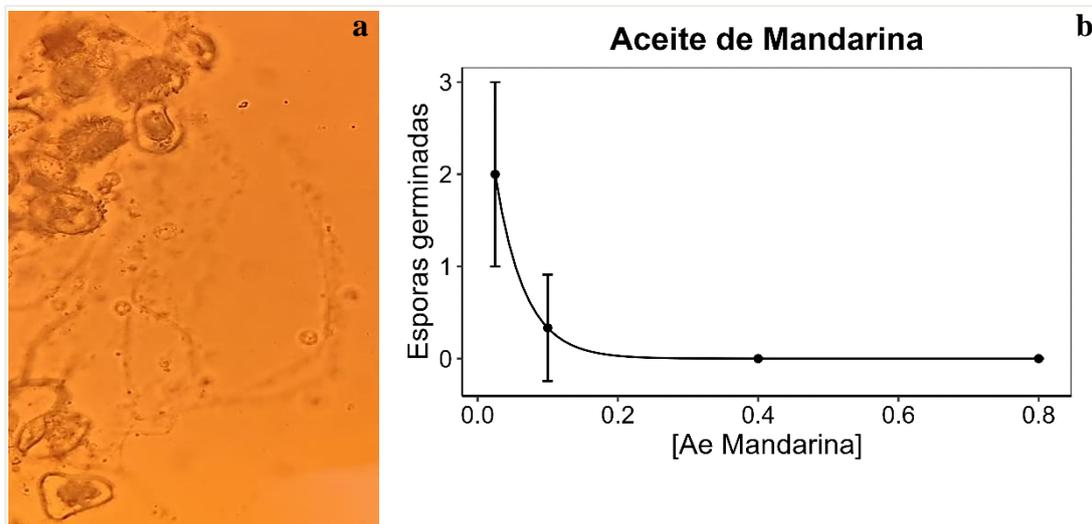


Figura 21. Germinación de esporas con aceite de mandarina, a) Presencia de pocas estructuras vegetativas luego de 24 horas de aplicar aceite esencial de mandarina con concentración de 0,025 %, b) Curva de germinación de las esporas de *H. vastatrix* en suspensión de agua destilada con el aceite de mandarina (concentraciones: C1= 0,025 %, C2= 0,1 %, C3= 0,4 % y C4=0,8 %). Los puntos en la gráfica representan la media de 3 repeticiones biológicas independientes para cada concentración. Las barras de error representan \pm SD

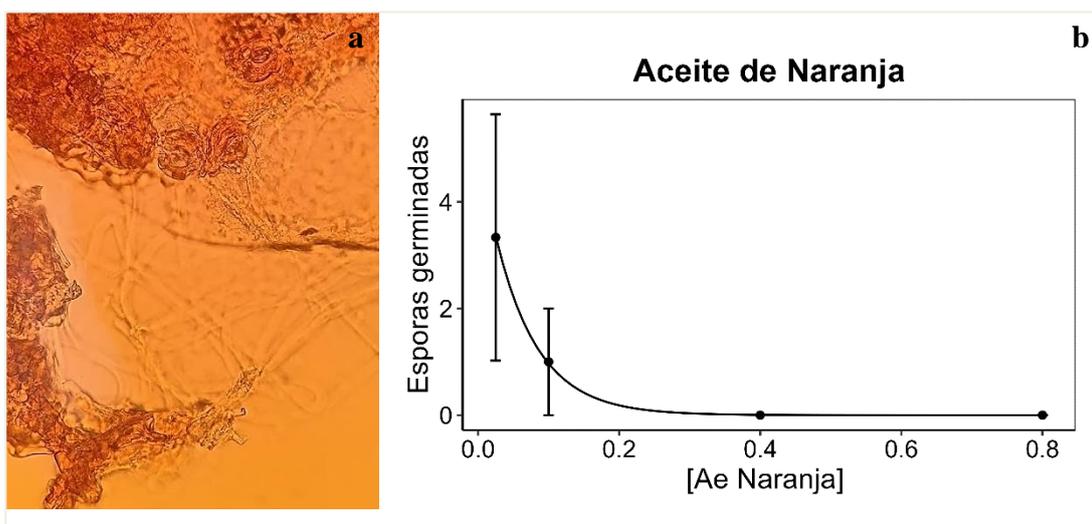


Figura 22. Germinación de esporas con aceite de naranja, a) Presencia de abundantes estructuras vegetativas luego de 24 horas de aplicar aceite esencial de naranja con concentración de 0,025 %, b) Curva de germinación de las esporas de *H. vastatrix* en suspensión de agua destilada con el aceite de naranja (concentraciones: C1= 0,025 %, C2= 0,1 %, C3= 0,4 % y C4=0,8 %). Los puntos en la gráfica

representan la media de 3 repeticiones biológicas independientes para cada concentración. Las barras de error representan \pm SD

Para el aceite de limón (Figura 23), se observó una disminución significativa en el número de esporas germinadas para todas las concentraciones, siendo este el que menos permitió que las esporas de *H. vastatrix* germinen. Además, se pudo diferenciar esporas con aparente daño estructural con las concentraciones más altas de este aceite.

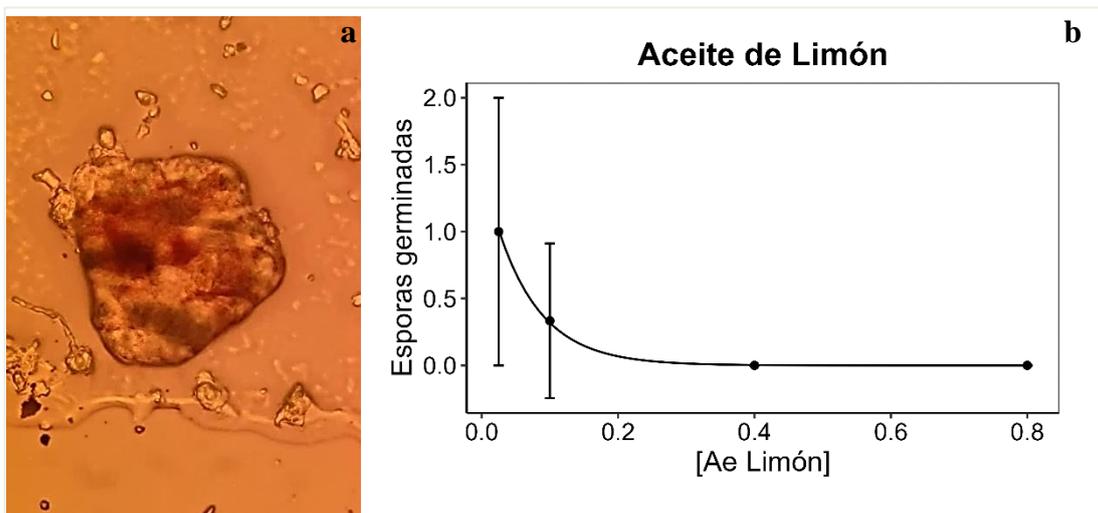


Figura 23. Germinación de esporas con aceite de limón, a) Presencia de esporas con aparente daño físico luego de 24 horas de aplicar aceite esencial de limón con concentración de 0,8 %, **b)** Curva de germinación de las esporas de *H. vastatrix* en suspensión de agua destilada con el aceite de limón (concentraciones: C1= 0,025 %, C2= 0,1 %, C3= 0,4 % y C4=0,8 %). Los puntos en la gráfica representan la media de 3 repeticiones biológicas independientes para cada concentración. Las barras de error representan \pm SD

En el control negativo (Figura 24 a), no se observaron esporas germinadas, sin embargo, se evidenció la presencia de esporas con aparente daño físico en las cuatro repeticiones. Mientras que, para el control positivo se observó gran cantidad de esporas germinadas (Figura 24 a). Por otro lado, en el control blanco (Figura 24 a) se evidenció que no existe contaminación.

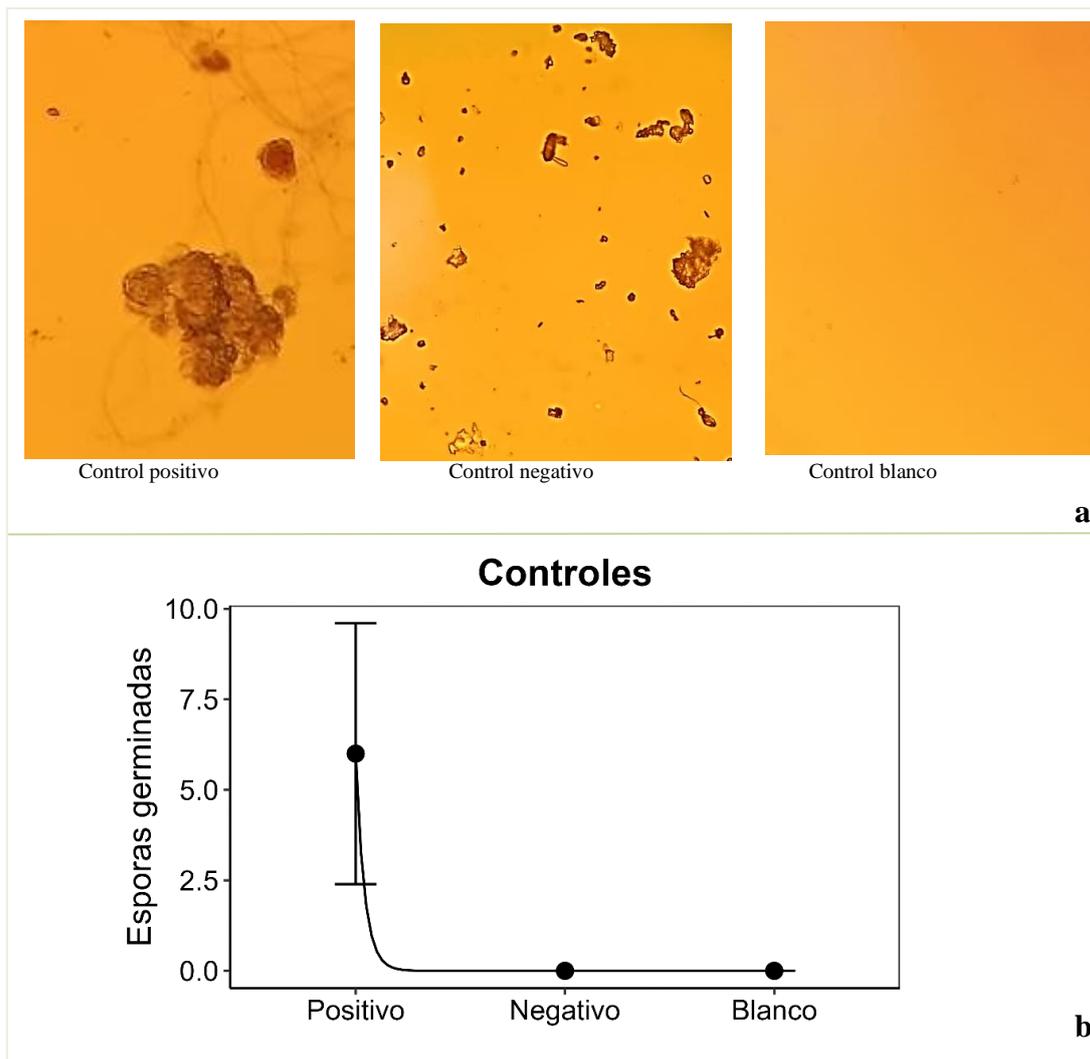


Figura 24. Germinación de esporas en los controles positivo, negativo y blanco, a) Abundante presencia de estructuras vegetativas de las esporas de *H. vastatrix* en el control positivo sin ningún tratamiento; Presencia de esporas con daño físico y ausencia de esporas germinadas en el control negativo; Ausencia de contaminación en el control blanco, **b)** Curva de germinación de las esporas de *H. vastatrix* para los tres controles

7. Discusión

Hemileia vastatrix, agente patógeno responsable de la roya del café, afecta gravemente la producción cafetera del país por su difícil manejo (Moreira-Morrillo, Vélez-Zambrano, Intra Moreira, et al., 2023). La principal estrategia de control de este patógeno comprende la utilización de fungicidas preventivos y sistémicos que incluyen ingredientes como cobre, epoxiconazol o pyraclostrobin (Avelino et al., 2015; Zambolim, 2016). La utilización de aceites esenciales representa una alternativa sostenible para tratar este problema. Esta práctica, que no es nueva, ha sido estudiada por varios autores en relación con una diversidad de aceites y hongos (Aguilar-González et al., 2017; Davicino et al., 2007; Dellavalle et al., 2011; Stegmayer et al., 2021). Para controlar la roya de café, se han estudiado extractos vegetales (Cerna Chávez et al., 2019), plantas medicinales (Silva et al., 2014), etc. En este estudio, los aceites esenciales de mandarina, naranja y limón fueron probados como posibles inhibidores del crecimiento de *H. vastatrix*.

Identificación morfológica y molecular de *Hemileia vastatrix*:

Luego de realizar la identificación morfológica de *H. vastatrix* y confirmar la presencia del hongo causante de la roya del café, se puede evidenciar que las características visualizadas de las esporas concuerdan con las descripciones típicas de *H. vastatrix* (Talhinhas et al., 2017). La ausencia de estructuras vegetativas antes de la germinación sugiere una posible dormancia o inactividad metabólica (Morales-Antonio et al., 2021). La conexión de las esporas germinadas al micelio y la presencia de hifas en el tejido de la hoja confirman la capacidad invasiva del hongo durante su fase activa de crecimiento (Moreira-Morrillo, Vélez-Zambrano, Moreira, et al., 2023).

La presencia de ruido en las secuencias de ADN de *H. vastatrix*, como se ilustra en la Figura 14, plantea desafíos significativos en su secuenciación y caracterización genética. Este fenómeno puede atribuirse a la complejidad genética intrínseca de *H. vastatrix*, como se ha estudiado en trabajos previos (Porto et al., 2019; Quispe-Apaza et al., 2017b). Además, problemas técnicos durante la preparación de la muestra, la amplificación del ADN o la secuenciación podrían haber contribuido al nivel significativo de ruido.

Los problemas técnicos en la secuenciación pueden deberse a varios factores, incluyendo contaminación cruzada, degradación o insuficiente cantidad de ADN,

contaminación con inhibidores de la PCR, contaminación con RNAsa o fragmentación inadecuada del ADN (Amigo et al., 2018; Sánchez-Coello, 2012). Por otro lado, el "ruido" en los datos de secuenciación puede ser causado por la presencia de hongos contaminantes durante la extracción o manipulación del ADN (Alberto Cruz-Enríquez et al., 2021; Hombreiro et al., 2015), por su capacidad de esporulación y capacidad contaminativa (Hernández et al., 2010); se descarta la posibilidad de contaminación por bacterias y/o virus.

Esta dificultad en la identificación del genoma de *H. vastatrix* no invalida el estudio, al contrario, resalta la necesidad de desarrollar métodos más sensibles y específicos para la detección genética precisa de este hongo y ofrece valiosas lecciones para orientar futuras investigaciones.

Curva de crecimiento de *Hemileia vastatrix*:

El registro fotográfico llevado a cabo en el control positivo durante los 28 días de estudio proporcionó datos para la construcción de la curva de crecimiento de *H. vastatrix* en condiciones in vitro (Figura 15). La observación detallada de la dinámica de crecimiento reveló patrones consistentes con el ciclo biológico típico de este hongo fitopatógeno. Sin embargo, como sostienen Moreira et al. (2023), esto depende en de las condiciones ambientales, como la temperatura. En este estudio, los ensayos se mantuvieron a 22,8 °C y luz constante; la temperatura óptima para la germinación de las esporas, se sitúa entre 21 y 25 °C. Además, la adaptación de la enfermedad varía según la altitud, determinando la prevalencia de horas con condiciones favorables en una región, lo que prolonga su ciclo de vida en zonas altas (Barquero, 2013).

Se identificaron tres fases distintas en el crecimiento de *H. vastatrix*: la fase de latencia, tuvo una duración de 14 días, durante la cual el hongo se adaptó al ambiente de cultivo; seguida de la fase logarítmica de crecimiento hasta el día 22, donde el hongo se reprodujo activamente y colonizó el sustrato disponible. A partir del día 23, inició la fase estacionaria, caracterizada por una disminución en la tasa de crecimiento a medida que los recursos se agotan y los productos de desecho se acumulan hasta equilibrarse con la tasa de muerte (Garre Pérez et al., 2016), resultando en una población constante debido a la estabilización de estas tasas (Castaño-Zapata, 1994). Estos resultados coinciden con el modelo propuesto por Buchanan et al. (1997) y con los resultados reportados por Canjura Saravia et al. (2002), quienes caracterizaron un

inicio lento, continuado por una aceleración y máximo desarrollo hasta finalmente un descenso a medida que el tejido afectado se agota en el mismo lapso de tiempo de este estudio.

Inhibición del crecimiento de *Hemileia vastatrix* por aceites esenciales:

Los datos de crecimiento de *H. vastatrix* después de la aplicación de los aceites esenciales en comparación con los obtenidos en el control positivo muestran un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento del hongo. Este efecto es claramente observable en las Figuras 16, 17 y 18. Los resultados indican que los aceites de mandarina y naranja, a una concentración del 0,025%, exhiben un mayor grado de error y conducen a un área de infección más extensa en comparación con el aceite de limón.

La disminución en el diámetro de las colonias, especialmente a concentraciones más altas, indica un potencial prometedor de estos compuestos como agentes fungicidas. Cabe destacar que el aceite de limón exhibió mayor disminución del área infectada respecto al resto de aceites en todas las concentraciones. No obstante, se pudo observar en el penúltimo día que, a partir del 0,4%, la efectividad se estabilizó, sin una disminución adicional en la concentración del 0,8%; en el último día, se observó que la concentración mayor presentaba un área mayor de infección que la hoja tratada con el 0,4%.

Los aceites esenciales destacan por ser eficientes insecticidas, antimicrobianos y fitotóxicos (Usano-Aleman y et al., 2014). En los tres aceites analizados, el compuesto químico principal es limoneno; un monoterpeno natural responsable del aroma característico de los cítricos y de propiedades fungicidas (Araújo-Filho et al., 2021). Según Murugachandran y Sanz (2022), el limoneno forma enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua, principalmente enlaces O-H... π , contribuyendo a la formación de estructuras de baja energía, por ello, al diluirse en agua, estas interacciones se mantienen, permitiendo que el limoneno mantenga su actividad fungicida.

La investigación sobre el limoneno ha revelado su potencial como agente biofungicida y bioinsecticida en diversos estudios. Como insecticida, Durán Aguirre et al. (2020) demostraron que el limoneno provocó una mortalidad del 94% en *Helicoverpa armígera* (Hübner). Por otro lado, Ringuelet et al. (2014) encontraron una actividad repelente significativa en adultos de *Tribolium castaneum* en el aceite esencial de *Lippia alba*, rico en carbona-limoneno. Deza Borau (2019) también destacó el uso del limoneno en formulaciones bioinsecticidas para controlar *Planococcus ficus* en viñedos, sugiriendo su efectividad en el

control de plagas agrícolas. Además, López Núñez (2023) evaluó el potencial de extractos de limoneno para controlar malezas en cultivos como bioherbicida.

Además del limoneno, se encontró en menor proporción mircenos en los aceites de naranja y mandarina, y γ -terpineno y β -pineno, en el aceite de limón. Estos componentes contribuyen a la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de cítricos, como lo sugiere el estudio de Jiménez et al. (2022), debido a que pueden influir en las propiedades biológicas de los aceites esenciales, incluida su capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos.

Estudios previos han explorado las propiedades de *Citrus sinensis*. Por ejemplo, Durán Aguirre et al. (2020) demostraron que los aceites esenciales de dos variedades de naranja lograron porcentajes de mortalidad del 97% y 87% en *Helicoverpa armígera*, sugiriéndolo como alternativa para el desarrollo de moléculas activas que podrían ser incorporadas en programas de control biológico. Así también, Anaya Gil, J. (2021) realizó un estudio sobre la acción larvicida del aceite de naranja en larvas de *Drosophila melanogaster*, donde observaron una relación directa entre el aumento de la concentración de limoneno y la mayor letalidad en las larvas.

Su actividad antifúngica ha sido evaluada por Guédez et al. (2014), quienes lo probaron contra cinco tipos de hongos, incluidos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium indicum*, *Fusarium solani*, *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus flavus*, en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). Quintana-Obregón et al. (2017) analizaron una mezcla comercial de terpenos de naranja contra *Alternaria tenuissima*, destacando que el compuesto dextro-limoneno, representando el 96% de la mezcla de terpenos, mostró inhibición a partir de 538 ppm, resaltando su efectividad para controlar la incidencia y el crecimiento del hongo (Ciriminna et al., 2014).

Jiménez et al. (2022) analizaron la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Citrus sinensis*, *Citrus paradisis* y *Citrus reticulata*; destacando que el limoneno provoca la descomposición en la membrana y pared celular, sistema enzimático y síntesis de proteínas en microorganismos, inhibiendo así su crecimiento. Los resultados indicaron una inhibición del crecimiento micelial de los hongos del 80%, resaltando su potencial como agentes antifúngicos.

Los aceites de mandarina y naranja han demostrado una alta capacidad para inhibir esporas de *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides*, con niveles de hasta el 100% en diversos tratamientos y variaciones sujetas a factores de la fruta o ambientales (Narvéez Baque et al., 2017). El aceite de mandarina fue estudiado también en el control de *Penicillium*

digitatum y *P. italicum*., registrando un porcentaje de inhibición entre 50% y 100% (Velásquez et al., 2014). Estos hallazgos están en línea con los resultados del presente estudio, que sugieren que los aceites esenciales de cítricos, incluida la mandarina, podrían ser útiles como biofungicidas para combatir la roya del café.

EC50 y cambios producidos en las esporas:

El cálculo del EC50 confirma la eficacia considerable de los aceites esenciales en la inhibición del crecimiento de *H. vastatrix*. La observación de cambios significativos en las esporas tratadas, como la inhibición de la germinación y el daño estructural, respalda la actividad fungicida de estos compuestos y sugiere posibles mecanismos de acción sobre el patógeno. Estos hallazgos están en línea con estudios previos que han demostrado el efecto de biofungicidas debido a su composición química diversa y sus propiedades bioactivas, como lo evidencian Aguirre-Veta et al, (2022), quienes mediante ensayos *in vivo* e *in vitro*, determinaron que los extractos foliares de *Piper auritum* y *Azadirachta* pueden contener la infección por *H. vastatrix*. Además, Cerna Chávez et al, (2019) evaluaron varios productos a base de vegetales y encontraron que los extractos de *Cinnamomum verum*, *Clonorchis sinensis* y *Brassica nigra* - *Piper nigrum* disminuyen significativamente la severidad de la roya del cafeto (*H. vastatrix*).

Cambios producidos en las esporas de *H. vastatrix*

Los tratamientos con agua destilada en todas las concentraciones no permitieron la germinación de las esporas de *H. vastatrix* en las 24 horas siguientes a su aplicación, especialmente en las concentraciones más altas. Esto sugiere un efecto dosis-dependiente, donde concentraciones más elevadas resultan en una inhibición aún mayor de la germinación. Este resultado observado en agua destilada coincide exactamente con el reportado en los discos, donde no se registró crecimiento en concentraciones más altas de los aceites debido a la ausencia de germinación de las esporas.

Las esporas tratadas con concentraciones más altas de los aceites esenciales presentaron daño estructural, sugiriendo la afección de la integridad de las esporas y su capacidad germinativa. Este efecto se observa principalmente con el aceite esencial de limón, el cual muestra disminuciones significativas en el número de esporas germinadas para todas las concentraciones, siendo el más efectivo como agente inhibidor de *H. vastatrix*. Estos resultados se ajustan con los obtenidos por (Pereira et al., 2012), quienes apreciaron la capacidad de inhibir

la germinación del 50 % de esporas a partir del 10 % de la concentración de aceites esenciales variados, entre ellos algunos cítricos. Al igual que en el presente estudio, el aceite de limón mostró la mayor capacidad para inhibir la germinación, incluso causando daño estructural en las esporas.

Estos hallazgos son prometedores para la ciencia de base en el desarrollo de métodos sostenibles contra esta enfermedad en las plantas de café. Sin embargo, se necesita una investigación adicional para comprender mejor los mecanismos detrás de estos efectos, abordar las limitaciones identificadas en este estudio, como la identificación molecular del patógeno, la evaluación de la eficacia en un rango más amplio de condiciones de los aceites esenciales y la identificación de moléculas altamente específicas dentro de los mismos para estudiar sus mecanismos de acción a profundidad.

8. Conclusiones

- En este estudio se logró identificar morfológicamente las esporas de *Hemileia vastatrix* a partir de muestras recolectadas de hojas infectadas, observándose esporas de tipo urediniósporas con características específicas. Sin embargo, la identificación molecular mediante secuenciación de ADN presentó un nivel significativo de ruido debido a limitaciones técnicas o la complejidad genética de *Hemileia vastatrix*. La curva de crecimiento de *H. vastatrix* en condiciones *in vitro*, evidenció las fases de latencia, crecimiento logarítmico y estacionario. El hongo mostró un desarrollo activo hasta los 28 días de estudio, sin evidencia de disminución que indique la muerte de las colonias de *Hemileia vastatrix*.
- Los aceites esenciales de mandarina, naranja y limón demostraron tener un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento y desarrollo de *Hemileia vastatrix* en condiciones *in vitro*, siendo el aceite de limón el de mayor eficacia inhibitoria, seguido por el aceite de mandarina y luego el de naranja. El área infectada por el hongo presentó una disminución gradual a medida que incrementaban las concentraciones de los aceites esenciales, indicando una relación dosis-respuesta. Además, los tratamientos con aceites esenciales de mandarina, naranja y limón inhibieron la germinación de las esporas de *Hemileia vastatrix*, especialmente en concentraciones más altas, generando daño estructural, lo que contribuyó a la supresión del desarrollo fúngico.
- Estos resultados sugieren que los aceites esenciales de mandarina, naranja y limón poseen un alto potencial para inhibir el crecimiento y desarrollo de *Hemileia vastatrix*, así como su capacidad de germinación. Estos hallazgos pueden tener implicaciones importantes para futuros estudios sobre el potencial de inhibición de los aceites esenciales cítricos contra hongos fitopatógenos y sus mecanismos subyacentes.

9. Recomendaciones

- Cuidar la asepsia en todo el proceso de secuenciación de *Hemileia vastatrix* para evitar la presencia de otros hongos asociados al mismo y obtener un resultado positivo.
- Continuar con la evaluación de los aceites esenciales de otras plantas cítricas y evaluar concentraciones más bajas para el aceite de limón.
- Realizar investigaciones para comprender los mecanismos específicos de actuar de los aceites esenciales cítricos.
- Hacer estadística de transformación de esporas dados los resultados que muestro en la sección: Inhibición de germinación de esporas de *Hemileia vastatrix*.

10. Bibliografía

- Aguilar-González, A. E., Palou, E., & López-Malo, A. (2017). Response of *Aspergillus niger* Inoculated on tomatoes exposed to vapor phase mustard essential oil for short or long periods and sensory evaluation of treated tomatoes. *Journal of Food Quality Article*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4067856>.
- Aguirre-Vega, R., Alvarado-Castillo, G., Ramírez-Benítez, M. del C., García-Pérez, J. A., Hernández-Martínez, M. D. J., Torres-Pelayo, V. D. R., & Alarcón-Gutiérrez, E. (2022). In vitro and in vivo antifungal activity of *Azadirachta indica* and *Piper auritum* extracts against uredospore germination of *Hemileia vastatrix*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 40(3). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2205-1>
- Alberto Cruz-Enríquez, J., Sara Elva Espinosa-Padilla, D., & Alejandro Medina-Torres, E. (2021). Importancia del adecuado protocolo de extracción de DNA para estudios moleculares Relevance of an adequate DNA extraction protocol for molecular studies. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*. <https://doi.org/10.35366/101642>
- 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 filamentosos. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 1(4). <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3631002>.
- Amigo, Q., Garbarello, M. F., Otarola, E. M., Nardi, M. A., Frecha, C. A., Furci, A., & Oyhamburu, J. (2018). Aseguramiento de Calidad en el Laboratorio de Biología Molecular: Control de Contaminación Ambiental. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 52(2), 205-211.
- Andrade-Bustamante, G., Manelik García-López, A., Cervantes-Díaz, L., Aíl-Catzim, C. E., Borboa-Flores, J., & Rueda-Puente, E. O. (2017). Estudio del potencial biocontrolador de las plantas autóctonas de la zona árida del noroeste de México: Control de fitopatógenos. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias*, 49(1), 127–142. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1853-86652017000100011&script=sci_abstract&tlng=en.

- Anaya Gil, J. (2021). Evaluación de la actividad toxicológica de la resina del algarrobo (*Hymenaea courbaril* L.) y del aceite de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre *Drosophila melanogaster*. Universidad de Cartagena.
- Araño-Leyva, L., Prieto-García, D., & Rodríguez-Patterson, F. (2017). Situación epidemiológica de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome) en las condiciones agroecológicas de Tercer Frente, Cuba1. *Café Cacao*, 16(1), 44-49. https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/60162007/pp._44-49_ene.-jun._201720190730-129671-nh7byf-libre.pdf?1564515304=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DSituacion_epidemiologica_de_la_roya_del.pdf&Expires=1708402512&Signature=Ku20IbQBHWznxIg6ntugznd4V63elB26rkJWHd7iKmrIgywxcED9obZWSklTpanZmLeV9WW4wabT6vVlyrmpoceFljqTcOuQLdu5K ei~Isz0JEepO6WffZ6Cq6Sd58GKO~CxeDFJSe8BIIQAh8Wz1mg6OPLhRP9a80FvP SrJmOnf9FEak-fvq6rYZezGY4JO6v6FcmdYx8ksoo~Ky4M0ysLKLeyUHYNu2CPWkfu-kekNWwxWykDZv1Xuj7qVH9JyTJcg9vnB6GAqWVgyEPYtWVGA--~NcnjI9owzf7ovM7pg0BKkRtn6r8sO6wnnB3Xshm8eKpIXsLg9WCrY-peNEQ__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA.
- Araújo-Filho, H. G. de, dos Santos, J. F., Carvalho, M. T. B., Picot, L., Fruitier-Arnaudin, I., Groult, H., Quintans-Júnior, L. J., & Quintans, J. S. S. (2021). Anticancer activity of limonene: A systematic review of target signaling pathways. *Phytotherapy Research* : PTR, 35(9), 4957–4970. <https://doi.org/10.1002/PTR.7125>
- Ávalos-García, A., E. Pérez-Urria, 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, serie Fisiología Vegetal 2: 119-145. <http://www.revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/798>.
- Avelino, J., Cristancho, M., Georgiou, S., Imbach, P., Aguilar, L., Bornemann, G., Läderach, P., Anzueto, F., Hruska, A. J., & Morales, C. (2015). The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security*, 7(2), 303–321. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0446-9>
- Barquero, M. (2013). Recomendaciones para el Combate de la Roya del Cafeto. Instituto del café de Costa Rica. Centro de Investigaciones en Café (CICAFE). Tercera Edición. ISBN 978-9977-55-045-9

- Barrezueta-Unda, S.; Moreira Blacio, W.; Quezada Abad, C. (2018). Análisis del cacao y café ecuatoriano desde su cadena de valor en el periodo 2010-2015. 6–17. Retrieved from <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/view/213/240>
- Batista, I. (2018). Enfermedades del cultivo de café. Componente de República Dominicana del Programa Centroamericano para la Gestión Integrada del Café (PROCAGICA-RD). Universidad Autónoma de Santo Domingo. <https://www.studocu.com/latam/document/universidad-autonoma-de-santo-domingo/economia-politica/2-2-enfermedades-del-cultivo-del-cafe/14075872>
- BEER, J; HARVEY, C; IBRAHIM, M; HARMAND, JM; SOMARRIBA, E; JIMENEZ, F. (2003). Servicios ambientales de los sistemas agroforestales. Agroforestería En Las Américas, 37(10), 80–87. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/6806>.
- Buchanan, R.L., Whiting, R.C., Damert, W.C. (1997) “When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and threephase linear models for fitting bacterial growth curves”. Food Microbiol. 14, 313-326.
- 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 vitro* 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. <https://search.informit.org/doi/epdf/10.3316/informit.796019183282353>
- Calderón, X. (2016). Identificación molecular de morfotipos *Hemileia vastatrix* causante de la roya del café en la provincia de Loja <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/13535>.
- 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. La situación y tendencias de la producción de café en América Latina y El Caribe. ISBN: 978-92-9248-651-8

- Canjura Saravia, E. M., Sánchez Garita, V., Krauss, U., & Somarriba, E. (2002). Reproducción masiva de *Verticillium* sp., hiperparásito de la roya del café, *Hemileia vastatrix*. 1–3. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/6776>.
- Cardona Serrate, F. (2020). Los enzimas. Introducción a la enzimología. Gepp, V., & Mondino, P. (2011). Control químico. 2020. <http://hdl.handle.net/10251/146362>.
- Castaño-Zapata, J. 1994. Principios básicos de fitopatología. 2ed. Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. Publicación DPV-EAP No. 596. p. 69-91. ISBN: 1885995180, 9781885995186
- Castillo-Reyes, F., Hernández-Castillo, F., Gallegos-Morales, G., Flores-Olivas, A., Rodríguez-Herrera, R., y Aguilar, C. (2015). Efectividad *in vitro* de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, pp. 49-562. <https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v6n3/v6n3a9.pdf>.
- Cerna Chávez, E., Magaña Arteaga, R., Velazquez Guerrero, J. J., Ochoa Fuentes, Y. M., & Hernandez Bautista, O. (2019). Evaluación de extractos vegetales sobre incidencia y severidad de *Hemileia vastatrix* en cultivo de café. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 6(18). <https://doi.org/10.19136/era.a6n18.2182>
- Chamorro, A. C. A., & Benavides, N. A. B. (2017). El mercado del café en los contextos mundial, nacional y regional. *Revista UNIMAR*, 35(2), 24. <https://revistas.umariana.edu.co/index.php/unimar/article/view/1543>.
- Ciriminna, R., Lomeli Rodriguez, M., Demma Carà, P., Lopez Sanchez, J. A., & Pagliaro, M. (2014). Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy. *Chemical Communications*, 50(97), 15288–15296. <https://doi.org/10.1039/C4CC06147K>
- Correa, G. (2014) Los fungicidas sistémicos en la prevención y control de la Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.), en el Cantón las Lajas, Provincia de el Oro. Tesis para optar por el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Técnica de Machala. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Machala, Ecuador. pp 18-40. http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1052/7/CD313_TESIS.pdf.
- Cumbicus Torres, Esthela Marivel . Jiménez Azuero, Ruth Mariela , (2012). Análisis Sectorial del Café en la Zona 7 del Ecuador. (Tesis de Administración de Empresas) . UTPL. pp. 132

- Davicino, R., Mattar, M. A., Casali, Y. A., Correa, S. G., Pettenati, E. M., & Micalizzi, B. (2007). Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Revista Peruana de Biología*, 14(2), 247–252. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332007000300011&lng=es&nrm=iso&tlng=es.
- Deepak, K., Hanumantha, B. T., & Sreenath, H. L. (2012). Viability of *coffee leaf rust* (*Hemileia vastatrix*) urediniospores stored at different temperatures. *J Biotechnol Biomater*, 2(5), 1-3. DOI:10.4172/2155-952X.1000143.
- Dellavalle, P. D., Cabrera, A., Alem, D., Larrañaga, P., Ferreira, F., & Rizza, M. D. (2011). Actividad antifúngica de extractos de plantas medicinales contra el hongo fitopatógeno *Alternaria* spp. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(2), 231–239. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392011000200008>
- Devine, Gregor J., Eza, Dominique, Ogusuku, Elena, & Furlong, Michael J.. (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 25(1), 74-100. Recuperado en 24 de febrero de 2024, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342008000100011&lng=es&tlng=es.
- Deza Borau, G. (2019). Desarrollo de un novedoso Bioinsecticida para un control orgánico de la Cochinilla Harinosa en viñedos. <https://rdu.unc.edu.ar/handle/11086/14088>
- DGSV-SINAVEF-LANREF, 2015. Escalas de severidad de roya del café en hoja y planta. En línea: <http://www.royacafe.lanref.org.mx/Documentos/EscalaSeveridadDefoliacion>.
- doTerra.(2023).https://www.doterra.com/EC/es_EC/?gad_source=1&gclid=CjwKCAjw8diwBhAbEiwA7i_sJS-LLq32Kz7tX0LvUFBSUTPfxHBVQr6XeiH0bze-rtbltrw8fSx4IRoCGWgQAvD_BwE
- Duicela Guambi, L. A., & Ponce Vaca, L. A. (2015). Uso de fungicidas sistémicos en el control de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) en la provincia de Manabí. *La Técnica*, ISSN 1390-6895, ISSN-e 2477-8982, No. 15, 2015 (Ejemplar Dedicado a: Diciembre), Págs. 6-17, 15, 6–17. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6087680&info=resumen&idioma=ENG>
- Durán Aguirre, C. E., Pratissoli, D., Carvalho, J. R. de, Pacheco Damascena, A., Araujo Junior, L. M. de, Bolsoni Zago, H., Durán Aguirre, C. E., Pratissoli, D., Carvalho, J. R. de,

- Pacheco Damascena, A., Araujo Junior, L. M. de, & Bolsoni Zago, H. (2020). Actividad insecticida de aceites esenciales sobre *Helicoverpa armígera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Idesia (Arica)*, 38(4), 59–64. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292020000400059>
- Echeverri, D., Buitrago, L., Montes, F., Mejía, I., & González, M. del P. (2005). Café para cardiólogos. *Revista Colombiana de Cardiología*, 11(8), 357–365. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-56332005000200001&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Enríquez, J. P., Retes-Cálix, R. F., & Vásquez-Reyes, E. F. (2020). Importancia, genética y evolución del café en Honduras y el mundo. *Innovare: Revista de Ciencia y Tecnología*, 9(3), 149–155. <https://doi.org/10.5377/INNOVARE.V9I3.10649>
- Fajardo-Franco, Marja Liza, Aguilar-Tlatelpa, Martin, & Guzmán-Plazola, Remigio A.. (2020). Evaluación de biofungicidas en dos variedades de café para el control de *Hemileia vastatrix*. *Revista mexicana de fitopatología*, 38(2), 293-306. Epub 27 de noviembre de 2020. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2001-1>
- Fernández, R., De Guglielmo, Z., & Menéndez, A. (2010). Cultivo de tejidos y transformación genética de café Cultivo de tejidos y transformación genética de café. *Revista de Investigación*, 34(71), 57–84. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-29142010000300004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- GAD Quilanga. (2023). ACTUALIZACIÓN DEL PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL DEL CANTÓN QUILANGA 2019-2023. 29-31. <https://es.scribd.com/document/664408225/Pdot-Quilanga-2019-2023>
- García, 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, C. (2018). Los sistemas agroforestales hacia la resiliencia ambiental. [http://centa.gob.sv/docs/guias/recursos_naturales/BROCHOURE Sistemas Agroforestales.pdf](http://centa.gob.sv/docs/guias/recursos_naturales/BROCHOURE_Sistemas_Agroforestales.pdf)
- García, J. E. (2016). Negative consequences of pesticides on the environment. *Agronomía Mesoamericana*, 8(1), 119–135. <https://doi.org/10.15517/am.v8i1.24747>

- Garre Pérez, A., Egea Larrosa, J. A., & Fernández Escámez, P. S. (2016). Modelos matemáticos para la descripción del crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos. *Anuario de Jóvenes Investigadores*, ISSN 2386-3676, Vol. 9, 2016, Págs. 160-163, 9, 160–163.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5981367&info=resumen&idioma=SPA>
- GraphPad Prism (10.1.2). (2023). [Software]. <https://www.graphpad.com/features>
- Grosse R et al (2000). Extracción del Aceite Esencial de Naranja Cajera citrus. *Acta Científica Venezolana* 51(2), 200-208.
- Gómez López, A. R. (2021). Diseño de agroecosistemas, macrofauna presente y salud del suelo en dos agroecosistemas con cacao (*Theobroma cacao* L.) Los Chiles, San Carlos, Rio San Juan, Nicaragua, 2017-2018.
- Guharay, F. (2001). ¿Cómo manejar las plagas y enfermedades en cafetales con sombra? *Agroforestería En Las Américas*, 8(29). <http://bco.catie.ac.cr:8087/portal-revistas/index.php/AGRO/article/view/504/655>
- Guédez, Clemencia, Cañizalez, Luis, Avendaño, Laura, Scorza, José, Castillo, Carmen, Olivar, Rafael, Méndez, Yolanda, & Sánchez, Libert. (2014). Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 34(2), 81-87. Recuperado en 27 de febrero de 2024, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562014000200007&lng=es&tlng=.
- Herrera, JC; Alvarado, G; Cortina, H; Combes, MC; Romero, G; Lashermes, P. 2009. Genetic analysis of partial resistance of coffee leaf rust (*Hemileia vastarix* Berk & Br.) introgressed into the cultivated *Coffea arabica* L. from the diploid *C. canephora* species. *Euphytica* 167: 57-67. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10681-008-9860-9>.
- Hombreiro, L., Serrulla, F., Cascallana, J. L., Río, I. Del, & Liste, A. F. (2015). Descriptive study of the causes of contamination in forensic sampling of DNA. *Cuad Med Forense*, 21(4), 135–151.
- Image J (1.8.0). (2023). [Software]. <https://imagej.net/ij/>
- Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias INIAP. (2014). *Café Arabigo*.

- Ishii, H., & Hollomon, D. W. (2015). Fungicide resistance in plant pathogens - principles and a guide to practical management. In *Indian Phytopathology* (Vol. 40). <https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8>
- Jácome, A. R., & Garrido, A. (2017). A real option analysis applied to the production of Arabica and Robusta coffee in Ecuador. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.5424/sjar/2017151-10098>
- Jiménez C, E. J. (2021). Actividad biológica de los aceites esenciales. *Tesis previa a la obtención de Ingeniero agrónomo*. <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/24280/1/Edison%20Joel%20Jim%C3%A9nez%20Cumbicus.pdf>.
- Jiménez, W. J. J., Guevara, J. A. Z., Mori, J. R. C., & Santi, W. E. M. (2022). Actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial de citrus sinensis, citrus paradisis y citrus reticulata. *RECIAMUC*, 6(3), 399–407. [https://doi.org/10.26820/RECIAMUC/6.\(3\).JULIO.2022.399-407](https://doi.org/10.26820/RECIAMUC/6.(3).JULIO.2022.399-407)
- Juarez, G. P., Sosa, M. E., & Lopez, A. (2010). Hongos Fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, Vol. 4, pp. 14–23. <https://tsia.udlap.mx/hongos-fitopatogenos-de-alta-importancia-economica-descripcion-y-metodos-de-control/>.
- Kushalappa, A. C., & Eskes, A. B. (1989). *La roya del café: epidemiología, resistencia y gestión*. CRC Press
- Lauzardo, A. N. H., Baños, S. B., & del Valle, M. G. V. (2007). Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(2), 119-123. <https://www.redalyc.org/pdf/610/61030202.pdf>.
- León Avilés Doris, D. J. (2020). Análisis de la información científica de Microorganismos eficientes de montaña para potenciar la Diversidad Biológica de los Suelos Agrícolas. <http://localhost/handle/27000/7044>
- Libert-Amico, A., Paz-Pellat, F., Libert-Amico, A., & Paz-Pellat, F. (2018). Del papel a la acción en la mitigación y adaptación al cambio climático: la roya del cafeto en Chiapas. *Madera y Bosques*, 24(SPE). <https://doi.org/10.21829/MYB.2018.2401914>
- LOPEZ NUÑEZ, R. I. (2023). EVALUACIÓN DE FORMULACIÓN DE SAPONINAS DE AGAVE Y LIMONENO COMO BIOHERBICIDA. <https://rinacional.tecnm.mx/jspui/handle/TecNM/5770>

- Loureiro, A. G. (2015). Un método para obtener ARN de *Hemileia vastatrix* appressoria producido in planta , adecuado para análisis transcriptómicos. *Biología fúngica*, (1093-1099). <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.08.008>
- Macias, S. C. M. O. (2018). Analisis de los Costos de Producción y Rentabilidad del Cultivo de Café (coffea spp) en la Region Amazonica del Ecuador. *International Journal of Social Science and Economics Invention*, 4(01), 438-to. DOI: 10.23958/ijsssei/vol04-i01/01.
- MAG. (15 de Mayo de 2020). Ministerio de Agricultura y Ganadería. Obtenido de <https://www.agricultura.gob.ec/entregan-3-000-plantas-de-cafe-en-sozoranga-pararecuperar-areas-degradadas>.
- MAG. (2017). Ministerio de Agricultura y Ganadería. Obtenido de <https://www.agricultura.gob.ec/magap-ejecuta-proyecto-de-reactivacion-de-lacaficultura-ecuatoriana/>
- Maia, T., Badel, J. L., Fernandes, M. B., Bragança, C. A. D., Mizubuti, E. S. G., & Brommonschenkel, S. H. (2017). Variation in Aggressiveness Components in the *Hemileia vastatrix* Population in Brazil. *Journal of Phytopathology*, 165(3), 174–188. <https://doi.org/10.1111/jph.12548>.
- Mantuano, W. P., Ganchozo, B. I., Landín, A. C., Tumbaco, M. V., & Ortega, J. G. (2022). PRINCIPALES ENFERMEDADES CAUSANTES DE LA PÉRDIDA DE RENDIMIENTOS DE LOS CULTIVOS DE CAFÉ ARÁBIGO (*Coffea arabica* L.) EN LA ZONA SUR DE MANABÍ, ECUADOR. *UNESUM - Ciencias. Revista Científica Multidisciplinaria*, 6(2), 117–134. <https://doi.org/10.47230/unesciencias.v6.n2.2022.632>
- Martínez, M. A. (2011). Consecuencias ambientales del uso de pesticidas. *Ciencia Hoy*, 30-35. <http://ri.agro.uba.ar/files/download/articulo/2017martinezghersa1.pdf>.
- Mesa, A. M., Marin, P. A., Ocampo, O., Calle, J., & Monsalve Fonnegra, Z. I. (2019). Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. Ediciones INTA. <https://hdl.handle.net/10495/30774>
- Montagnini, F., Somarriba, E., Murgueitio, E., Fassola, H., y Eibl, B. (2015). Sistemas Agroforestales. Funciones Productivas, Socioeconómicas y Ambientales. Serie técnica.

- Informe técnico 402. CATIE, Turrialba, Costa Rica. Editorial CIPAV, Cali, Colombia. 454p. ISBN: 978-958-9386-74-3
- Montes, R. (2009). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista mexicana de micología*, 29, 73-82. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-31802009000100010&script=sci_abstract&tlng=pt
- Morales-Antonio, M. A., Santiago-Martínez, G. M., Vásquez-López, A., Rodríguez-Ortiz, G., Soto-Castro, D., Lozano-Trejo, S., & Castañeda-Hidalgo, E. (2021). Uredospore germination of *Hemileia vastatrix* and its inhibition by the effect of plant extracts in vitro. *International Journal of Agriculture and Natural Resources*, 48(2), 108–114. <https://doi.org/10.7764/IJANR.V48I2.2272>
- Moreira-Morrillo, A. A., Vélez-Zambrano, J. P., Intra Moreira, S., & Garcés-Fiallos, F. R. (2023). Diseases affecting the coffee crop: Elucidating the life cycle of Rust, Thread Blight and Cercospora Leaf Spot. *Scientia Agropecuaria*, 13(3), 395–412. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2023.035>
- Moreno Ruiz, G. (2023). OBTENCIÓN DE VARIEDADES DE CAFÉ CON RESISTENCIA DURABLE A ENFERMEDADES, USANDO LA DIVERSIDAD GENÉTICA COMO ESTRATEGIA DE MEJORAMIENTO. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 28(107), 187–200. [https://doi.org/10.18257/raccefyn.28\(107\).2004.1988](https://doi.org/10.18257/raccefyn.28(107).2004.1988)
- Murugachandran, S. I., & Sanz, M. E. (2022). Interactions of limonene with the water dimer. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 24(43), 26529–26538. <https://doi.org/10.1039/D2CP04174J>
- Narváez Baque, F. J., Barzola Miranda, S., Fon-Fay Vásquez, F. M., Martínez Chávez, M. J., Neira Mosquera, J. A., & Sánchez Llaguno, S. N. (2017). Potencial antifúngico de *Citrus sinensis* y *Citrus nobilis* sobre el crecimiento de *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya. *Ciencia y Tecnología*, 10(1), 41–46. <https://doi.org/10.18779/cyt.v10i1.194>
- OIC. (2018). Consejo Internacional del Café 121 o período de sesiones 9-13 abril 2018 Ciudad de México, México. Retrieved from <https://www.federaciondecafeteros.org/algrano-fnc>.

- Olea, N., & Fernández, M. (2001). Plaguicidas persistentes. In *Memorias Congreso Implementación del Convenio de Contaminantes Orgánicos Persistentes* (pp. 1-18). https://www.otragranada.org/IMG/pdf/Plaguicidas_persistentes.pdf
- 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>
- Ordeñana, K. M. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Revista Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica*, 63, 22-32. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/6562>
- Gabriel Ortega, J., Parrales Parrales, T., Castro Piguave, C. A., Narváez Campana, W. V., & Fuentes Figueroa, T. (2023). Evaluación de la resistencia genética a enfermedades foliares en 20 accesiones de café arábigo (*Coffea arabica* L.) del banco de germoplasma de la Universidad Estatal del Sur de Manabí. *Agrosilvicultura Y Medioambiente*, 1(1), 26–40. <https://doi.org/10.47230/agrosilvicultura.medioambiente.v1.n1.2023.26-40>
- Palacios-Reyes, A. D., Durand-Smith, M. L., Valle-Mora, J. F., Saldívar-Moreno, A., Palacios-Reyes, A. D., Durand-Smith, M. L., Valle-Mora, J. F., & Saldívar-Moreno, A. (2023). Desafíos de los medios de vida frente a la roya del café en dos comunidades del Soconusco, Chiapas, México. *Estudios Sociales. Revista de Alimentación Contemporánea y Desarrollo Regional*, 33(61). <https://doi.org/10.24836/ES.V33I61.1264>
- Patyka, V., Buletsa, N., Pasichnyk, L., Zhitkevich, N., Kalinichenko, A., Gnatiuk, T., & Butsenko, L. (2016). Specifics of pesticides effects on the phytopathogenic bacteria. *Ecological Chemistry and Engineering S*, 23(2), 311–331. <https://doi.org/10.1515/eces-2016-0022>
- Pereira, R. B., Lucas, G. C., Perina, F. J., & Alves, E. (2012). Essential oils for rust control on coffee plants. *Ciência e Agrotecnologia*, 36(1), 16–24. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542012000100002>
- Pérez López, E. (2012). Reseña Reseña Reseña Reseña Reseña Reseña PLAGUICIDAS BOTÁNICOS: UNA ALTERNATIVA A TENER EN CUENTA. *Fitosanidad*, 16(1), 51–59.

- Pérez-Soto, Francisco; Godínez-Montoya, Lucila; Figueroa-Hernández, Esther. (2015). La producción y el consumo del café. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/64936>
- Pinedo Taboada, E. M. (2021). El uso de plaguicidas químicos en el cultivo de café (*Coffea arabica*) su relación con el medio ambiente y la salud” en los caseríos de Julio Cesar Tello, Alto Cuchara y los Ángeles Km7 Leoncio Prado. Universidad Nacional Agraria de La Selva. <http://repositorio.unas.edu.pe/handle/20.500.14292/2563>
- 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>
- Ponce Vaca, L. A., Orellana Suarez, K. D., & Acuña Velázquez, I. R. (2016). Diagnóstico y propuesta de un sistema de innovación tecnológica cafetalera en Ecuador. *Revista Cubana De Ciencias Forestales*, 4(2), 120–129. Recuperado a partir de <https://cfores.upr.edu.cu/index.php/cfores/article/view/138>
- 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>
- PROECUADOR. (31 de Mayo de 2019). PROECUADOR, Negocios sin fronteras. Obtenido de <https://www.proecuador.gob.ec/precio-mundial-de-cafe-llega-a-niveles-mas-bajos-en-10-anos/>
- Quintana-Obregón, E. A., Sánchez-Mariñez, R. I., Cortez-Rocha, M. O., González-Aguilar, G. A., Quintana-Obregón, E. A., Sánchez-Mariñez, R. I., Cortez-Rocha, M. O., & González-Aguilar, G. A. (2017). Actividad antifúngica in vitro de mezcla de terpenos de naranja contra *Alternaria tenuissima*. *Revista Mexicana de Micología*, 45, 7–12. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802017000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Quispe-Apaza, C. S., Mansilla-Samaniego, R. C., López-Bonilla, C. F., Espejo-Joya, R., Villanueva-Caceda, J., Monzón, C., Quispe-Apaza, C. S., Mansilla-Samaniego, R. C., López-Bonilla, C. F., Espejo-Joya, R., Villanueva-Caceda, J., & Monzón, C. (2017). Diversidad genética de *Hemileia vastatrix* de dos zonas productoras de café en el Perú.

- Revista Mexicana de Fitopatología, 35(3), 418–436.
<https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1612-7>
- Ramón, F. A. (2024). Cultivo de línea pura de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br, causante de la roya del café mediante implementación de ciclos continuos de inoculaciones in vitro. *Trabajo de Titulación previo a la obtención del Título de Ingeniero Agrónomo*, 58.
- R Core Team. (2021). *R: A language and environment for statistical computing*, Vienna, Austria. Obtenido de URL <https://www.R-project.org/>.
- Ramírez Rojas, J., & Cerda, R. (2021). Manejo integrado del cultivo de café con énfasis en prácticas MIP [guía]. <https://bvearmb.do/handle/123456789/3335>
- Ringuelet, J., Ocampo, R., Henning, C., Padín, S., Urrutia, M. I., & Bello, G. D. (2014). Actividad insecticida del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown sobre *Tribolium castaneum* Herbst. en granos de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Revista Brasileira de Agroecología*, 9(2). <https://revistas.aba-agroecologia.org.br/rbagroecologia/article/view/15442>
- Rivillas, C. A., Serna, C. A., & Gaitan, A. (2011). La roya del cafeto en Colombia: Impacto manejo y costos del control. <https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/594>.
- Rivillas, O. C. A., & Carlos, A. (2015). Acciones emprendidas por Colombia en el manejo de la roya del cafeto. *Memorias del Seminario Científico Internacional “Manejo Agroecológico de la Roya del Café”*. Panamá, Panamá. FAO, 11-16.
- Rodas Arzét, A. M., García Alvares, R. J., Salomón Miranda, G., & Nufio Barillas, J. S. (2015). Evaluación y caracterización extractos botánicos supercríticos de orégano (*Lippia graveolens*) para el control de la Roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.) en las zonas productoras del municipio de la Unión, departamento de Zacapa. <http://digi.usac.edu.gt/>
- Rodríguez Pedroso, Aida Tania; Miguel A., Ramírez Arrebato; Silvia, Bautista Baños; Ariel, Cruz Triana; Deyanira, R. (2012). Actividad antifúngica de extractos de *Acacia farnesiana* sobre el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. 12(1), 91–96. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4277990>.
- Rodríguez-Peña, R. (2022). Eficacia de aceites esenciales de plantas de la familia Myrtaceae en el control de la roya de café (*Hemileia vastatrix* Berk. & Broom). *APF*, 10(2), 69–82. Recuperado a partir de <https://sodiaf.org.do/apf/index.php/apf/article/view/133>

- Rozo-Peña, Y. I., & Cristancho-Ardila, M. A. (2011). Evaluación de la susceptibilidad de *Hemileia vastatrix* Berk. y Br., a fungicidas del grupo de los triazoles. *Cenicafé*, 61(4), 297–314. <https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/504>.
- Sánchez-Coello, Nadia Guadalupe, Luna-Rodríguez, Mauricio, Vázquez-Torres, Mario, Sánchez-Velásquez, Lázaro Rafael, Santana-Buzzy, Nancy, Octavio-Aguilar, Pablo, & Iglesias-Andreu, Lourdes Georgina. (2012). Optimización de un protocolo del aislamiento del ADN y de un sistema de amplificación ISSR-PCR para *Ceratozamiamexicana* Brongn. (Zamiaceae). *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 18(1), 123-133. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa,2011.03.024>
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Bogotá, Colombia: Convenio Andrés Bello Y Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. (Vol 78). ISBN: 958-698-001-4.
- Sistema Nacional De Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (2013). Ficha técnica Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berkeley y Broome). SINAVEF. <https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/ContenidoPublico/Roya%20cafeto/Fichas%20tecnicas/Ficha%20T%C3%A9cnica%20de%20Roya%20del%20cafeto.pdf>.
- Silva, J. L., Souza, P. E., Monteiro, F. P., Freitas, M. L. O., Silva Júnior, M. B., & Belan, L. L. (2014). Antifungal activity using medicinal plant extracts against pathogens of coffee tree. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 16(3), 539–544. https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_155
- 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. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=s0864-03942017000100006&script=sci_arttext.
- Spreen, T. H., Mosquera, M., Grogan, K. A., & Evans, E. A. (2013). Análisis económico de las enfermedades en plantas perennes. *Revista Palmas*, 34, 135-145. <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/10676>.
- Steeven Arreaga-Ronquillo, E., Maribel Quezada-Campoverde, J., Alejandro Barrezueta-Unda, S., Rodolfo Cervantes-Alava, A., & Prado-Carpio, E. (2021). Impacto económico generado por la producción cafetalera en Ecuador en el periodo 2016- 2019. *593 Digital Publisher CEIT*, 6(6), 83–91. <https://doi.org/10.33386/593dp.2021.6.732>

- Stegmayer, M. I., Fernández, N. L., Álvarez, N.H., Olivella, L., Gutiérrez, H. F., Favaro, M. A., & Derita, M. G. (2021). Aceites esenciales provenientes de plantas nativas para el control de hongos fitopatógenos que afectan a frutales. *FAVE Sección Ciencias Agrarias*, 20(1), 317–329. <https://doi.org/10.14409/fa.v20i1.10273>
- Subero, L. (2005). Información del café (INFOCAFES). La roya del cafeto. <http://www.infocafes.com/descargas/biblioteca/136.pdf>.
- Talhinhas, P., Batista, D., Diniz, I., Vieira, A., Silva, D. N., Loureiro, A., Tavares, S., Pereira, A. P., Azinheira, H. G., Guerra-Guimarães, L., Várzea, V., & Silva, M. do C. (2017). The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology*, 18(8), 1039–1051. <https://doi.org/10.1111/mpp.12512>
- Tocancipá-Falla, J. (2002). EL CAFÉ, HISTORIA DE LA SEMILLA QUE CAMBIÓ AL MUNDO. *Revista Colombiana de Antropología*, 38, 340–343. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0486-65252002000100015&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Usano-Aleman, J., Paúl, J. P., & Díaz, S. (2014). Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana. *REDUCA (Biología)*, 7(2), 60–70. <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/1553>
- Vargas-González, G., Alvarez-Reyna, V. de P., Guigón-López, C., Cano-Ríos, P., García-Carrillo, M., Vargas-González, G., Alvarez-Reyna, V. de P., Guigón-López, C., Cano-Ríos, P., & García-Carrillo, M. (2019). Impacto ambiental por uso de plaguicidas en tres áreas de producción de melón en la Comarca Lagunera, México. *CienciaUAT*, 13(2), 113–127. <https://doi.org/10.29059/CIENCIAUAT.V13I2.1141>
- 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. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-87062014000100002&lng=pt&nrm=iso&tlng=es.
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Ba-Surto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194–205. <https://doi.org/10.15446/ACAG.V64N2.43358>

- Villalta-Villalobos, J., & Gatica-Arias, A. (2019). Una mirada en el tiempo: mejoramiento genético de café mediante la aplicación de la biotecnología. *Agronomía Mesoamericana*, 577–599. <https://doi.org/10.15517/am.v30i2.34173>
- Wolansky, M. (2011). Plaguicidas y salud humana. *Ciencia Hoy*, 10-35. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4316139>.
- World Health Organization. (2010). Código internacional de conducta sobre la distribución y utilización de plaguicidas: directrices para el registro de plaguicidas (No. WHO/HTM/NTD/WHOPES/2010.7). Ginebra: Organización mundial de la Salud. https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Code/Annotated_Guidelines_SP.pdf.
- Zambolim, L. (2016). Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 41(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s40858-016-0065-9>

11. Anexos

Anexo 1. Aceites esenciales utilizados.



Anexo 2. Composición de los aceites esenciales.

Aceite esencial de naranja:



Aceite esencial de limón:



Aceite esencial de mandarina:

QUÍMICA:



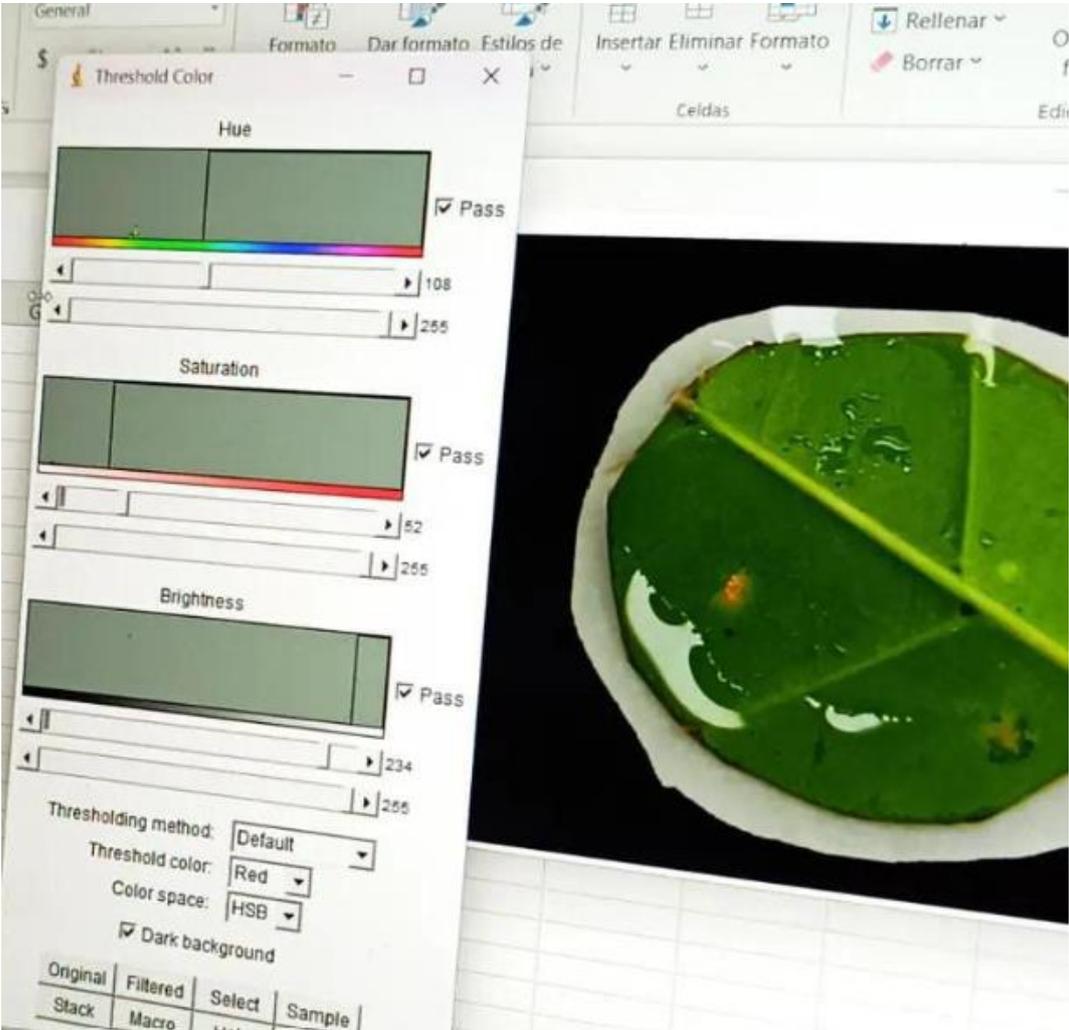
Los constituyentes químicos principales del aceite de mandarina son: myrcene y limonene.

Este gráfico representa los compuestos químicos más prevalentes en este aceite esencial. Se pueden encontrar otros constituyentes.

Anexo 3. Cajas Petri utilizadas ubicadas en la cámara de ensayos en condiciones controladas.



Anexo 4. Registro de datos del diámetro infectado en el software Image J.



Anexo 5. Certificado de traducción del abstract.

CERTIFICACIÓN DE TRADUCCIÓN DEL RESUMEN (ABSTRACT)

Loja, 25 de mayo de 2024

Yo, Jhaneth Patricia Álvarez Urrego, **Licenciada en Ciencias de la Educación mención: Inglés** (registro Nro.: 1031-2020-2197492) a petición de la parte interesada.

CERTIFICO:

Que el documento aquí compuesto es fiel traducción del idioma español al inglés, del resumen de la tesis bajo el nombre **“Evaluación del potencial inhibitorio de aceites esenciales de plantas cítricas contra el crecimiento de *Hemileia vastatrix* (roya del café) en condiciones *in vitro*”**, de la autoría de **Jennifer Adriana Ludeña Luzón**, con cédula de identidad: **1106005059**; egresada de la carrera de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de Loja, previa a la obtención del título de Ingeniera Ambiental.

Particular que certifico en honor a la verdad, autorizando a la interesada hacer uso del presente para los fines académicos pertinentes.



Lic. Jhaneth Patricia Álvarez Urrego

C.I: 1950031698