



Universidad
Nacional
de Loja

Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Carrera de Ingeniería Agronómica

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

AUTOR:

Franco Alexander Ramón Maldonado

DIRECTOR:

Jorge I. Armijos-Rivera, PhD

Loja – Ecuador

2024

Certificación

Loja, 28 de febrero del 2023

Jorge I. Armijos-Rivera, PhD
DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

CERTIFICO:

Que luego de haber revisado y orientado el Trabajo de Titulación: **Cultivo de línea pura de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br, causante de la roya del café mediante implementación de ciclos continuos de inoculaciones *in vitro***, previo a la obtención del título de **Ingeniero Agrónomo**, del egresado **Franco Alexander Ramón Maldonado**, con cedula de identidad Nro. **1105869299**, se autoriza su presentación debido a que el mismo se sujeta a las normas y reglamentos generales de graduación exigido para la carrera de Ingeniería Agronómica de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja.

En mi calidad de Director, certifico que el Trabajo de Titulación realizado ha sido propio del egresado.



Jorge I. Armijos-Rivera, PhD
DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Autoría

Yo **Franco Alexander Ramón Maldonado**, declaro ser el autor del presente Trabajo de Titulación y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi Trabajo de Titulación, en el repositorio Institucional- Biblioteca Virtual.

A handwritten signature in black ink, enclosed within a hand-drawn oval. The signature is stylized and appears to read 'Franco Alexander Maldonado'.

Firma:

Cédula: 1105869299

Fecha: 1/05/2024

Nombre: Franco Alexander Ramón Maldonado

Correo: franco.ramon@unl.edu.ec

Teléfono: 0988125464

Carta de autorización para consulta, reproducción parcial o total y/o publicación electrónica del texto completo, del trabajo de titulación

Yo, **Franco Alexander Ramón Maldonado**, declaro ser el autor del Trabajo de Titulación denominado: **Cultivo de línea pura de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br, causante de la roya del café mediante implementación de ciclos continuos de inoculaciones *in vitro***, como requisito para obtener el título de **Ingeniero Agrónomo**, 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 Titulación que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización suscribo, en la ciudad de Loja.



Firma:

Autor: Franco Alexander Ramón Maldonado

Cédula: 1105869299

Dirección: Esteban Godoy tercera etapa

Correo electrónico: franco.ramon@unl.edu.ec

Celular: 0988125464

DATOS COMPLEMENTARIOS

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

Dedicatoria

El presente trabajo de investigación va dedicado primeramente a DIOS, quien me acompaña y me guía en este largo caminar, a mis padres pilares fundamentales que me impulsan en los momentos de flaqueza, a mis tíos Mauricio, Nancy y Maritza, Marcia quienes me apoyan en los momentos que más necesito, a mis hermanos: Andrés, Alex José, Ronny, Nataly y Ismael quienes me brindan su comprensión, aprecio y apoyo incondicional.

A mis amigos de la infancia Carlos, Gira y Lisandro que estuvieron en los momentos de tristeza y melancolía brindándome su tiempo y atención, finalmente a toda mi familia quienes nunca me dejaron solo mientras esté vivo apoyándome en los distintos procesos de formación.

Con estima y afecto

Franco Ramón

Agradecimiento

Mi agradecimiento a la Universidad Nacional de Loja, a todos los docentes de la carrera de Ingeniería Agronómica quienes me permitieron formarme bajo su tutela compartiéndome sus conocimientos y experiencias.

Agradezco al equipo de investigación Genética y Biología Molecular y a mi tutor Jorge I. Armijos-Rivera, PhD por brindarme la oportunidad de utilizar las instalaciones y llevar a cabo el proyecto de investigación, a mi amigo PhD. Ángel Robles por compartirme sus conocimientos e información referida a los temas de estudio.

Finalmente agradezco a mis colegas y amigos que conocí en este trayecto de formación con estima y afecto.

Franco Ramón

Índice de Contenidos

| | |
|---|-----|
| Portada..... | I |
| Certificación | ii |
| Autoría..... | iii |
| Carta de autorización | iv |
| Dedicatoria..... | v |
| Agradecimiento | vi |
| Índice de contenidos..... | vii |
| Índice de figuras | ix |
| Índice de tablas | x |
| Índice de anexos..... | xi |
| 1. Título..... | 1 |
| 2. Resumen | 2 |
| 2.1 Abstract | 3 |
| 3. Introducción..... | 4 |
| 4. Marco teórico..... | 7 |
| 4.1. Roya del Café..... | 7 |
| 4.1.1. Identidad de <i>Hemileia vastatrix</i> | 7 |
| 4.2. Ciclo biológico de <i>Hemileia vastatrix</i> | 9 |
| 4.2.1. Epidemiología | |
| 4.3. Cultivos de líneas puras de hongos o microorganismos..... | 10 |
| 4.4. Curvas de severidad de microorganismos fitopatógenos..... | 11 |
| 4.5 Intentos por cultivar la roya del café..... | 11 |
| 4.6. Variedades de <i>Hemileia vastatrix</i> , diversidad genética | 12 |
| 4.7. Variedades de café como hospederos principales de <i>Hemileia vastatrix</i> | 13 |
| 4.8. Resistencia de las hojas de café al ser cortado el tejido celular de manera manual o natural | 14 |
| 5. Materiales y métodos | 16 |
| 5.1. Material vegetal | 16 |

| | |
|---|-----------|
| 5.1.1 Fase de laboratorio | 16 |
| 5.2. Metodología para el Primer Objetivo | 17 |
| 5.2.1. Tiempo de vida útil de <i>Hemileia vastatrix</i> , usando discos de tejido foliar | 17 |
| 5.2.2 Tiempo de vida útil de los discos de café variedad típica, para la inoculación | 17 |
| 5.2.3 Línea de crecimiento o progreso de la Severidad..... | 18 |
| 5.3. Metodología Segundo Objetivo | 19 |
| 5.3.1. Protocolo..... | 19 |
| 5.4. Metodología Tercer Objetivo | 20 |
| 5.4.1 Obtención de líneas puras | 20 |
| 6. Resultados | 21 |
| 6.1. Definir curvas de crecimiento y tiempo de vida útil de <i>Hemileia vastatrix</i>, usando discos de tejido foliar | 21 |
| 6.1.1. Conteo de esporas para determinar su vida útil | 21 |
| 7. Discusión | 30 |
| 7.1. Definir curvas de crecimiento y tiempo de vida útil de <i>Hemileia vastatrix</i>, usando discos de tejido foliar..... | 30 |
| 7.2. Condiciones de humedad, luz y temperatura para el cultivo de líneas puras de <i>Hemileia vastatrix</i> en condiciones <i>in vitro</i> | 31 |
| 7.3. Líneas puras de <i>Hemileia vastatrix</i> para trabajos <i>in vitro</i> con la roya. | 33 |
| 8. Conclusiones | 35 |
| 9. Recomendaciones | 36 |
| 10. Bibliografía | 37 |
| 11. Anexos..... | 42 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ciclo fitopatogénico de <i>Hemileia vastatrix</i> | 9 |
| Figura 2. Elaboración de planos para medios de incubación adaptación y reproducción | 17 |
| Figura 3. Raspado del tejido y de masa de esporas en 10 microtubos de 2 mL de agua destilada..... | 21 |
| Figura 4. Microtubos con concentraciones..... | 22 |
| Figura 5. Adaptación de discos de hojas de 2,5 cm de diámetro | 23 |
| Figura 6. Construcción de 2 incubadoras, para adaptación de los discos de hojas de café | 24 |
| Figura 7. Adaptación del tejido foliar a temperatura óptima..... | 25 |
| Figura 8. Adaptación del tejido foliar a hummedad relativa óptima | 25 |
| Figura 9. Progresión de la infección de <i>Hemileia vastatrix</i> | 27 |
| Figura 10. Raspado tejido vegetal de los discos de café, visualizacion de tejido foliar con apreciacion estomas sanos y estomas infectados con <i>Hemileia vastatrix</i> | 28 |
| Figura 11. Aislamiento e identificación de esporas, estructuras de las esporas en formas de basidiosporas..... | 28 |
| Figura 12. Grados de porcentaje de severidad del fitopatógeno <i>Hemileia vastatrix</i> | 29 |

Índice de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Niveles de severidad en el área foliar | 18 |
| Tabla 2. Porcentaje de severidad en los discos de café | 18 |
| Tabla 3. Esporas de <i>Hemileia vastatrix</i> colectadas y depositadas en 10 microtubos..... | 21 |

Índice de Anexos

| | |
|---|----|
| Anexo 1. Establecimiento de discos de hojas de café | 40 |
| Anexo 2. Incubadoras (Dos), para aclimatar y mantener los discos de hojas | 40 |
| Anexo 3. Raspados de masa de esporas y tejido vegetal sano | 41 |
| Anexo 4. Raspado de tejido vegetal para observar estomas contaminados | 41 |
| Anexo 5. Asepsia de los discos de hojas de café e inoculación | 42 |
| Anexo 6. Inicio de la infección o severidad | 43 |
| Anexo 7. Diseño plano de 2 incubadoras | 44 |
| Anexo 8. Progreso de la severidad de <i>Hemileia vastatrix</i> a través del tiempo | 44 |
| Anexo 9. Certificado de traducción del Abstract..... | 45 |

1. Título

**Cultivo de línea pura de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br, causante de la roya del café
mediante implementación de ciclos continuos de inoculaciones *in vitro***

2. Resumen

Hemileia vastatrix, fitopatógeno responsable de la roya del café, es un parásito obligado que se alimenta de las hojas sanas del café. A nivel mundial se encuentran descritas más de 50 razas fisiológicas del hongo fitopatógeno. A pesar de diversos intentos de control, los daños causados por el uso excesivo de plaguicidas han llevado a la búsqueda de alternativas para el control de la enfermedad. En este estudio, se exploran métodos de identificación de las esporas de roya y adaptación de discos de hojas de café con el fitopatógeno *Hemileia vastatrix*. Por tal razón se seleccionaron 8 hojas sanas y 8 hojas enfermas de distintas plantas de café variedad típica. Las hojas enfermas con distintos niveles de la enfermedad, proporcionaron esporas para la inoculación en los discos de hojas sanas. Los discos sanos de hojas de café de 2,5 cm de diámetro se colocaron en cajas de Petri, con una lámina de agua de 17 ml. La inoculación de esporas en los discos de hojas se realizó en condiciones controladas por 2 incubadoras (temperatura 22,8 °C, humedad relativa 65,9 %) construidas para el proyecto, permitiendo una vida útil de los discos de café con el fitopatógeno roya de 180 días. Al iniciar el proceso de la enfermedad empiezan los primeros síntomas que se expresan a partir de los 35 días, ocasionando que la infección se propague en los discos de hojas de café eficientemente, se puede entender que el fitopatógeno usa los discos como medios de adaptación para impulsar su metabolismo y propiciar el inicio de la infección.

Palabras clave: fitopatógeno, parásito obligado, razas fisiológicas, discos de tejido foliar, inoculaciones cíclicas, infecciones cíclicas, incubadoras.

2.1 Abstract

Hemileia vastatrix, the phytopathogen responsible for coffee rust, is an obligate parasite that feeds on healthy coffee leaves. More than 50 physiological breeds of the phytopathogenic fungus have been described worldwide. Despite several attempts at control, the damage caused by the excessive use of pesticides has led to the search for alternatives to control the disease. In this study, methods of identification of rust spores and adaptation of coffee leaf discs with the phytopathogen *Hemileia vastatrix* are explored. For this reason, 8 healthy and 8 diseased leaves were selected from different coffee plants of the typical variety. The diseased leaves with different levels of the disease provided spores for inoculation into the healthy leaf discs. Healthy coffee leaf discs of 2.5 cm in diameter were placed in Petri dishes with a 17 ml sheet of water. The inoculation of spores in the leaf discs was carried out in conditions controlled by 2 incubators (temperature 22.8 °C, relative humidity 65.9 %) built for the project, allowing a useful life of the coffee discs with the phytopathogen rust of 180 days. At the beginning of the disease process, the first symptoms begin to appear after 35 days, causing the infection to spread efficiently in the coffee leaf discs. It can be understood that the phytopathogen uses the discs as a means of adaptation to boost its metabolism and propitiate the onset of infection.

Keywords: phytopathogen, forced parasite, physiological breeds, leaf tissue discs, cyclic inoculations, cyclic infections, incubators.

3. Introducción

La roya del café es una enfermedad causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, esta enfermedad es considerada una de las más catastróficas para las plantas la cual ha dejado grandes pérdidas en los últimos 100 años. Afecta a las plantas de café mediante la caída prematura de las hojas infectadas, lo cual puede reducir el rendimiento en un 50 %. La roya del café es un problema de alto impacto para la caficultura a nivel global, las pérdidas en América Latina se calculan en un 30% de las cosechas, la industria cafetera genera alrededor de 100 000 millones de dólares al año, por lo que la roya del café representa un desafío significativo para la economía global

El impacto económico del cultivo de café provocado por *Hemileia vastatrix* no solo se refleja en la reducción de la cantidad y calidad de la producción, sino también en la necesidad de implementar costosas medidas de control de la enfermedad en cultivares susceptibles (Cristancho *et al.*, 2012). Royas es un hongo fitopatógeno obligado, ampliamente distribuido en todas las regiones cafetaleras a nivel mundial (FAO, 2016). Afectando al 62% de los productores a nivel global (MAGAP, 2017).

En Ecuador el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca informó en el 2013 que el 70 % del área cafetalera de Ecuador está afectada por roya, lo cual ocasiona impactos ambientales (pérdidas de grandes extensiones de cultivo), sociales (22.400 Tm, en su producción) y económicos (75.000 fuentes de trabajo permanentes) (MAGAP, 2013). Avelino y Rivas, (2013), afirman que la intensidad de la epidemia depende de las interacciones entre el hospedero, el patógeno, el ambiente y el manejo.

Para su control, existen diversos fungicidas sistémicos o de contacto, que son aplicados en distintos estados fenológicos de la planta (Rivillas y Carlos, 2015). Sin embargo, no logran controlar por completo la enfermedad. Por otro lado, la contaminación que generan es evidente, pueden pasar a la atmósfera o permanecer en el suelo, ser retenidos en el agua o acumularse en los alimentos (Martínez, 2011). Producen efectos adversos en la salud de la población, como por ejemplo: la aparición de malformaciones congénitas o incluso el cáncer (Wolansky, 2011).

Celis *et al.*, (2009), sugieren que es necesario crear un control de enfermedades, utilizando productos derivados de plantas con la finalidad de reducir la dependencia de los productos químicos, obtener alimentos sanos y reducir la contaminación ambiental. Aunque las plantas no cuentan con un sistema inmunológico, poseen medios de defensa como las

fitoalexinas, fitoanticipinas, lignificación y suberización (Montes, 2009). La síntesis de fitoalexinas, que se acumulan en el sitio de penetración del patógeno resultando en una apoptosis (Ordeñana, 2002). Los medios de defensa también constituyen la síntesis de metabolitos secundarios como fenoles, terpenos, alcaloides y aceites esenciales (Lauzardo *et al.*, 2007). La utilización de estos compuestos constituye una opción tecnológicamente prometedora y ecológicamente sólida (Andrade-Bustamante *et al.*, 2017). La cual resulta eficaz en un amplio rango de condiciones de especies de plagas y sistemas de cultivo (Mesa *et al.*, 2019). Lo que permitirá la creación de moléculas altamente específicas mediante la previa identificación de objetivos enzimáticos a través de la disminución o inhibición de la actividad de enzimas, para alterar o inhibir el ciclo infeccioso del hongo *Hemileia vastatrix* sin afectar el cultivo u otros organismos (Cardona Serrate, 2020).

Hemileia vastatrix es una de las enfermedades más destructivas que ocasiona la pérdida prematura del follaje y la muerte de la plantación. Sus principales hospederos son *Coffea arabica* y *Coffea liberica*, que pueden ser afectados por distintas razas fisiológicas del hongo. En la población de *Hemileia vastatrix* existen individuos con diferentes cantidades de genes de virulencia, reportándose en el mundo más de 50 tipos de razas fisiológicas (Araño-leyva y Rodríguez-patterson, 2017).

En la provincia de Loja han sido identificados tres variedades (I, II y III), las cuales aún no se pueden controlar en su totalidad debido a que *Hemileia vastatrix* es un patógeno que no puede cultivarse en medios de cultivos *in vitro* (Calderón 2016). Debido a esto se plantea adaptar y aislar esporas a través de incubadoras y aislamientos mediante ciclos continuos de inoculaciones en hojas susceptibles, pero esto puede afectar las características fenotípicas y genotípicas presentes en las poblaciones silvestres. Es por ello que en el presente trabajo de titulación se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General

Identificar y cultivar la roya del café mediante ciclos continuos de inoculación utilizando material foliar *in vitro*.

Objetivos Específicos

-Definir curvas de crecimiento y tiempo de vida útil de *Hemileia vastatrix*, usando discos de tejido foliar.

-Definir las condiciones de humedad, luz y temperatura para el cultivo de líneas puras en condiciones *in vitro*.

-Obtener líneas puras de *Hemileia vastatrix* para trabajos *in vitro* con la roya.

4. Marco Teórico

4.1. Roya del Café

Hemileia vastatrix Berkeley & Broome, pertenece al Phylum *Basidiomycota*, Subphylum *Urediniomycotina*, Clase *Urediniomycetes*, Orden *Uredinales*, Familia *Incertae sedis*, del Género *Hemileia*, Especie *vastatrix*. La principal forma de multiplicación es la uredospora, teliospora, eciospora, zigospora o basidiospora, con 30 µm de largo por 20 µm de ancho, reniforme, equinulada sobre su mitad superior y lisa ventralmente, característica que le dio su nombre al género, el cual significa mitad liso (Aime, 2006; Fernandes *et al.*, 2009).

La especie *Hemileia vastatrix* sólo se ha incluido en algunos estudios filogenéticos de los hongos conocidos como roya que emplean a un pequeño número de loci (Avelino y Rivas, 2014), donde se ha demostrado que el hongo *Hemileia vastatrix* pertenece a la familia sin definir, ocupa además una posición basal en el árbol de las royas, es por lo tanto, una roya primitiva (Rivillas y Carlos, 2015).

4.1.1. Identidad de *Hemileia vastatrix*

Estudios realizados por Aime (2009), indican a la roya en el orden de los Uredinales de la familia sin definir, clasificación basada en características morfológicas confirmados por estudios moleculares. En el caso de los hongos-roya, pocos estudios filogenéticos se han desarrollado, debido entre otras razones a su condición de patógenos obligados, lo cual dificulta su manejo experimental. Los primeros estudios de este tipo que utilizaron información molecular fueron desarrollados por (Gottschalk y Blanz, 1984), se basaron en el empleo de la región 5,8S del ADNr. Posteriormente, se realizaron estudios que utilizaron las secuencias de los ITS, generándose información relacionada con géneros específicos tales como *Puccinia* (Kropp *et al.*, 1997; Roy *et al.*, 1998), *Cronartium* y *Peridermium* (Vogler y Bruns, 1998) y, *Uromyces* (Pfunder *et al.*, 2001).

Maier *et al.*, 2003, realizaron el estudio detallado para determinar las relaciones filogenéticas de 52 hongos-roya colectadas en el continente europeo y representativas de las familias Pucciniaceae, Phragmidiaceae, Sphaerophragmiaceae, Uropyxidaceae, Chaconiaceae, Coleosporaceae, Cronartiaceae, Pucciniastraceae y Melampsoraceae.

Dicho trabajo se fundamentó en el análisis de una región de alrededor de 550 nt de la subunidad grande del ADNr y que contenía los dominios D1 y D2. Inicialmente, los resultados confirmaron la validez taxonómica del orden *Uredinales* e indicaron que los

géneros *Puccinia*, *Uromyces*, *Endophyllum* y *Cumminsella* presentan un ancestro común, mientras que las royas autoicas con hospedantes en la familia Rosaceae (*Phragmidium*, *Kuehneola*, *Triphragmium* y *Trachyspora*) constituyen un grupo monofilético. La investigación además, pone en manifiesto que los géneros *Puccinia*, *Pucciniastrum*, *Thekopsora* y *Uromyces* son claramente polifiléticos. La condición polifilética de los géneros *Puccinia* y *Uromyces* fue recientemente confirmada por dos trabajos independientes basados en análisis de las secuencias nucleares que codifican para el factor de elongación 1 α y para β -tubulina 1 (Van der Merwe *et al.*, 2007) y de la subunidad grande del ADNr (Maier *et al.*, 2007), al concluirse que al menos dos linajes mayores se han derivado de estos grupos: uno de ellos presenta estados teliales en Poaceae, mientras que el otro lo hace en Ciperaceae.

Aime *et al.*, 2006, realizaron el estudio tendiente a evaluar las relaciones evolutivas entre los taxa superiores de Pucciniomycotina (=Urediniomycetes), utilizando la combinación de secuencias de la subunidad grande (región D1-D3) y pequeña (secuencia completa) del ADNr de 208 especímenes representando nueve de Utilaginomycotina, cuatro de Agaricomycotina y 189 de Pucciniomycotina. En este grupo se incluyeron especies de los *Pucciniomycetes* (*Helicobasidiales*, *Platyglloeales*, *Pucciniales*, *Septobasidiales*, *Pachnocybales*), *Cystobasidiomycetes* (*Erythrobasidiales*, *Cystobasidiales*, *Naohideales*), *Atractiellomycetes* (*Atractiellales*), *Agaricostilbomycetes* (*Agaricostilbales*, *Spiculogloeales*), *Microbotryomycetes* (*Sporidiobolales*, *Leucosporidiales*, *Microbotryales*, *Heterogastridiales*), *Classiculomycetes* (*Classiculales*), *Cryptomycocolacomycetes* (*Cryptomycocolacales*) y *Mixiomycetes* (*Mixiales*). Los resultados confirman la validez taxonómica de los taxones *Pucciniomycotina*, *Pucciniomycetes* y *Pucciniales*, que se presentan como grupos monofiléticos dentro de Basidiomycota.

El hongo vive principalmente en formas de micelio, uredias, urediniosporas, telios y teliosporas que se perpetúan en las hojas que infectan continua y sucesivamente (Agrios, 2010). Las basiodiosporas o uredosporas germinan en el haz de la hoja y entran mediante los estomas provocando lesiones polvorientas de color anaranjado sobre el envés cuyos centros eventualmente se secan mientras que los márgenes de las lesiones continúan su desarrollo necrótico, las hojas se caen prematuramente (Arneson, 2000).

Las basidiosporas teliosporas o uredósporas se producen en grandes cantidades y son el medio más adecuado para perpetuar la enfermedad (Rivillas y Carlos, 2015). Pueden sobrevivir poco tiempo bajo condiciones secas y cálidas, sin embargo, cuando en la superficie de las hojas permanece húmeda por varias horas, las basidiosporas de la roya pueden sobrevivir más tiempo o bien germinar y penetrar en las hojas, perpetuando las infecciones (Villarreyna, 2014).

Mediante estudios realizados sobre el tema, se sabe que la germinación se facilita en hojas jóvenes, en relación con hojas viejas o de vida media. Sin embargo, al inicio de las lluvias, la enfermedad se localiza en las hojas más internas y viejas de las bandolas que son la fuente de esporas para las nuevas infecciones (Agrios, 2010). Diversos estudios indican que el tiempo desde que una basidiospora germina y penetra invadiendo los tejidos internos de la hoja hasta que se forman las manchas con esporas puede tardar entre 20 y 40 días (Melo y Domian, 2015).

Considerando que el ciclo de vida de la roya sea de 30 días, es importante indicar que luego de transcurrido el 75 % de este tiempo, es decir aproximadamente 24 días, se inicia la formación de manchas de color amarillo pálido translúcidas, se hacen visibles únicamente a partir del día 27 del ciclo (Toniutti *et al.*, 2017).

4.2. Ciclo biológico de *Hemileia vastatrix*

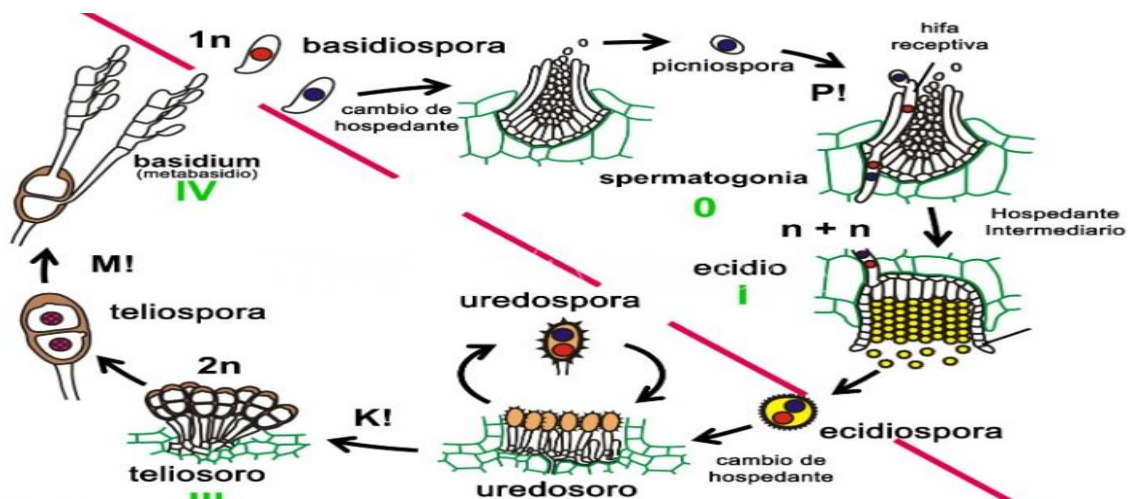


Figura 1. Ciclo de vida e inicio del proceso fitopatogénico de *Hemileia vastatrix*
Fuente: Eduardo Gallego y José Sánchez, Departamento de Biología Vegetal UAL.

El ciclo de vida de *Hemileia vastatrix* tiene cuatro etapas: diseminación, germinación, colonización y reproducción. La diseminación comienza con el reconocimiento de la superficie del hospedero, en la que las uredosporas, eciospora o basidiosporas germinan, apresorios sobre los estomas (Rivillas *et al.*, 2011). La germinación de uredosporas requiere de la presencia de agua libre por al menos 6 horas y también es favorecida con temperaturas entre 21-25 °C y condiciones de obscuridad, empieza con la penetración de los estomas mediante las aberturas situadas en el envés de las hojas maduras (Rayner, 1961). La formación del apresorio requiere de un periodo de 5 a 8 horas en promedio, una vez que ha penetrado al interior de la hoja se inicia la etapa de colonización, donde el hongo desarrolla unas estructuras denominadas micelio e hifas el cual modifica a haustorios, los cuales entran en contacto con las células de la planta y le permiten extraer los nutrientes para su crecimiento (Carvalho *et al.*, 2011).

Transcurrido 30 días después de la colonización, se inicia la etapa de reproducción donde el hongo está lo suficientemente maduro como para diferenciarse en estructuras llamadas uredinios, que son las encargadas de producir nuevas urediniosporas (Carvalho *et al.*, 2011). La germinación puede inhibirse por la luz y por evaporación del agua de la hoja, esto afecta el crecimiento de los tubos germinativos. La eficiencia contaminadora óptima es alcanzada cuando se tienen de 15 a 30 basidiosporas por cm² (Hiratsuka y Sato, 1982).

Cuando las uredosporas están demasiado dispersas, no se logra la infección (Herrera P. *et al.*, 2008; Haddad *et al.*, 2014). Aquellos rasgos junto con el hecho que *Hemileia vastatrix* es considerado uno de los más antiguos linajes de roya, hace de este un sistema biológico singular (Grasso *et al.*, 2006).

4.2.1. Epidemiología

Las basidiosporas (haploides) llegan al primer hospedante (alternativo) germinan ya sea de manera directa o indirecta, lo invade por medio de micelio monocariótico (Rivillas *et al.*, 2014). A partir de procesos se forma los picnidios en el haz de la hoja, que dan lugar a un gran número de espermacios envueltos en néctar. Si un espermacio llega a una hifa receptora compatible (la compatibilidad está determinada por un gen con 2 alelos distintos) le pasa sus núcleos y da lugar a un micelio dicariótico, más tarde dará lugar a los Ecios de color amarillo en el envés foliar el cual está rodeado por un peridio formando eciosporas en cadenas, son dicarióticas las cuales se dispersan por el viento y llegan al segundo hospedante (primario) al que invadirán. Al poco tiempo forman los uredos, con

un aspecto de pústulas subepidérmicas que se rompen para liberar las uredosporas (son dicarióticas) de color herrumbre, las uredosporas se dispersan por el viento y son ideales para extender la enfermedad.

Los uredos se producen continuamente durante la época favorable, cuando el ambiente se torna hostil las royas forman telios, a veces muy similares a los uredos, aunque más oscuros. En las teliosporas ocurre la cariogamia (se comportan como probasidios), en la primavera germinaran y darán lugar a un promicelio que se tabicara y producirá 4 basidiosporas que cierran el ciclo (Silva-Acuña *et al.*, 1994; SENASICA, 2013; Tirabanti *et al.*, 2013) (**Fig. 1**).

4.3. Cultivos de líneas puras de hongos o microorganismos

No hay ningún medio o condiciones de cultivo que permita el crecimiento de todos los microorganismos que se encuentran en la naturaleza. No obstante, hay medios que permiten el desarrollo de un gran número de microorganismos y otros en los cuales se desarrollan sólo algunos de ellos (Carvalho *et al.*, 2011).

Los requerimientos nutricionales varían entre microorganismos, dependiendo del tipo de metabolismo que presenten y de su capacidad biosintética. Algunos nutrientes se necesitan en grandes cantidades y otros en menor abundancia, incluso en cantidades muy pequeñas, se incluyen los principales elementos que constituyen las macromoléculas, es decir carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre entre otros (Carvalho *et al.*, 2011). Algunos microorganismos necesitan, compuestos orgánicos los cuáles son incapaces de sintetizar (factores de crecimiento). Estos compuestos se requieren en bajas cantidades e incluyen vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas. Además de los nutrientes, al momento de preparar un medio de cultivo debe tenerse en cuenta el pH que va a tener (Branes, 2016).

Los hongos desarrollan preferencialmente en pH ácidos (5 a 6,5) y los actinomicetes suelen crecer en medios más básicos (Avelino y Rivas, 2013). Es por ello, cuando se prepara un medio, se ajusta de acuerdo al organismo que se desea cultivar (Rivillas, 2011).

4.4. Curvas de severidad de microorganismos fitopatógenos

La representación de la enfermedad se hace a través de gráficas o curvas de intensidad de enfermedad vs., el tiempo (Mora, 2008). En la curva de crecimiento se diferencian cuatro

fases, de retraso (a veces llamada fase de latencia), de crecimiento exponencial o logarítmico, fase estacionaria y la fase de muerte celular (Madigan *et al.*, 2012).

De las cuatro fases de la curva de crecimiento, habitualmente la de crecimiento exponencial o logarítmico es la que presenta mayor interés por ser en la que el incremento del número de microorganismos es máximo. Durante el tiempo de generación (g) de los microorganismos (el tiempo que la población de microorganismo necesita para duplicar su número) se mantiene constante (Madigan *et al.*, 2012).

La curva de intensidad puede caracterizarse en un comportamiento espacial utilizando índices de agregación e intensidad de agregación, tamaño, localización, y forma de los agregados, velocidad de expansión de los focos de infección, índices de dispersión, entre otras. La representación de estos estudios es mediante mapas bio tridimensional (Mora, 2008).

Un análisis espacial se hace por medio de la disposición espacial de valores de intensidad de enfermedad por unidad de población. Las variables empleadas para dicho análisis incluyen severidad, incidencia, número de unidades enfermas o sanas (Mora, 2008).

4.5. Intentos por cultivar la roya del café

Ward (1881, 1882) llevó a cabo un número considerable de inoculaciones en plantas de café de diferentes orígenes y en hojas de diferentes edades. En todos los casos un número relativamente grande de esporas secas fueron colocadas sobre una gota de agua en el envés de la hoja, se colocaron en una pequeña cámara húmeda, utilizaron plantas pequeñas en macetas las cuales se mantuvieron en cajas especiales de (wardian), con una temperatura alrededor de 25 °C. Las infecciones podían detectarse primeramente como áreas amarillentas, pálidas, después de 10 a 16 días de la fecha de inoculación, pero más frecuentemente a los 14 días. Las primeras esporas se observaban entre 1 y 4 días más tarde. En hojas jóvenes los primeros síntomas de infección podían apreciarse por término de los 10 a 11 días, mientras que se requerían 15 días para las hojas más viejas. Sin embargo, las hojas jóvenes pertenecían a plantas de diferente origen, en las cuales se inoculaban las hojas viejas, razón por la cual las diferencias podían deberse también a otros factores además de la edad de la hoja. Ward indicó que la misma diferencia se observaban cuando pertenecían a la misma planta.

En observación de plantas inoculadas y también en hojas con infección natural en el campo, Ward encontró que la esporulación podía continuar de 7 a 16 semanas; probablemente duraba más tiempo, especialmente si la duración de la vida no se reducía al existir más de una lesión, también observó que la producción de esporas podía continuar después de la caída de la hoja. Mayne (1932) estudió en el laboratorio el periodo de incubación, manchas amarillentas podían notarse después de 7 a 12 días en café de la variedad Coorg (arabica) y después de 20 días en café Robusta, mientras que la formación de esporas comenzaba de 15 a 24 días y de 29 a 35 días respectivamente.

Nutman y Roberts (1963), publicaron un gráfico basado en observaciones de germinación a 1000 esporas por mancha en dos superficies, hojas y agar nutritivo. Los mismos autores afirmaron que la tasa de germinación aumenta linealmente con el tiempo, lo cual es demostrado por Clark en el apéndice del artículo. Además, la tasa de germinación no puede superar el 100%, por lo que la regresión debería terminar con una pendiente más o menos pronunciada hacia el valor asintótico. Sin duda mostraron el tipo de curva en su publicación, pero no comentaron sobre su forma. Parte de la curva, el resultado del autor (Rayner) sugiere una relación casi lineal, pero hay evidencia de un pequeño segmento temprano de la curva.

4.6. Variedades de *Hemileia vastatrix*, diversidad genética.

A nivel mundial, hay alrededor de 50 variedades fisiológicas (etiquetadas por números romanos) para *Hemileia vastatrix* (Capucho *et al.*, 2012); siete variedades I, II, III, XVII, XXIV, XI y XX fueron registradas para Tanzania; encuestas de la enfermedad de la roya realizadas en Brasil por el CIFC (2007) en los años 2006-2007 registraron nuevos especímenes que coincidieron con las variedades XXII y XXXIV). Dos años más tarde, se registraron cinco nuevas variedades del patógeno roya del café en Tanzania (Tacri, 2009).

De las variedades fisiológicas la variedad II ha sido la encontrada con mayor frecuencia y la más extendida, le sigue la variedad I; las otras variedades son de distribución más variada predominando algunas en determinadas localidades (El Salvador, Honduras, Guatemala, Chiapas, México, Costa Rica, Brasil) (Shigueoka *et al.*, 2014). Los estudios realizados por Gouveia *et al.*, (2005) demostraron la diversidad genética de las nuevas variedades de roya de Colombia, utilizando marcadores moleculares RAPDs, pero no

podieron asociar los patrones de bandas obtenidos con el origen geográfico de las variedades, con su espectro de virulencia o con las variedades fisiológicas individuales.

Estudios de Ocampo-Muñoz *et al.*, (2007) mencionan la importancia de desarrollar nuevos marcadores moleculares para *Hemileia vastatrix*, los cuales permiten estudiar la población del patógeno y su evolución en los materiales de café. Aunque varios tipos de marcadores moleculares se han utilizado para la diferenciación de aislamientos de una gran diversidad de hongos, incluidas las royas, y dentro de las secuencias más utilizadas se encuentra el ADN ribosomal nuclear (Anikster *et al.*, 2004; Chatasiri *et al.*, 2006).

4.7. Variedades de café como hospederos principales de *Hemileia vastatrix*

En general todas las especies cultivadas de café son atacadas en mayor o menor grado por *Hemileia vastatrix*, aunque algunas variedades son más susceptibles al hongo, los principales factores que determinan la intensidad del ataque son la temperatura, frecuencia e intensidad de las lluvias, duración de la película de agua sobre la lámina foliar, cantidad de inóculo y área foliar susceptible de infección (Subero, 2005).

Entre los hospederos principales se encuentra *Coffea arabica* que es el resultado de una hibridación interespecífica entre dos formas ancestrales diploides relacionadas con las especies actuales *Coffea eugenioides* y *Coffea canephora*. Como resultado de la estabilización de dicho híbrido ancestral, se originó el alotetraploide actual *Coffea arabica*, cuyo genoma está constituido por dos subgenomas denominados Ca y Ea. *Coffea arabica* L. presenta una baja diversidad genética atribuida a su origen alotetraploide reciente, su naturaleza autogámica y particularmente a la forma de dispersión a partir de su centro de origen (Lashermes, *et al.*, 1996).

Dentro de *Coffea arabica* consta una gran cantidad de variedades como la Típica, Borbón y Caturra, en Brasil las variedades Catuai y mundo Novo, Blue Mountain en Jamaica entre otras variedades, la variedad típica es la más susceptible al ataque de la roya, *Coffea canephora* que produce el café robusta, y el *Coffea liberica* carentes de resistencia genética a la roya. Las variedades resistentes a la roya, varían en su calidad de resistencia de acuerdo a la raza fisiológica del hongo, siendo el híbrido de Timor el único material resistente a todas las razas. Este material es aparentemente un cruce natural entre *C. arabica* y *C. canephora*. El 95% de las plantas son del grupo A, es decir, resistentes a todas las razas, mientras que 5% son del grupo R, resistentes a sólo dos razas, y al grupo E, resistentes a 7 razas. Este híbrido de Timor presenta una gran variabilidad fenotípica,

lo que da una gran oportunidad de selección para ciertas condiciones específicas (Vieira *et al.*, 2011).

4.8. Resistencia de las hojas de café al ser cortado el tejido celular de manera manual o natural.

La resistencia de la nervadura de la hoja al ser cortada ya sea por un medio manual o natural se debe a que en la clorofila se almacenan antioxidantes con una amplia gama de beneficios, con efectos antígenotóxicos, anticancerígenos y antioxidantes (Nagini *et al.*, 2015), y junto con los nutrimentos algunos esenciales para la nutrición de la planta como: potasio, zinc, calcio (Campa *et al.*, 2017).

5. Materiales y métodos

5.1. Material Vegetal

El material vegetal se extrajo desde un cultivo establecido de café variedad típica nativa de la Finca El Naranjo, que se encuentra ubicada en el cantón Quilanga, a una altitud de 1923 m.s.n.m, con (4°17'53'' S, 79°23'55''O), y una temperatura de 19 °C. Se seleccionaron 8 hojas con distintos niveles de severidad, en base a la escala de severidad de Sinavef-Lanref (2015) (**Tab. 1, Tab. 2**).

Al escoger 8 hojas de café variedad típica con distintos niveles de severidad, se realizó la colecta de esporas con ayuda de un bisturí esterilizado, las cuales son colocadas en platos de pesado hasta la obtención de 1,5 mg para luego depositarlas en 2 mL de agua destilada. Para la esterilización de las hojas, primero se colocaron en una solución de Hipoclorito de sodio al 0,5 %, posteriormente en alcohol al 70 % y finalmente en agua destilada, durante un minuto en cada sustancia respectivamente (Nutman y Roberts, 1963).

Luego, de secar las hojas se realizaron cortes en el envés con ayuda de un molde metálico de 2,5 cm de diámetro, se cortan los discos, y con ayuda de una pinza se distribuyen dos discos dispuestos sobre el envés de cada caja de Petri con papel filtro humedecido con una cantidad de 17 ml de agua destilada, cuya función es mantener vivo el disco de hoja de café.

Para adaptar los discos de hojas de café con el inoculo *Hemileia vastatrix*, se utilizaron 2 plantas de café variedad típica nativa, la más susceptibles para utilizar sus hojas, una vez extraídas se utilizarán para cortarlas en discos, de dimensiones de 2,5 cm de diámetro, y adaptarlas e inocularlas con la cepa pura de la roya. Debido a esto, se controlará la humedad relativa y temperatura acorde a las características ambientales del patógeno, con la ayuda y construcción de 2 incubadoras establecidas en el laboratorio de análisis químico (CISAQ-UNL).

5.1.1 Fase de laboratorio

La fase de laboratorio se desarrolló en el centro de Investigación, Análisis y Servicios Químicos de la Universidad Nacional de Loja (CISAQ- UNL), ubicado a una altitud de 2,060 msnm, con (3°59'35.3'' S, 79°12.253' O). Construcción de dos incubadoras para adaptación y reproducción del fitopatógeno *Hemileia vastatrix* con las siguientes medidas: 1,20 cm, de largo x 50 cm, de alto y 35 cm, de ancho, tres lámparas led color luz de día por incubadora, ubicadas a 19 cm del suelo, 6 m de plástico color transparente

un Timer electrónico, medios bióticos y abióticos que lograran asegurar la asepsia y realizar los ciclos continuos de inoculaciones e infecciones, que consiste en obtener urediniosporas o basidiosporas de *Hemileia vastatrix*, haciendo frecuentemente inoculaciones *in vivo* en las muestras contenidas en las incubadoras que aseguran el proceso de infección policíclica (**Fig. 2**).

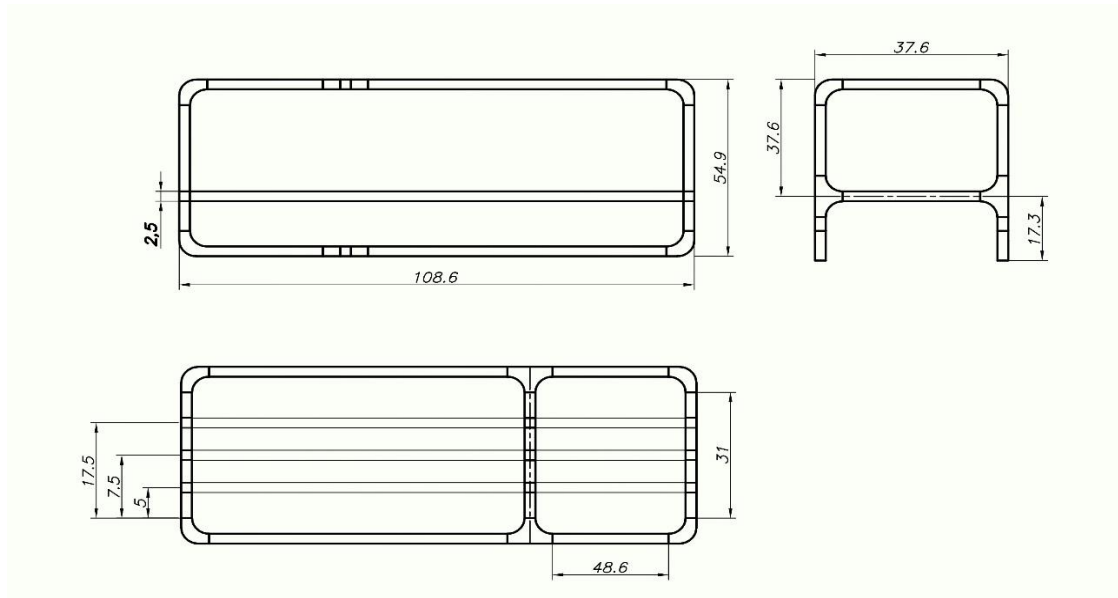


Figura 2. Planos para medios de incubación, adaptación y reproducción del fitopatógeno obligado *Hemileia vastatrix*.

5.2. Metodología para el Primer Objetivo

“Definir curvas de crecimiento y tiempo de vida útil de *Hemileia vastatrix*, usando discos de tejido foliar”

5.2.1. Tiempo de vida útil de *Hemileia vastatrix*, usando discos de tejido foliar

Las cajas de Petri con los discos a establecerse se colocaron en dos incubadoras a una temperatura de 19 °C, durante seis horas de oscuridad y luego a luz continua. Los tubos germinativos crecen en alrededor de un periodo de 6 a 12 horas debido a el hongo requiere de una capa de agua, condiciones de poca o ninguna luminosidad y temperaturas entre 20 y 23 °C, con humedad relativa (mayor al 58%), accionan a que el tubo germinativo crezca hasta encontrar los estomas.

5.2.2 Tiempo de vida útil de los discos de café variedad típica, para la inoculación

Una vez obtenidos los discos de café de una dimensión de 2,5 cm de diámetro, se colocaron en cajas de Petri, que en su interior contienen papel filtro y dos discos de café

que reposan sumergidos en una cantidad de 17 ml de agua destilada, previo a eso se calibraron las 2 incubadoras, para adaptar los discos de hojas de café con la temperatura y humedad relativa, con una temperatura estable de 22.8 °C y una humedad relativa de 65.9 %, el micro ambiente que se creó dio lugar al establecimiento y mantenimiento de las hojas ya que las mismas servirán como fuente de estabilidad para el inculo.

Las condiciones de temperatura y humedad relativa se obtuvieron en base a la información de los autores (Nutman y Roberts), los autores mencionan que la germinación no tuvo lugar a temperaturas de 15 °C y 17 °C, sin embargo a temperaturas de 21 °C y 22 °C dan inicio a la germinación en manchas pálidas translucidas. Ward (1992) determinó que la presencia de agua líquida es esencial para la germinación, las humedades relativas altas del aire son inadecuadas para estimular la germinación.

5.2.3 Línea de crecimiento o progreso de la Severidad

Para determinar las fases de crecimiento de la roya se utilizó la escala de Sinavef-Lanref (2015) (**Tab. 1**) (**Tab. 2**).

Tabla 1. Niveles de severidad en el área foliar

| Niveles de severidad | Daño del área foliar con roya del café |
|----------------------|--|
| Baja | Mancha pálida translucida. (Fase lenta) |
| Media | Poca cantidad de esporas anaranjadas. (Fase rápida) |
| Alta | Gran cantidad de esporas aptas para su dispersión. (Fase terminal) |

Tabla 2. Porcentaje de severidad en los discos de café

| Niveles de severidad | Daño del área foliar con roya del café |
|----------------------|--|
| Baja | 1- 5% |
| Media | 6-29% |
| Alta | > 30% |

La severidad del daño foliar se mide a través del área foliar afectada, se divide visualmente en dos partes en cada disco de hoja, luego en cuatro partes para ubicar el área foliar afectada, seguidamente se suman los valores de las hojas y se divide entre el número de hojas de discos evaluadas (Sinavef, 2015).

$$\% \text{ severidad} = \% \text{ ADH} / \text{THE}$$

% ADH = sumatoria del % del área dañada por disco de hoja

THE = total de disco de hojas evaluadas

5.3. Metodología Segundo Objetivo

“Definir las condiciones de humedad, luz y temperatura para el cultivo de líneas puras de *Hemileia vastatrix* en condiciones *in vitro*”

5.3.1. Protocolo

Para la supervivencia de los discos de café que se encuentran distribuidos en treinta y seis cajas de Petri, se determinó e identificó las estructuras de esporas y esporas mediante claves taxonómicas de las distintas taxas:

Las muestras que se obtengan para el diagnóstico de *Hemileia vastatrix*, debe presentar lesiones de color amarillo o naranja en el envés de las hojas (uredosporas) y manchas de color café, sin que el daño se presente en más del 50% de la superficie foliar. La observación directa inicia con el raspado de pústulas, el cual permite observar lesiones de color amarillo pálido a naranja pálido en el envés de la lámina foliar utilizando un microscopio estereoscópico.

Localizar las uredosporas y con ayuda de una aguja de disección o un alfiler entomológico, raspar sobre la lesión a fin de desprender las esporas del tejido vegetal. Realizar preparaciones temporales o permanentes para su observación con un microscopio compuesto. Observar las características morfológicas de las uredosporas y obtener las medidas de largo y ancho de al menos 10 esporas. Comparar las características morfométricas obtenidas con las reportadas en la literatura de referencia para obtener el diagnóstico. En caso de corroborar las características morfométricas que definen a *Hemileia vastatrix*, realizar montajes permanentes de las estructuras (Duran, 1985).

Las uredosporas nacen de forma individual sobre pedicelos equinulados, son periformes, triangulares, rectas o ligeramente curvas, en forma de pirámide truncada y en ocasiones reniformes, de 25-30 μm de largo por 12-28 μm de ancho. Las paredes laterales de las uredosporas que están en contacto con otras uredosporas son lisas y planas, mientras que las paredes libres son convexas y equinuladas, con verrugas cónicas o truncas, de 3 μm a 4 μm de largo (Duran, 1985).

Se identificaron las esporas y sus estructuras mediante claves taxonómicas de las distintas taxas. Con la ayuda de un microscopio se observaron las esporas para identificarlas a distintos tipos de lentes (4x, 10x, 40x), se identificaron los Ecios o Uredosporas en el envés o haz foliar, realizando un raspado del tejido vegetal sano y contaminado, para observar estomas sanos abiertos y estomas cerrados de la misma

manera estomas abiertos con presencia de hifas.

5.4. Metodología Tercer Objetivo

“Obtener líneas puras de *Hemileia vastatrix* para trabajos *in vitro* con la roya”

5.4.1 Obtención de líneas puras

Se sembraron 2 plantas de café arábico de la variedad típica, la cual es la más susceptible a *Hemileia vastatrix*. En condiciones de asepsia se extrajeron hojas sanas para la elaboración de 72 discos de café distribuidos en 36 cajas de Petri que contiene papel filtro con 17 mL de agua destilada. Luego, de la suspensión se adquirió un mL para realizar el conteo de esporas en la cámara de Neubauer. El conteo de esporas en la cámara de Neubauer se realizó a través de la siguiente fórmula, concentración = número de esporas x 10,000 x 10^{-3} / número de cuadros (Gilchrist *et al.*, 2005).

Para la inoculación de las esporas se utilizó 10 microtubos de 2 mL, que sirvieron como contenedor de esporas, la inoculación de los discos de café se llevó a cabo con una micro pipeta calibrado a la cantidad de 45 μ L.

Luego de haber transcurrido 12 horas se procedió a observar las esporas haciendo uso de un microscopio óptico a (4x) (10x) (40x), la observación de las esporas de *Hemileia vastatrix* después de 12 horas es crucial para su identificación y diagnóstico, una vez que la espóra se deposita en el envés de la hoja emite 4 tubos germinativos en un periodo de 6 a 12 horas, estos tubos crecen hasta encontrar los estomas de la hoja.

La observación directa de las uredosporas es necesaria para reportar una identificación positiva de *Hemileia vastatrix*, para el conteo de uredósporas totales y germinadas; una uredóspora se considera germinada cuando el tubo germinado presenta una longitud alcanzando el doble del diámetro de la uredóspora. Se realizó un conteo de esporas de cada microtúbulo para determinar la concentración de esporas. De la suspensión se tomó un ml del cual se realizó el conteo de esporas en la cámara de Neubauer, a partir de este dato se llevó la suspensión a una concentración de 1×10^{-6} esporas. Una vez inoculadas las esporas y perpetuadas en los discos de hojas de café, se procedió a realizar la extracción de las nuevas líneas puras de roya, para inocular en nuevos discos, con las nuevas líneas puras de *Hemileia vastatrix*.

6. Resultados

6.1. Curvas de crecimiento y tiempo de vida útil de *Hemileia vastatrix*, usando discos de tejido foliar

6.1.1. Conteo de esporas

Se obtuvieron raspados de esporas de roya de *Hemileia vastatrix* de 1,5 mg de masa, depositados en 10 microtubos de 2 mL de agua destilada, con la finalidad de capturar las esporas en las fases de eciosporas, uredosporas, teliosporas y basidiosporas (**Fig. 3**), al determinar la concentración entre la masa de esporas y la cantidad de agua, se seleccionaron los microtubos 7, 8 y 10 los cuales presentaron concentraciones de 2900 U/mL, 4000 U/ml y 2800 U/mL respectivamente (**Tab. 3**), el conteo de esporas en la cámara de Neubauer se realizó a través de la siguiente formula, concentración = número de esporas x 10,000 x 10⁻³ / número de cuadros, al sustituir los valores en la formula se obtuvo: 500 x 10000 x 0,001 / 5 = 1000.

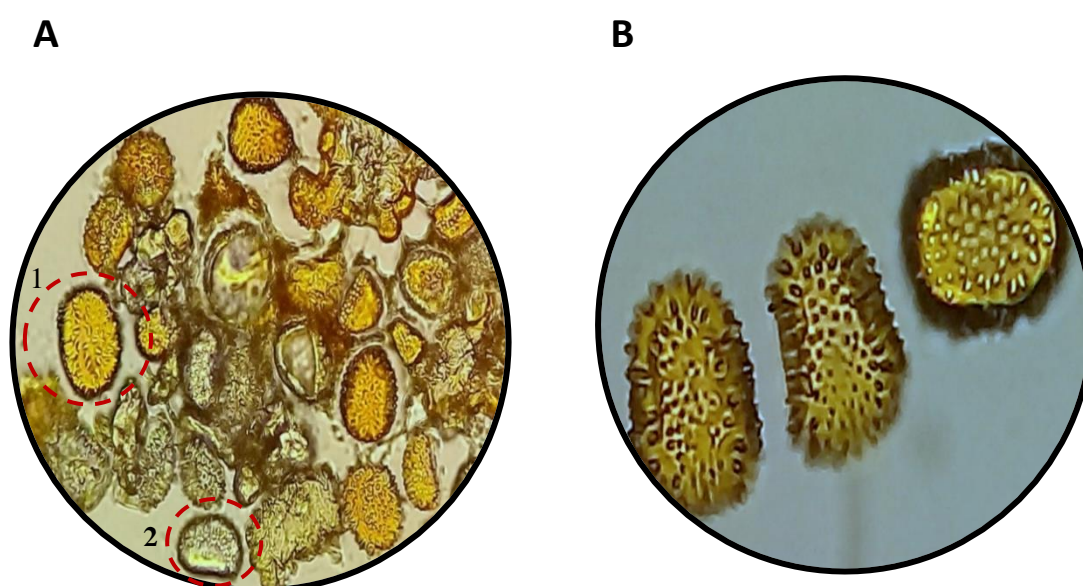


Figura 3. Esporas en suspensión de agua destilada, (A, esporas en las fases de (1) eciosporas y (2) uredosporas) (B, eciosporas asexuales, lente de visualización 40 X).

Tabla 3. Esporas de *Hemileia vastatrix* colectadas y depositadas en 10 microtubos con 2 mL de agua destilada. La concentración se muestra en Unidades / mili Litros (U/mL)

| Microtubos | U/mL |
|------------|------|
|------------|------|

| | |
|----|------|
| 1 | 2000 |
| 2 | 2400 |
| 3 | 2700 |
| 4 | 2300 |
| 5 | 2200 |
| 6 | 2600 |
| 7 | 2900 |
| 8 | 4000 |
| 9 | 2500 |
| 10 | 2800 |

Se seleccionaron los 3 microtubos debido al criterio de mayor concentración de micelio e hifas para iniciar con el proceso de inoculación en los discos de hojas de café variedad típica (**Fig. 4**).

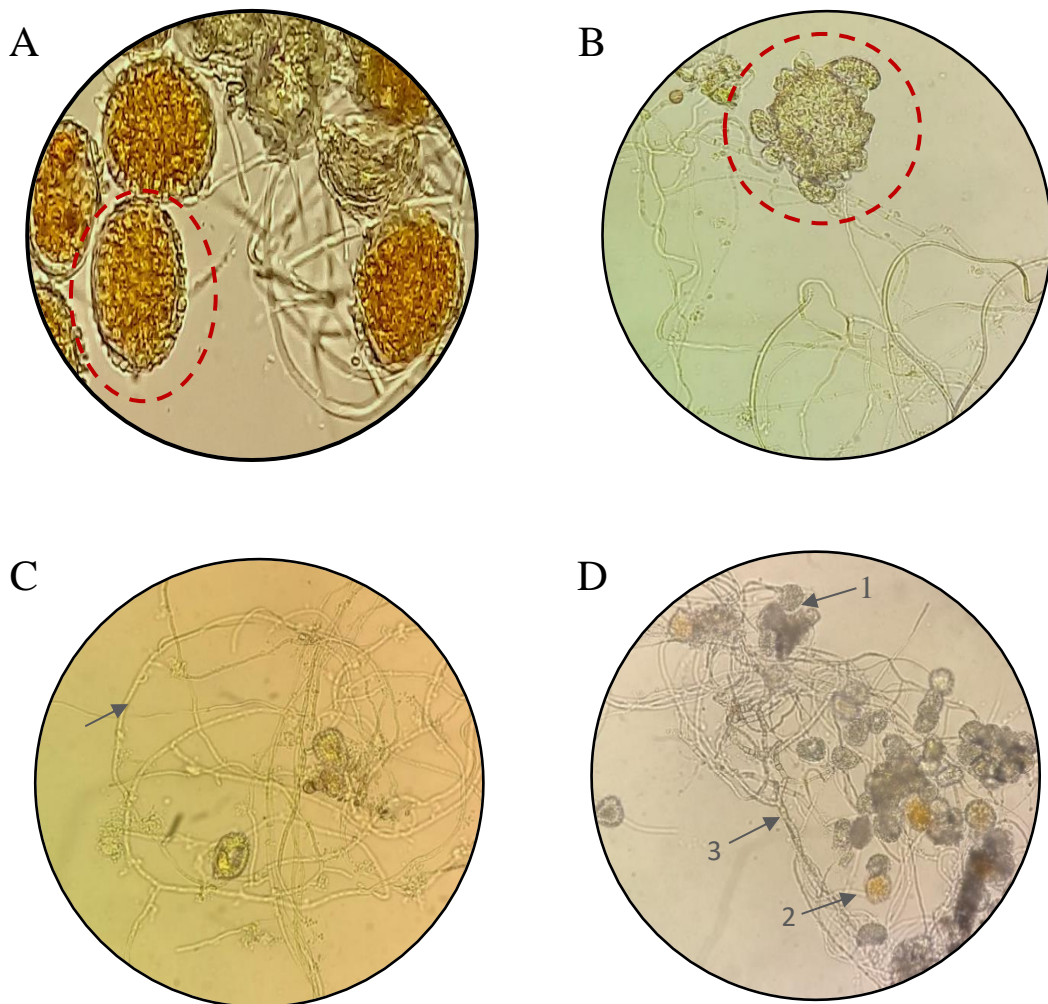


Figura 4. Microtubos con concentraciones de esporas **A**), micelio **B**), e hifas **C**), micelio, esporas e hifas **D**) (1) micelio (2) hifas (3) esporas, lente de visualización 40 X.

Mediante el protocolo de Aime (2006), se pudo establecer los discos de hojas de café variedad típica, para obtener como resultado la adaptación de los discos de hojas de café con el fitopatógeno *Hemileia vastatrix*, se construyeron dos incubadoras ya que esto no se menciona en el protocolo citado, las incubadoras sirvieron para garantizar la asepsia y las condiciones abióticas adecuadas como humedad relativa 65,9 % y temperatura 22,8 °C (Fig. 6), se utilizaron cajas de Petri con papel filtro empapadas con una cantidad de 17 mL de agua destilada. (Fig. 5).

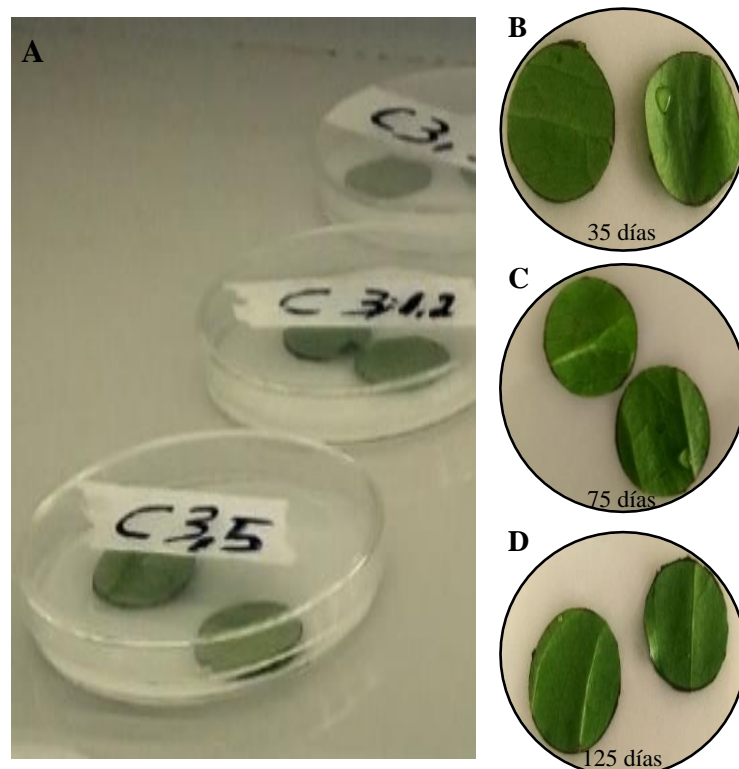


Figura 5. Adaptación y viabilidad de discos de tejido foliar de *Coffea arabica* var. Típica de 2,5 cm de diámetro A) condiciones de humedad garantizadas al mantener papel filtro sumergido en 17 mL de agua destilada B)-D) viabilidad de discos de tejido foliar.



Figura 6. Construcción de 2 incubadoras, para adaptación de los discos de tejido foliar de café variedad típica de 2,5 cm de diámetro, reproducción del fitopatógeno en los discos de hoja de café, colocados sobre papel filtro a una cantidad de agua destilada de 17ml, contenidos en cajas de Petri para asegurar la asepsia.

La adaptabilidad de los discos de café se los pudo obtener con la ayuda de una temperatura inicial de 18,9 °C, las temperaturas son el producto de calibrar 3 lámparas led de la intensidad de luz de día y plástico mica color transparente de 1 mm, la cual otorgó la temperatura adecuada de 22,8 °C (**Fig. 7**), al alejar las lámparas led más de lo establecido de las cajas de Petri se puede observar un periodo de latencia debido a que la temperatura disminuye, mientras que al acercar las lámparas led a las cajas de Petri los discos de hojas de café se comienzan a secar debido a que la temperatura incrementa y deshidrata los discos de hojas de café (**Fig. 8**).

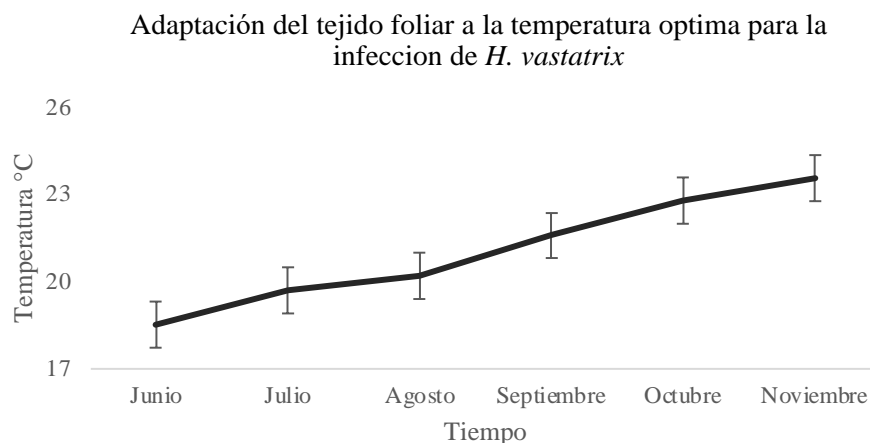


Figura 7. La temperatura fue aumentada gradualmente durante 5 meses aproximadamente dentro de la incubadora, temperatura optima de la adaptación de los discos 22,8 °C. Los resultados en la gráfica son representados como la media de temperatura en grados Centígrados durante el mes (n=4). Las barras de error representan \pm error estándar.

Al determinar las temperaturas optimas, se puede obtener las condiciones de humedad relativa y lámina de agua, lo que permite un balance o equilibrio de la viabilidad de los discos de café a lo largo del tiempo, en la (Fig. 6) (Fig. 5), se puede apreciar la adaptación de los discos de café, con una temperatura de 22,8 °C, humedad relativa de 65.9 % y una lámina de agua de 17 mL que es crucial para la adaptación y reproducción del fitopatógeno roya, Se comprobó que los discos de café pueden mantenerse viables y funcionales durante 180 días (Fig. 7), tiempo suficiente para que de inicio a la severidad causada por *Hemileia vastatrix* que tarda alrededor de 60 días (Fig. 8).

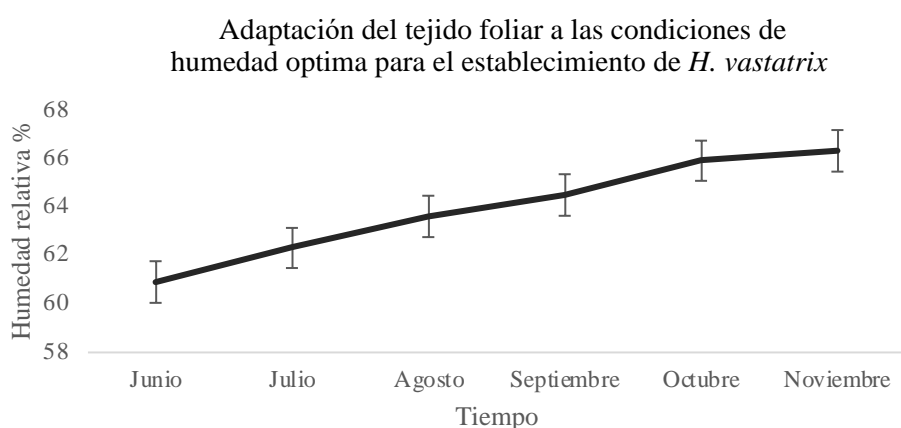


Figura 8. La humedad fue aumentada gradualmente durante 5 meses aproximadamente dentro de la incubadora, humedad relativa optima de adaptación de los discos de tejido foliar de *Coffea arabica* var. Típica = 65,9 %. Los resultados en la gráfica son representados como la media de la humedad relativa durante el mes (n=4). Las barras de error representan \pm error estándar.

Con base en el criterio del mayor porcentaje de esporas, micelio e hifas, se seleccionaron 3 microtubos, 7, 8 y 10 (Tab. 3), los cuales presentaron concentraciones de 2900 U/mL, 4000 U/mL y 2800 U/mL respectivamente. Siguiendo este criterio, se llevó a cabo la inoculación en el mes de noviembre del 2022, la fase inicial estuvo determinada por un periodo lento, mientras que la fase intermedia se caracterizó por una marcada aceleración de la infección (Fig. 9), debido a las condiciones que se otorgaron como temperatura y humedad relativa (Fig. 7, Fig. 8), se pudo alcanzar grados de severidad superiores al 28% durante la fase final de la infección. La progresión de la infección después del establecimiento de *H. vastatrix* en los discos de tejido foliar fue analizada según el porcentaje de severidad calculado con la Ecuación 1, y contrastado con la escala de severidad de Sinavef (2015).

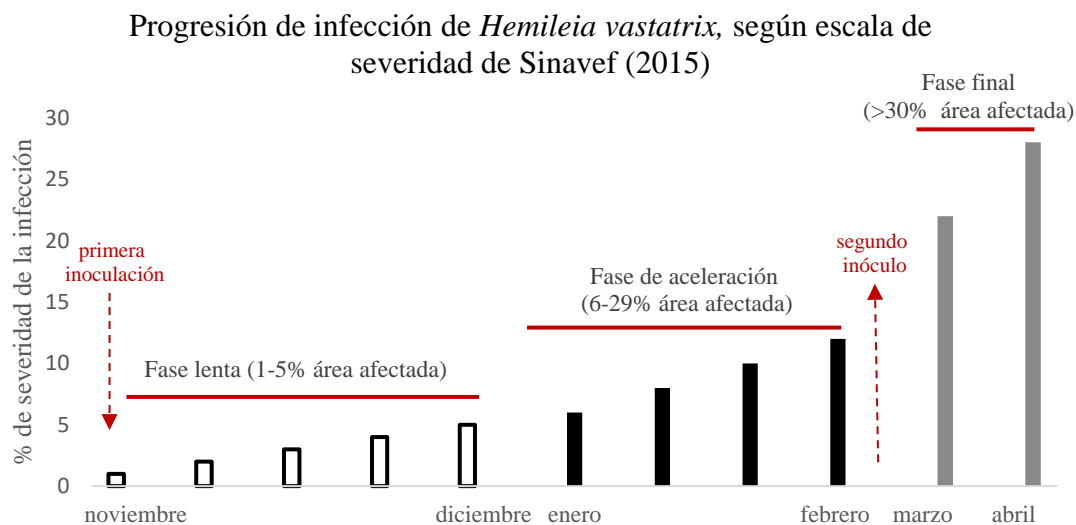


Figura 9. Inoculación de *Hemileia vastatrix* en 72 discos de hojas de café variedad típica a partir del mes de noviembre e inicio de la infección con una fase lenta, del mes de diciembre hasta marzo se puede notar una fase de aceleración del 6 al 29 % en la fase final de infección.

Al constatar de forma visual la producción de una gran cantidad de esporas se procedió a obtener el inóculo para la segunda infección del cultivo cíclico. Este inóculo fue obtenido entre los meses de febrero y marzo, en dónde el porcentaje de severidad obtenido (Eq. 1) representa un total de 15.52% (Fig. 9), esto a partir de, la sumatoria del porcentaje del área dañada en los discos de tejido foliar con un valor de 1117.5, entre 72 discos evaluados. Según la escala de Sinavef (2015), la prueba sitúa a la infección en la fase de aceleración.

El inóculo fue obtenido, visualmente se identificó que las esporas no presentaron coloraciones u otras características que puedan sugerir estar contaminadas con otros organismos. Después de seleccionar las colonias se realizó el raspado del tejido vegetal con el fin de aislar las nuevas líneas puras de roya. Después de ser analizados en el microscopio la masa de esporas de este nuevo inóculo no mostró evidencias de contaminación con otros organismos y las esporas individualmente mostraron características morfológicas similares a las esporas del primer inóculo (Fig. 11), lo cual se utilizó como indicador de viabilidad. Las esporas colectadas reflejaron estructuras morfológicas distintivas de basidiosporas de *H. vastatrix* (Fig. 11). La concentración

obtenida de las esporas suspendidas en agua destilada de este nuevo inóculo fue de 1500U/mL.

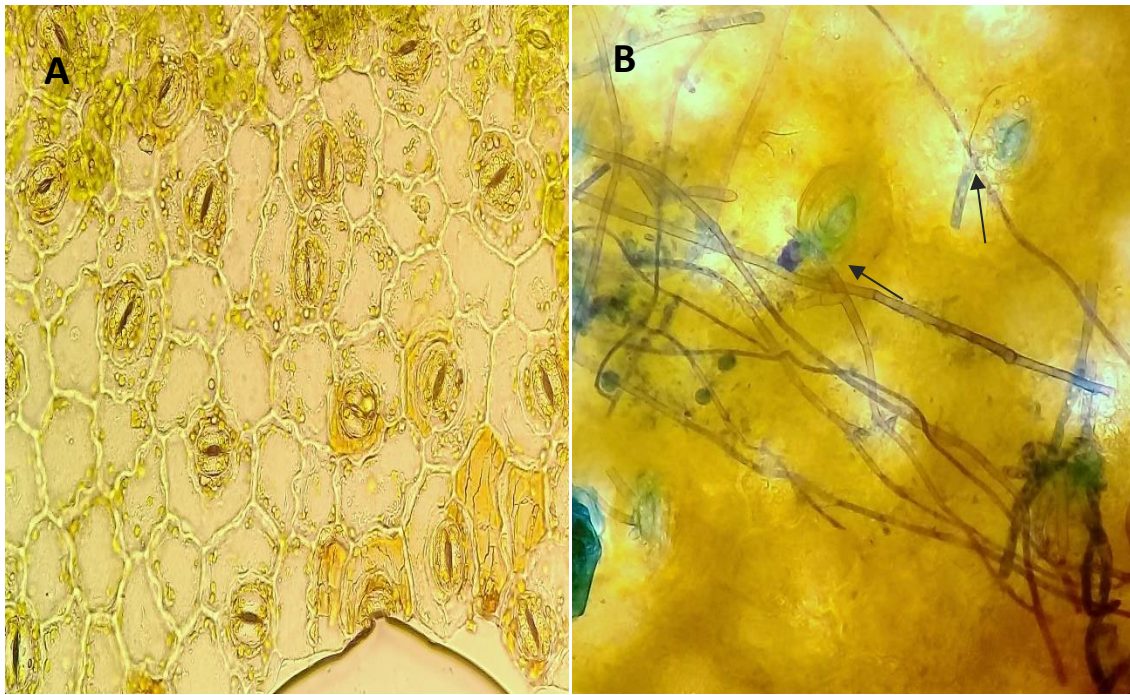


Figura 10. (A) Raspado de discos de tejido foliar de *Coffea arabica* var. Típica con estomas sanos. **Figura, (B)** Colonización de *H. vastatrix* en discos de tejido foliar de *Coffea arabica* var. Típica, los indicadores muestran estomas invadidos por hifas de *H. vastatrix*. Lente de visualización 40X.

El inóculo fue colocado sobre los discos de tejido foliar siguiendo las especificaciones detalladas en la metodología (sección 5.2.1), permitiendo que germinaran en microtubos de 2 mL, en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente, por 72 horas. De la misma forma, emulando la primera inoculación se usó 45 μ L de inóculo en 72 discos que pasaron previamente por el mismo proceso de aclimatación (**Fig. 7** y **Fig. 8**). Los discos de tejido foliar fueron analizados para determinar la presencia de estructuras que pudieran sugerir contaminación, encontrando estomas limpios, libres de estructuras vegetativas de hongos parasitarios (**Fig. 10A**). Todos los discos de esta segunda infección del cultivo cíclico de *H. vastatrix* presentaron muestras del establecimiento efectivo del hongo sobre el tejido foliar, este establecimiento estuvo marcado por la presencia de hifas invadiendo los estomas del tejido foliar (**Fig. 10 B**).



Figura 11. Aislamiento e identificación de esporas, estructura en forma de basidiosporas con presencia de hifas desarrolladas, tamaño de 30 µm de largo x 20 µm ancho, lente de visualización 40X.

El proceso de infección comenzó en el mes de noviembre, 25 días después de la inoculación (ddi), hasta el mes de diciembre se evidenció un crecimiento lento de la nueva colonia, las colonias formadas a partir del segundo inóculo se posicionaron entre el 1 y el 5 % de severidad según la escala del índice de severidad de Sinavef (2015), usada en este estudio para calcular el grado de severidad de la infección por *H. vastatrix* en discos de tejido foliar de *Coffea arabica* var. Típica, en condiciones *in vitro* (**Fig. 12**).

A partir del mes de diciembre hasta el mes de febrero, 55 ddi, se evidenció que en promedio todas las colinas entraron en la fase de aceleración, según la escala del índice de severidad de Sinavef (2015), hasta el mes de abril que las colonias de este segundo cultivo, entraron en la fase final de infección, según la misma escala. Obteniendo de esta manera un cultivo cíclico de *Hemileia vastatrix*, sin evidencia de la colonización de organismos oportunistas o parasitarios y en condiciones controladas de laboratorio (**Fig. 12**).

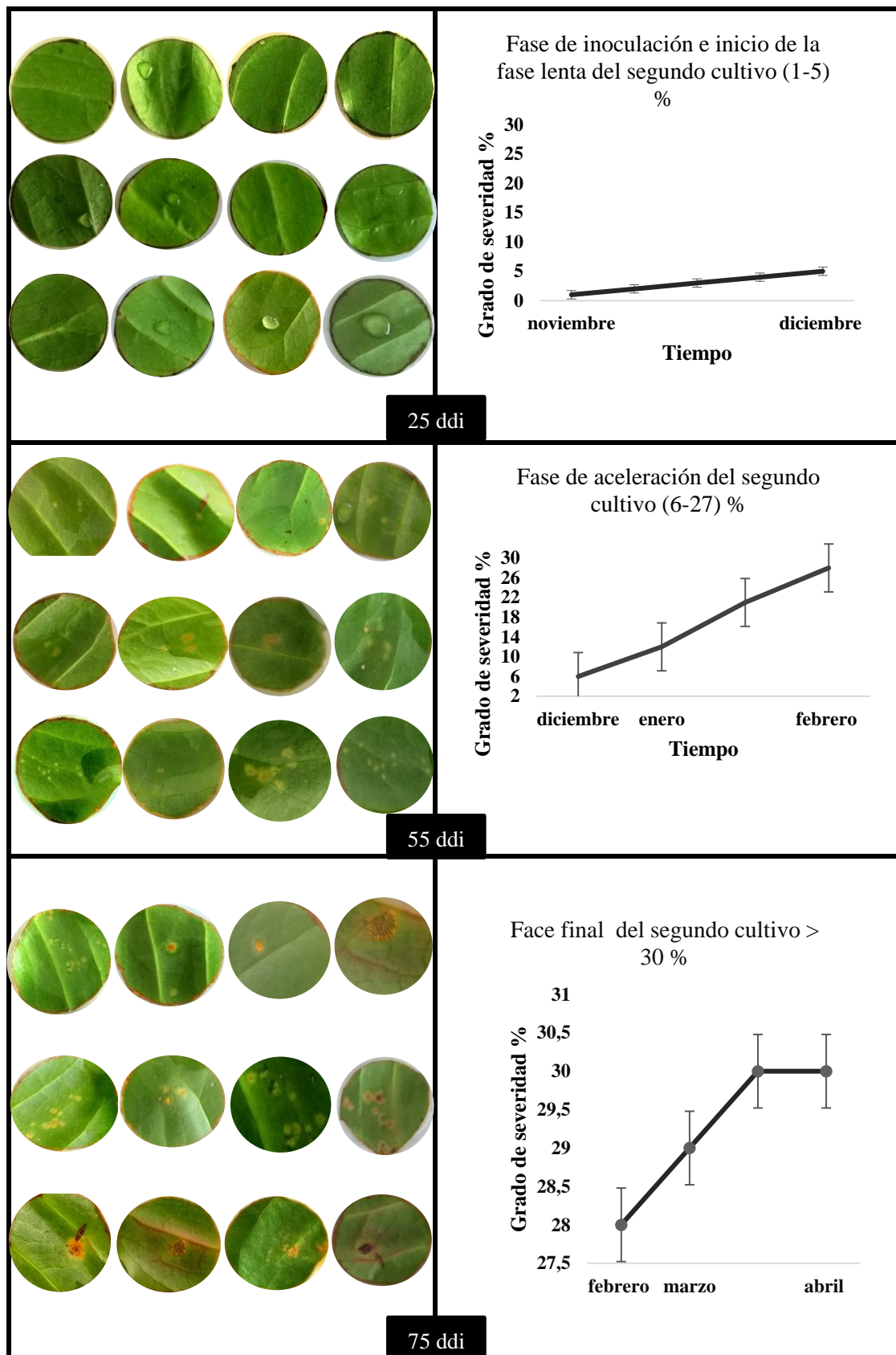


Figura 12. Porcentaje de severidad de *Hemileia vastatrix*, el proceso de infección comenzó en el mes de noviembre, 25 días después de la inoculación (ddi), del mes de diciembre hasta el mes de febrero, 55 ddi, se evidencio en promedio todas las colinas entraron en la fase de aceleración, en el mes de marzo y abril, 75 ddi, se concluyo con la fase final de la severidad.

7. Discusión

7.1. Curvas de crecimiento y tiempo de vida útil de *Hemileia vastatrix*, usando discos de tejido foliar.

En el presente estudio, se realizó el cultivo de línea pura de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br, causante de la roya del café mediante implementación de ciclos continuos de inoculaciones *in vitro*. Los resultados del estudio manifiestan la obtención de esporas de roya a partir de raspados de tejido foliar de *Coffea arabica* var. Típica, con una masa total de esporas de 1,5 mg. Las esporas fueron depositadas en 10 microtubos, cada uno con 2 mL de agua destilada, con el objetivo de capturar las esporas en diferentes fases de desarrollo: como eciosporas, uredosporas, teliosporas y basidiosporas (Fig. 3)

Al evaluar las concentraciones de esporas, se midió la relación entre la masa de esporas y la cantidad de agua en los microtubos, los microtubos 7, 8 y 10 presentaron concentraciones de 2900 U/mL, 4000 U/mL, 2800 U/mL (Tab .3), se eligieron los microtubos 7, 8 y 10 debido a su mayor concentración de micelio e hifas, los microtubos se utilizaron para iniciar el proceso de inoculación en los discos de hojas de café variedad típica.

En el estudio, se investigó la adaptación de los discos de hojas de café (*Coffea arabica*, variedad típica) con el fitopatógeno *Hemileia vastatrix* causante de la roya del café. A través de un protocolo basado en Aime (2006), se logró establecer los discos de hojas de café y se implementaron condiciones específicas para garantizar su adaptabilidad y viabilidad. Aunque el protocolo de Aime (2006), no menciona explícitamente la construcción de incubadoras, se diseñaron dos incubadoras personalizadas, dichas incubadoras se utilizaron para mantener las condiciones abióticas adecuadas como: humedad relativa del 65,9 % y una temperatura de 22,8 °C (Fig. 6), se utilizaron cajas de Petri con papel filtro empapadas con 17 mL de agua destilada (Fig. 5), lo que proporciona un ambiente propicio para el crecimiento de los discos de hojas de café.

La inoculación de esporas de *Hemileia vastatrix* sobre discos de hojas sanas de café, es una metodología utilizada por distintos autores en otros trabajos científicos, ya que permite cuantificar de manera precisa el grado de severidad basándose en una escala adaptada, es así que al utilizar esta metodología constituye una herramienta fundamental para el estudio de la susceptibilidad del patógeno frente a cualquier método de control. Se han utilizado inoculaciones de hojas desprendidas o partes de hojas de café para

estudiar la biología del hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix*. Al utilizar discos de hojas frente a hojas enteras permite entender el grado de porcentaje exacto de la severidad en un diámetro estándar utilizado, ocasionado por *Hemileia vastatrix*.

Los resultados analizados concuerdan con Ward, Rozo, Peña y Silva, que al usar hojas enteras su tamaño y área varían entre cada una de ellas, los discos de hojas de café en este caso de 2,5 cm de diámetro, permitieron aumentar el número de repeticiones en cantidades de espacio relativamente pequeñas. Al utilizar la metodología elaborada y adaptada por Silva *et al.*, (2018) se pudo obtener masas de esporas las cuales sirvieron para iniciar con el proceso de inoculación en los discos de hojas de café.

Utilizando el método de inoculación estándar, los discos de hojas permanecieron verdes y aparentemente sanos durante más de tres meses (Esques y Toma-Braghini, 1981). Los discos de hojas de café pueden mantenerse viables y funcionales durante 40 días, tiempo suficiente para que pueda presentarse la infección ocasionado por el fitopatógeno *Hemileia vastatrix* (Rivillas y Carlos, 2015).

La durabilidad y viabilidad de los discos de hojas de café en parte concuerda con lo descrito por los autores Esques, Rivillas y Carlos, debido a que en los resultados de la investigación se comprobó que los discos de hojas pueden mantenerse viables y funcionales durante 180 días, gracias a la adaptación en 2 incubadoras, lo cual genero condiciones abióticas adecuadas como humedad relativa 65,9 % y temperatura 22,8 °C.

7.2. Condiciones de humedad, luz y temperatura para el cultivo de líneas puras de *Hemileia vastatrix* en condiciones *in vitro*

Para lograr la temperatura optima, se calibraron tres lámparas LED con intensidad de luz diurna, el uso de plástico mica transparente de 1 mm permitió mantener una temperatura inicial de 18,9 °C, que luego se ajustó a 22,8 °C (Fig. 7). Al alejar las lámparas LED de las cajas de Petri, se observó un periodo de latencia debido a la disminución de la temperatura, por otro lado, al acercar las lámparas LED provoco la deshidratación de los discos de hojas de café (Fig. 8).

La adaptación exitosa de los discos de hojas de café se logró mediante la combinación de temperatura, humedad relativa y lámina de agua, la Figura 5 y la Figura 6 muestran la adaptación de los discos de café con una temperatura de 22,8 °C, humedad relativa del 65,9 % y 17 mL de agua destilada, se comprobó que los discos de café pueden mantenerse

viabiles y funcionales durante 180 días (Fig. 7), tiempo suficiente para que se inicie la severidad causada por *Hemileia vastatrix*, que tarda alrededor de 60 días.

Las temperaturas de 22 °C a 24 °C son óptimas para la germinación de las uredosporas, por encima de ellas se afecta severamente la germinación, en temperaturas por debajo del optimo 16 °C tienden a inhibir el crecimiento del hongo, de esta manera se prolonga el tiempo de germinación de las uredosporas, la formación de apresorios, la penetración y colonización del hospedante (Subero, 2005).

El ciclo epidémico se hace más largo a temperaturas por encima del optimo 27 °C ya que altera el metabolismo y disminuyen el poder germinativo. La luz es un factor determinante sobre la germinación de las uredosporas del hongo, donde la ausencia de luz estimula la germinación y el crecimiento del tubo germinativo, en cambio en el periodo de oscuridad para alcanzar un máximo de germinación es de 48 horas, siendo necesario 96 horas para un máximo de infección. La humedad relativa a partir del 95% y 98% son inadecuadas para estimular la germinación, por ende, no tiene lugar cuando no hay agua líquida en contacto con las esporas (Agrios, 2010).

Al acondicionar los factores abióticos, algunos de los datos concuerdan con lo mencionado por Subero y Agrios, ya que al hacer uso de las incubadoras, se puede otorgar las condiciones favorables como: una temperatura de 22,8 °C sin radiación solar, mientras que para el periodo de incubación se requirió de temperaturas casi similares entre 22 y 23 °C, lo que permitió la formación y aparición del fitopatógeno, la humedad relativa a un promedio de 65,9 % permitió el establecimiento del fitopatógeno, se utilizó una cantidad de 17 ml de agua destilada, para evitar que los discos de hojas de café no se deshidraten. En esta ocasión al utilizar tres lámparas led de temperatura color blanco (6500 °k) luz de día, con un flujo luminoso de 1600 lumen de temperatura por cada lámpara (led), situadas a una distancia de 23 centímetros desde la caja Petri hacia la lámpara, genero un microambiente idóneo para el establecimiento de los discos de hojas de café logrando la adaptación, colonización y diseminación de la roya *Hemileia vastatrix*.

La inoculación del fitopatógeno *Hemileia vastatrix*, se realizó con el criterio en base al mayor porcentaje de esporas, micelio e hifas, por lo cual se escogió 3 microtubos 7, 8 y 10 los cuales presentaron concentraciones de 2900 U/mL, 4000 U/ml y 2800 U/mL respectivamente, el inicio de la enfermedad empezó con la aparición de pequeñas manchas cloróticas que fueron creciendo hasta la esporulación, en un periodo que tardo

de 28 a 37 días, concuerda en parte con lo reportado por Chinnapa y Sreenivasan, quienes señalan que los discos se desarrollaron en porcentajes de severidad en una etapa que comprende de 20 a 25 días después de la inoculación, cabe recalcar que no se utilizaron las mismas condiciones que los autores anteriores, ya que los datos sirvieron como referencia para establecer nuevas alternativas.

Presencia de esporas e hifas, dado que la formación de esporas son parte de la fase final del ciclo infeccioso y al mismo tiempo una fase inicial del ciclo reproductivo de la enfermedad de fitopatógeno *Hemileia vastatrix*.

7.3. Líneas puras de *Hemileia vastatrix* para trabajos *in vitro* con la roya.

Tras observar visualmente una gran cantidad de esporas, se procedió a obtener el inóculo para la segunda infección en el cultivo cíclico, el inóculo se recolectó entre los meses de febrero y marzo, el porcentaje de severidad obtenido, representado por un total de 15.52 % (Fig. 9) se calculó a partir de la suma del área dañada en los discos de tejido foliar, con un valor de 1117.5, evaluados en 72 discos. Según la escala de Sinavef (2015), la infección se encuentra en la fase de aceleración.

Se seleccionaron colonias y se realizó el raspado del tejido vegetal para aislar las nuevas líneas puras de roya, visualmente, las esporas no presentaron coloraciones u otras características que sugieran contaminación con otros organismos. El análisis microscópico de la masa de esporas de roya de este nuevo inóculo no mostró evidencias de contaminación, las esporas individualmente presentaron características morfológicas similares a las del primer inóculo (Fig. 11), la cual se utilizó como indicador de viabilidad, las esporas colectadas reflejaron estructuras morfológicas distintivas de basidiosporas de *Hemileia vastatrix* (Fig. 11).

Se examinaron visualmente los discos de tejido foliar para determinar la presencia de estructuras que sugieran contaminación, encontrándose estomas limpios, sin signos de estructuras de estructuras vegetativas de hongos parasitarios (Fig. 10A). Todos los discos de la segunda infección del cultivo cíclico de *Hemileia vastatrix*, mostraron un establecimiento efectivo del hongo en el tejido foliar, marcado por la invasión de hifas en los estomas (Fig. 10B).

La concentración de esporas suspendidas en agua destilada de este nuevo inóculo fue de 1500 U/mL, el inóculo se aplicó sobre los discos de tejido foliar siguiendo las

especificaciones detalladas en la metodología (sección 5.2.1), los discos germinaron en microtubos de 2 mL en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente, durante 72 horas, al igual que la primera inoculación, se utilizó una cantidad de 45 μ L de inóculo en 72 discos de café previamente aclimatados (Fig. 7 y 8).

La infección comenzó en noviembre, 25 días después de la inoculación (ddi), durante el mes de diciembre, se observó un crecimiento lento de la nueva colonia. Las colonias formadas a partir del segundo inóculo se posicionaron entre el 1% y el 5% de severidad según la escala del índice de severidad de Sinavef (2015). De diciembre a febrero (55 ddi), todas las colonias entraron en la fase de aceleración según la misma escala, en el mes de abril las colonias de este segundo cultivo, alcanzaron la fase final de infección, aún bajo condiciones controladas de laboratorio (Fig. 12).

Se logró establecer un cultivo cíclico de *Hemileia vastatrix*, en discos de tejido foliar de café, al respecto no se evidenció colonización por organismos oportunistas o parásitos. Las condiciones controladas permitieron mantener la viabilidad y funcionalidad del cultivo durante el tiempo necesario para estudiar la severidad causada por *Hemileia vastatrix*.

La caracterización de las razas fisiológicas de *Hemileia vastatrix* se basa en las diferencias fenotípicas observadas en la interacción entre el hongo y hospedero (hojas de café) (Várzea y Marques, 2005). Las investigaciones acerca de las líneas puras concuerdan con lo descrito por Várzea y Marques, ya que para la obtención de líneas puras de esporas, Basidiosporas, Uredosporas de *Hemileia vastatrix*, se las identificó y aisló de las hojas del cultivo de café variedad típica, las esporas se encontraban en distintos estados: estado de basidiospora, llega o ingresa al primer hospedante (a) alternativo iniciando con la inoculación, luego en estado de eciosporas ingresa al hospedante (b) continuando con el proceso de infección y dispersión. Al haber identificado e inoculado en los discos de hojas de café bajo condiciones controladas, se obtuvieron nuevas líneas puras de esporas, las cuales iniciaron su agresividad comenzando a distribuirse en el lugar que fueron inoculados en los discos de hojas concordando con lo descrito por los autores Ward y Agrios, el proceso de infección inicio con pequeños puntos blanquecinos, el proceso del grado de severidad duro alrededor de 75 días con un porcentaje total de 15,52 % de grado de severidad.

8. Conclusiones

Los discos de hojas de café lograron la supervivencia por un lapso de 180 días al utilizar el método estándar de inoculación, lo cual resulta en que los discos de hojas de café variedad típica permanecen verdes y aparentemente sanos, realizando pruebas de adaptación usando una lámina de agua de 17 mL, una temperatura inicial de 19 °C y una temperatura final de 23 °C, al utilizar las incubadoras se logra una adaptación óptima con una temperatura de 22,8 °C y humedad relativa de 65,9 % dando en la supervivencia tanto del hospedero con el fitopatógeno.

El entorno puede influir en la adaptación y viabilidad de los discos de hojas de café.

El método de discos de hojas proporciona resultados más fiables, debido a que permite cuantificar de manera precisa el grado de severidad basándose en una escala adaptada.

Se logro observar la eficiencia al utilizar los discos de hojas de la planta de café para ser inoculados, la viabilidad de estos fragmentos se prolongó hasta que *Hemileia vastatrix* cumplió con su ciclo patogénico.

El fitopatógeno *Hemileia vastatrix* se propago en los discos de hojas de café eficientemente, se puede sugerir que la roya usa los discos de hojas como medio de adaptación para impulsar su metabolismo y proporcionar el inicio de la severidad.

Las condiciones controladas permitieron mantener la viabilidad y funcionalidad del cultivo durante el tiempo necesario para estudiar el índice de severidad causada por *Hemileia vastatrix*.

Las líneas puras de *Hemileia vastatrix* que se obtuvieron proporciona las pautas necesarias para continuar con la identificación de un objetivo de ataque contra el fitopatógeno.

9. Recomendaciones

- Con la obtención de líneas puras de *Hemileia vastatrix*, se recomienda realizar pruebas para estudiar sus proteínas y enzimas que intervienen en la desintegración de nutrientes para su asimilación.
- Realizar investigaciones sobre la utilización de herramientas bioinformáticas que faciliten la implementación de nuevas técnicas y métodos para la identificación de proteínas y enzimas que sean a beneficio del campo agrícola.
- Continuar con el estudio del fitopatógeno para lograr establecer un objetivo único para el ataque y contención de *Hemileia vastatrix*

10. Bibliografía

- Aime C. 2006. Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). *Mycoscience* 47:112–122.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1340354006704119>
- Agrios, G. (2010). Libro fitopatología. *Fitopatología*, 25(1), 30–41.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Arneson, P. (2000). The American Phytopathological Society.
- Avelino, J., & Rivas, G. (2013). La roya anaranjada del caféto.
- Arjona, D. H. (1996). Toma, transporte y metabolismo del agua y nutrientes en la planta. *Agronomía Colombiana*, 13(2), 138-141.
- Brooks, S. (2018). Investigation of Diverse Cryopreservation Techniques for Long Term Storage of Coffee Leaf Rust *Hemileia vastatrix*. *Science & Technology Asia*, (March), 23–29. <https://doi.org/10.14456/scitechasia.2018.4>
- Carvalho, C. R., Fernandes, R. C., Carvalho, G. M. A., Barreto, R. W., & Evans, H. C. (2011). Criptosexualidad y la paradoja de la diversidad genética en la roya del café, *Hemileia vastatrix*. *Plos one*, 6(11), 1–7.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026387>.
- Campa C., L. Urban, L. Mondolot, D. Fabre, S. Roques, Y. Lizzi, J. Aarouf, S. Doulbeau, J. C. Breitler, C. Letrez, L. Toniutti, B. Bertrand, P. La Fisca, L. P. R. Bidet and H. Etienne (2017) Juvenile coffee leaves acclimated to low light are unable to cope with a moderate light increase. *Frontiers in Plant Science* 8:1126, doi: 10.3389/fpls.2017.01126
- Celis, A., Mendoza, C. F., & Pachón, M. E. (2009). Uso de extractos vegetales en el manejo integrado de plagas, enfermedades y arvenses
- Chinnappa, C. C., & Sreenivasan, M. S. (1968). Cytology of *Hemileia Vastatrix*. *Caryologia*, 21(1), 75–82. <https://doi.org/10.1080/00087114.1968.10796284>
- Cristancho, MA, Rozo, Y, Escobar, Rivillas C, CA, and Gaitán, AL. 2012. Outbreak of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in Colombia. *New Disease Reports* 25, 19. [doi:10. 5197/j.20440588.2012.025.019].
- Croce Portocarrero, M. A., da Costa Manso, E. R., Gambale, W., Takayama, L., Oliveira Andrade, C.E., Pereira Pinto, J. H., & Croce, J. (2001). Sensibilización al hongo *Hemileia vastatrix* (roya del café). *Allergy*, 56(7), 684-687.
- DGSV-SINAVEF-LANREF, 2015. Escalas de severidad de roya del café en hoja y planta.

- [http://www.royacafe.lanref.org.mx/Documentos/Escala Severidad Defoliaci3n/planta y hoja.pdf](http://www.royacafe.lanref.org.mx/Documentos/Escala%20Severidad%20Defoliaci3n/planta%20y%20hoja.pdf)
- Duran, L. C. (1985, noviembre). Avances de los estudios epidemiol3gicos de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*) en M3xico. Comunicaci3n presentada en el Taller regional de PROMECAFE sobre epidemiolog3a de la roya del cafeto. IICA, PROMECAFE. Antigua, Guatemala. 33-52.
- Escobar O., C., & Cristancho A., M. (2007). Estudio de metodolog3as para la conservaci3n de uredinosporas de la roya del cafeto. *Cenicaf3*, 58(4), 324–332.
- Eskes, A. B. (1982). The use of leaf disk inoculations in assessing resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 88(4), 127-141.
- FAO. (2016). Manejo agroecol3gico de la roya del caf3. In *Memorias del seminario cient3fico internacional*: <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1011.8484>.
- Franco Shiomi, H., Sandro Alves Silva, H., Soares de Melo, I., Vieira Nunes, F., & Bettiol, W. (2006). Bioprospecting Endophytic Bacteria for Biological Control of Coffea Leaf Rust Bioprospec33o De Bact3rias Endof3ticas Como Agentes De Biocontrole Da Ferrugem Do Cafeeiro. *Sci. Agric. (Piracicaba)*, 63(1), 32–39. <http://www.scielo.br/pdf/sa/v63n1/27900.pdf>
- Gilchrist, S. L., G; Fuentes, D, C; Mart3nez, C, R. M; L3pez, A, E; Duveiller, R. P; Singh, M. Henry e I. Garc3a A. 2005. Gu3a pr3ctica para la identificaci3n de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda edici3n. M3xico, D.F.: CIMMYT.
- GOTTSCHALK M, BLANZ PA. Highly conserved 5S ribosomal RNA sequences in four rust and atypical 5S rRNA secondary structure in *Microstroma juglandis*. *Nucleic Acids Res.* 1984;12:3951-3958.
- Gouveia M., Ribeiro A., & Rodrigues C. 2005. Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. *Mycologia* 97: 396–404
- Hiratsuka Y. & Sato S. 1982. Morphology and Taxonomy of Rust Fungi. *Morphology and taxonomy of rust fungi C*: 1–36.
- KROPP BR, HANSED DR, WOLF PG, FLINT KM, THOMSON SV. A study on the phylogeny of the Dyer's Woad rust fungi and other species of *Puccinia* from Crucifers. *Phytopathology*. 1997;87:565-571.
- Lashermes, P., Trouslot, P., Anthony, F., Combes, M., & Charrier, A. (1996). Genetic diversity for RAPD markes between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. *Euphytica*, 87, 59- 64.
- Madigan MT, Martinko JM & Parker J. Brock. *Biolog3a de los Microorganismos*. 10^a edici3n. Pearson Educaci3n, 2009.

- Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA & Clark DP. Brock. Biology of Microorganism. 13ª edición. Pearson, 2012.
- MAIER W, WINGFIELD BD, MENNICKEN M. Polyphyly and two emerging lineages in the rust genera *Puccinia* and *Uromyces*. Mycol Res. 2007;176-185.
- MAG. (2017) Informe al congreso cafetalero. Sector agrícola alimentario. Gobierno de la república de Costa Rica.
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence, 4(2), 119–128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
- Martínez, M. A. (2011). Consecuencias ambientales del uso de pesticidas. Ciencia Hoy, 30-35. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
- Melo, E. De, Filho, V., & Domian, C. A. (2015). Prevención y control de la roya del café Manual de buenas prácticas para técnicos y facilitadores Prevención y control de la roya del café Manual de buenas prácticas.
- Mena Echevarría, A., Mujica Pérez, Y., Fernández Suárez, K., Rodríguez, A., & Dell, J. (2015). Viabilidad de esporas y funcionamiento de un inoculante líquido a base de *Glomus cubense* en *Sorghum bicolor* L. cv. Moench. Cultivos Tropicales, 36(3), 27-33.
- Mora, G. 2008. Epidemiología fundamentos y aplicaciones en patosistemas agrícolas. Guatemala, Universidad Rafael Landivar. 75 p.
- Mora, G. (2016). Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome). Ficha técnica N° 40. Servicio nacional de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria. Dirección General de Sanidad Vegetal. (40), 23p.
- Nagini S., F. Palitti and A. T. Natarajan (2015) Chemopreventive potential of chlorophyllin: a review of the mechanisms of action and molecular targets. Nutrition and Cancer 67:203-211, doi: 10.1080/01635581.2015.990573
- Nutman, F. J. 1959. Kanya Coffea: 451. y Roberts, F. H. 1962. Kenya Coffe 77:273.
- Panstruga, R. (2003). Establecimiento de la compatibilidad entre plantas y patógenos biotróficos obligados. Opinión actual en biología vegetal, 6(4), 320-326.
- PFUNDER RS, SCHURCH S, ROY BA. Sequence variation and geographic distribution of pseudoflower-forming rust fungi (*Uromyces pisi* s. lat.) on *Euphorbia cyparissias*. Mycol Res. 2001;105:57-66.
- Porto, B. N., Caixeta, E. T., Mathioni, S. M., Vidigal, P. M. P., Zambolim, L., Zambolim, E. M., de Resende, M. L. V. (2019). Genome sequencing and transcript analysis of *Hemileia vastatrix* reveal expression dynamics of candidate effectors dependent on host compatibility. Plos One, 14(4), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215598>.

- 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.
- 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.
- Silva, Barreto, Rodríguez, & Metei. (2018). Control of coffee leaf rust by chitosan and propolis. Federal U.
- Shigueoka L.H., Sera G.H., Sera T., Cristina I., Fonseca D.B. & Mariucci V. 2014. Selection of Arabic coffee progenies whit rust resistance. 88-93.
- Subero, L. (2005). La roya del café. <http://www.infocafes.com/descargas/biblioteca/136.pdf>.
- Sugden, A. (1984). Diccionario Ilustrado de la Botánica. Colombia: Printer Colombiana Ltda.
- Toniutti, L., Breitler, J. C., Etienne, H., Campa, C., Doulebeau, S., Urban, L., Bertrand, B. (2017). Influence of environmental conditions and genetic background of Arabica coffee (*C. Arabica* L) on leaf rust (*Hemileia vastatrix*) pathogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 8(November), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02025>
- VAN DER MERWE M, ERICSON L, WALKER J, THRALL PH, BURDON JJ. Evolutionary relationships among species of *Puccinia* and *Uromyces* (Pucciniaceae, Uredinales) inferred from partial protein coding gene phylogenies. *Mycol Res.* 2007;163-175.
- Várzea, V. 2013. Avances del conocimiento sobre las razas de roya del café, con énfasis en la caficultura de Latinoamérica, Turrialba, Costa Rica, CATIE. Presentación power point.
- Várzea, V.M. y Marques, D.V. 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs. coffee durable resistance. In: Zambolin L, Zambolim EM, Várzea VM (Eds.) *Durable Resistance to Coffee Leaf Rust*. Viçosa MG, Brazil. Editora UFV, p. 53-74.
- Villarreyña Acuña, R. A. (2014). Análisis de las condiciones de manejo que propiciaron el impacto de la roya (*Hemileia vastatrix*) en la zona cafetalera de los municipios de Jinotega, el Tuma- La Dalia y San Ramón, Nicaragua. In Simposio Internacional sobre café adensado. Londrina, Brasil. ANAIS. 14(2): 85-97. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.32511.20642>
- VOGLER D, BRUNS T. Phylogenetic relationships among the pine stem rust fungi (*Cronartium* and *Peridermium* spp.). *Mycologia.* 1998;99(2):244-257.

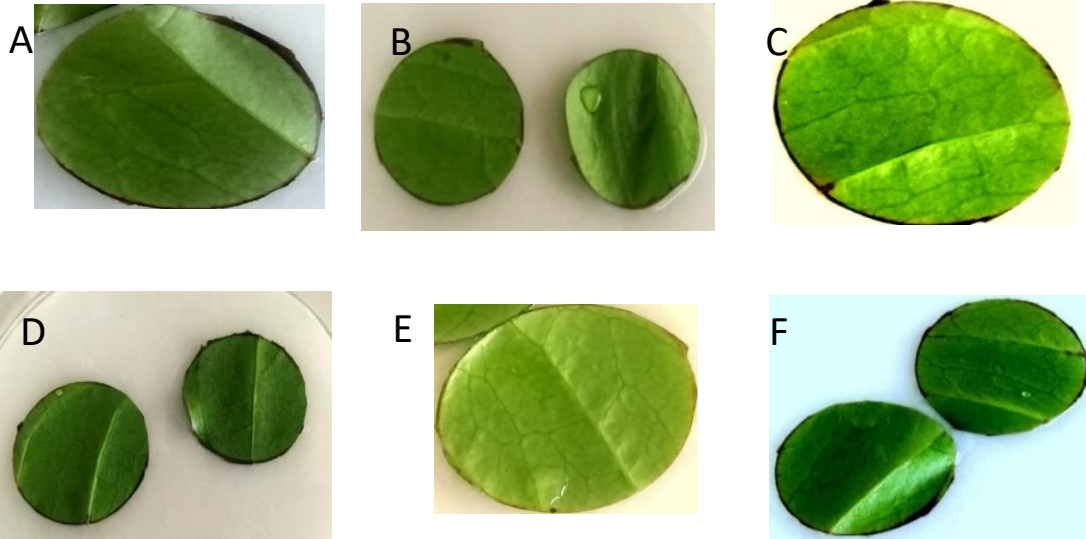
VOLCY C, PARDO-CARDONA V. Principios de micología. Universidad Nacional de Colombia. Medellín; 1994.

Ward, M.H., 1882. Investigaciones sobre la historia de vida de *Hemileia vastatrix*, Hongo de la enfermedad de la hoja de café. J. Linn. Soc. (Bota) 19: 299-335.

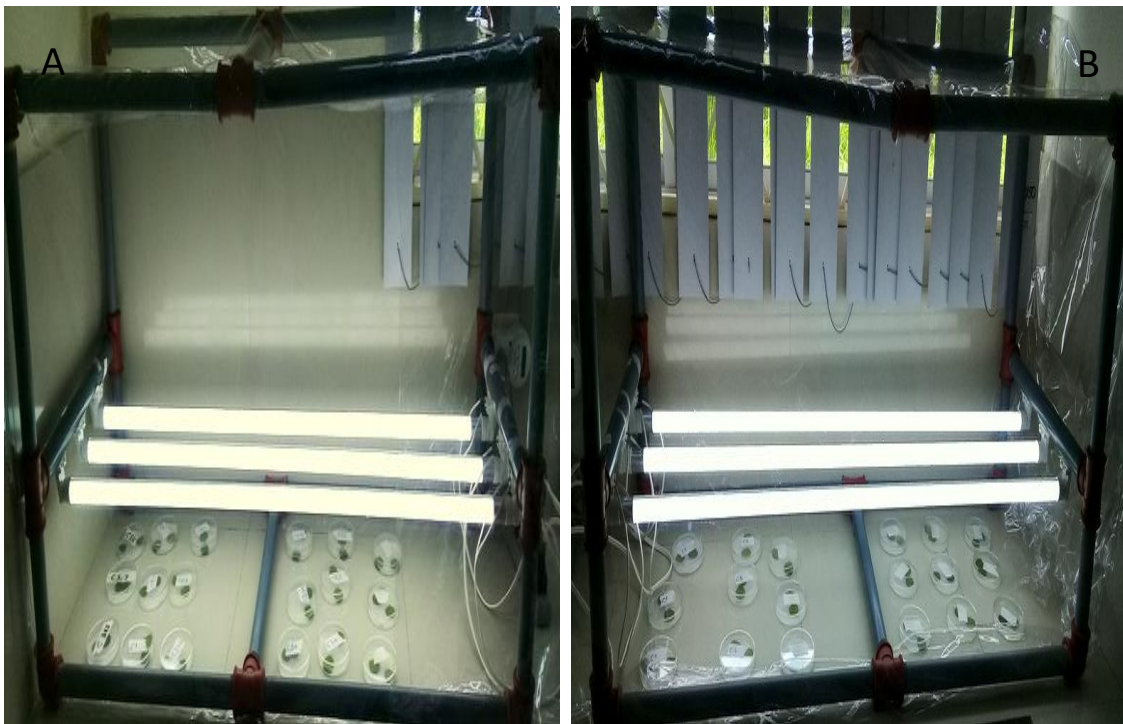
Wolansky, M. (2011). Plaguicidas y salud humana. Ciencia Hoy, 10-35.

11. Anexos

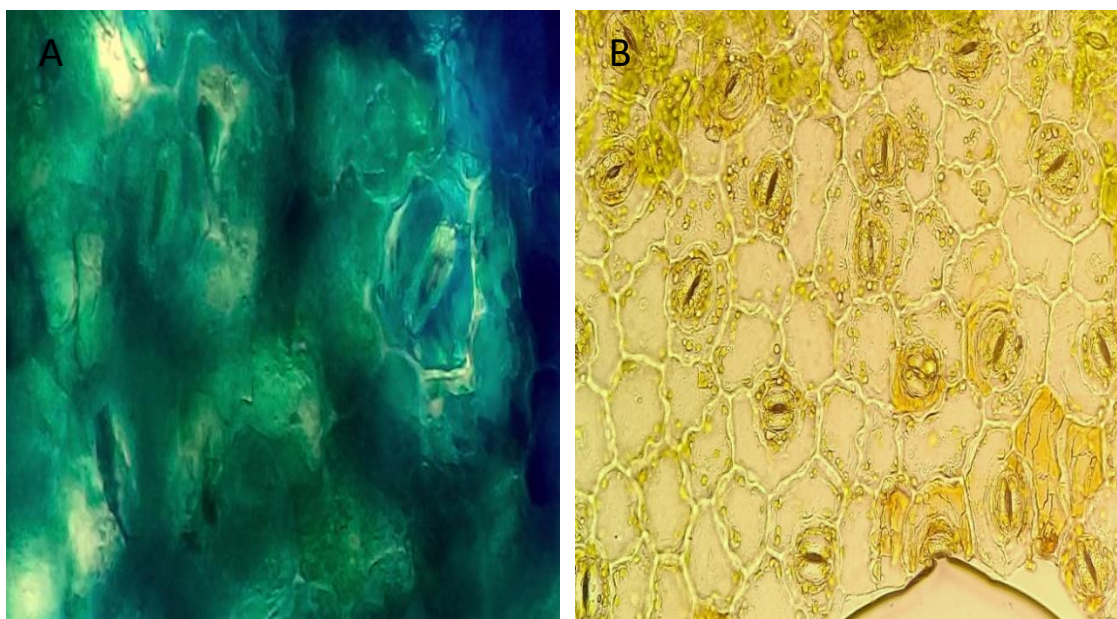
Anexo 1. Establecimiento de discos de hojas de café, durabilidad hasta antes de la inoculación 180 días (A-B-C-D-E-F), (13/06/2022-16/11/2022)



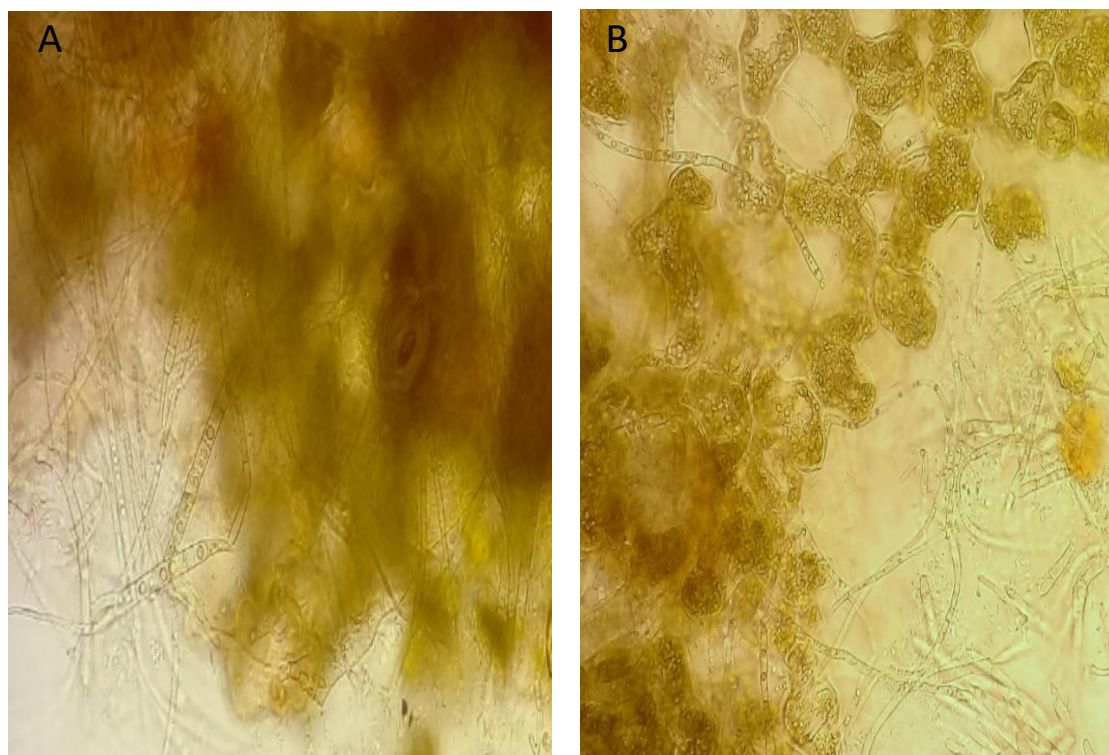
Anexo 2. Incubadoras (A) (B), para aclimatar y mantener los discos de hojas de café a lo largo del tiempo



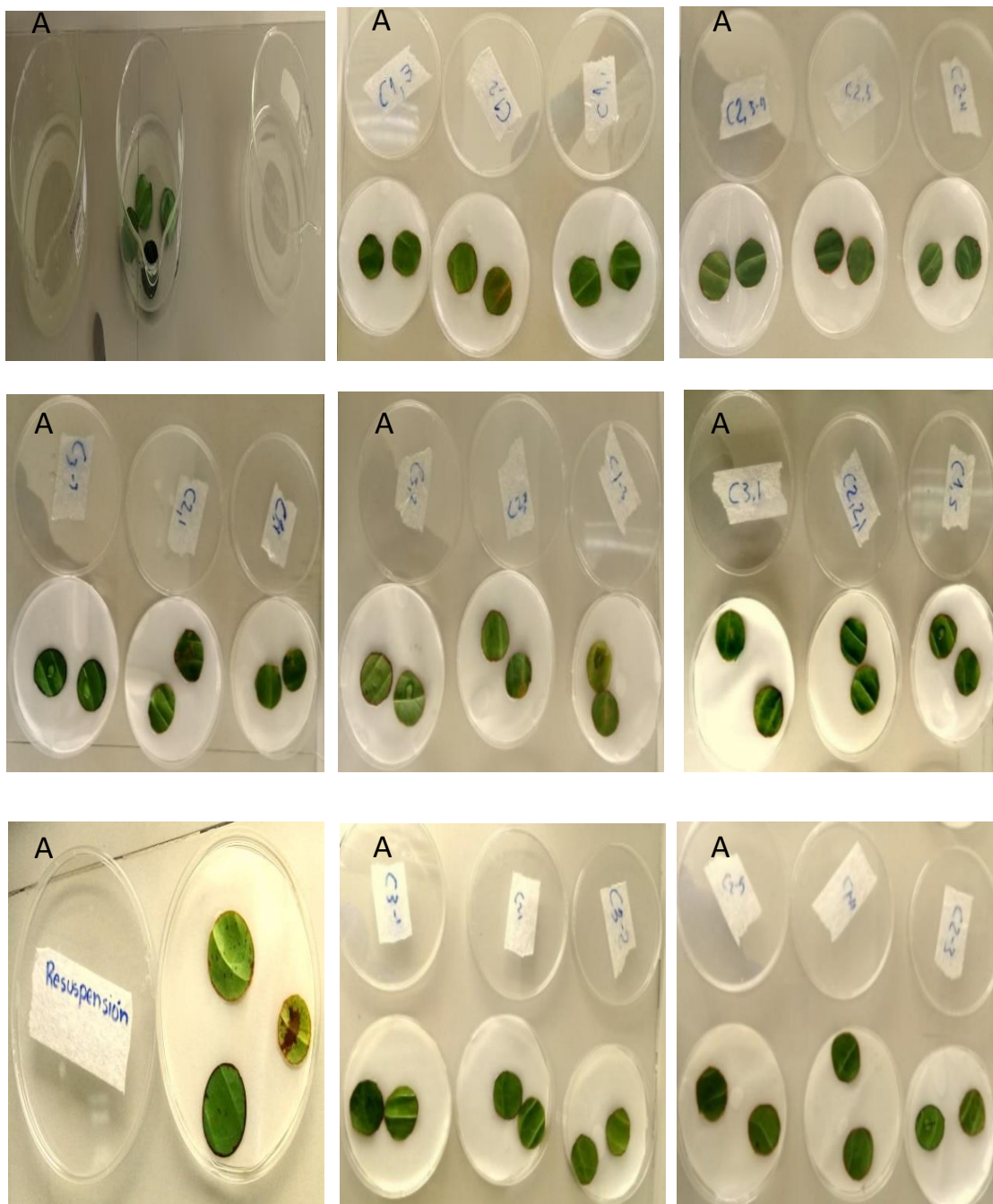
Anexo 3. Raspado de tejido vegetal envés de la hoja, (**A** estomas sanos con azul de metileno, **B** corte envés de la hoja, estomas sanos abiertos y cerrados)



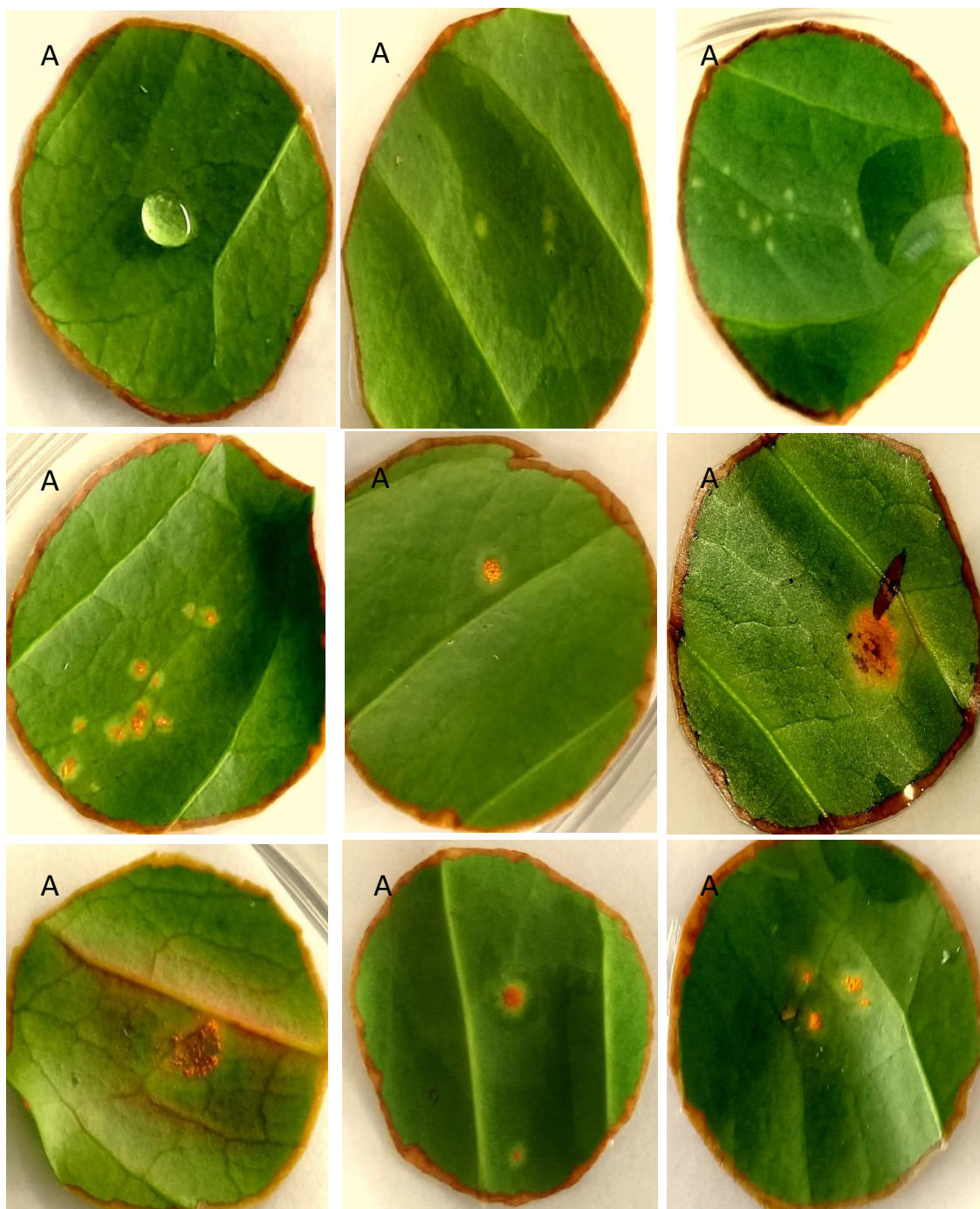
Anexo 4. Raspado de tejido vegetal estomas contaminados con: **A** micelio, **B** hifas de *Hemileia vastatrix*, (A-B), proceso de infección y alimentación



Anexo 5. Asepsia de los discos de hojas (A1), inoculación en los discos de hojas de café (A2), (A3), (A4), (A5), (A6), (A7), (A8), (A9).

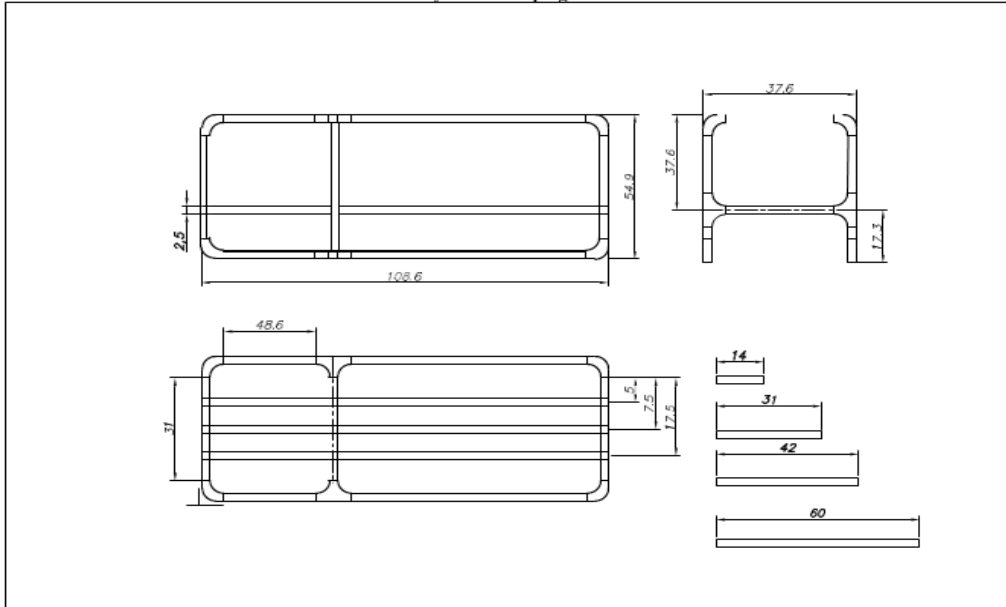


Anexo 6. Inicio de la infección, (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9) de *Hemileia vastatrix*



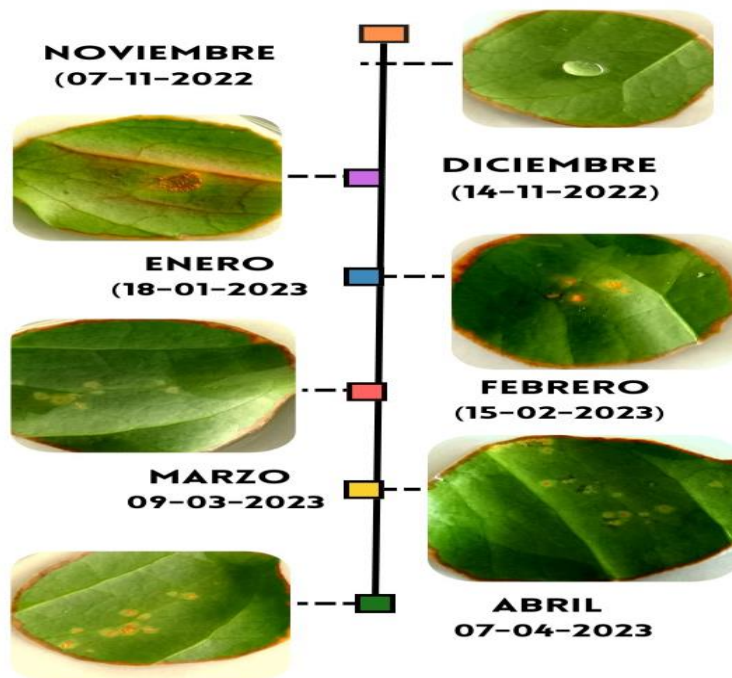
Anexo 7. Diseño plano de incubadora

Diseño, plano de incubadora
Medidas de tubos de una pulgada 14cm, 31cm, 42cm, 60 cm
Codos y tes de una pulgada



Anexo 8. Progreso de la severidad de *Hemileia vastatrix* a través del tiempo, inicio del proceso de severidad a partir del mes de noviembre hasta la fecha del 07 de abril, con un porcentaje de severidad total de 15,52 %.

LÍNEA DEL TIEMPO Y PROGRESO DE LA SEVERIDAD DEL FITOPATOGENO OBLIGADO HEMILEIA VASTATRIX



Anexo 9. Certificado de traducción del Abstract

CERTIFICADO DE TRABAJO

Lic.

Nathaly Antonela Ramón Maldonado

Licenciada en Pedagogía en el Idioma Ingles

CERTIFICO:

En calidad de traductora del idioma inglés, a través de la Certificación de conocimiento de inglés, nivel B2, certifico que el documento aquí compuesto es fiel traducción del idioma español al idioma inglés del resumen (Abstract) del trabajo de titulación: **Cultivo de línea pura de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br, causante de la roya del café mediante implementación de ciclos continuos de inoculaciones *in vitro***; de la autoría de Franco Alexander Ramón Maldonado con CI: 1105869299, egresado de la carrera de Ingeniería Agronómica de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja.

En cuanto puedo certificar en honor a la verdad, facultando al interesado, señor Franco Alexander Ramón Maldonado, hacer usos del presente, según estime conveniente.

Atentamente:

NATHALY ANTONELA
RAMON MALDONADO

Firmado digitalmente por
NATHALY ANTONELA RAMON
MALDONADO
Fecha: 2024.04.30 23:54:16 -05'00'

Lic. Nathaly Antonela Ramón Maldonado

Licenciada en Pedagogía en el Idioma Ingles