



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIÓLOGO

Identificación molecular de morfotipos *Hemileia vastatrix* causante de la roya del café en la provincia de Loja

TRABAJO DE TITULACIÓN.

Autora: Calderón Rueda, Ximena Soledad

Directora: Rojas Rojas, Jacqueline Elizabeth Ing.

LOJA – ECUADOR

2016



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Febrero, 2016

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ingeniera.

Jacqueline Elizabeth Rojas Rojas.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación; “Identificación molecular de morfotipos *Hemileia vastatrix* causante de la roya del café en la provincia de Loja”, realizado por Ximena Soledad Calderón Rueda ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, febrero 2016

f).....

Ing. Jacqueline Elizabeth Rojas Rojas

DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Ximena Soledad Calderón Rueda declaro ser el autora del presente trabajo de fin de titulación: Identificación molecular de morfotipos *Hemileia vastatrix* causante de la roya del café en la provincia de Loja”, de la Titulación de Biología, siendo Ing. Jaqueline Rojas directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f.....

Autora: Ximena Soledad Calderón Rueda

Cédula: 1104675879

DEDICATORIA

A Dios, por nunca permitirme darme por vencida, por llevarme siempre en sus brazos en los momentos más difíciles.

A mis ángeles personales mi madre Norma por enseñarme a nunca rendirme y ser siempre positiva, por no desampararme y hacerme sentir esa calidez entrañable en los momentos difíciles, mi pequeño ángel Daniel mi corazón estará siempre con ustedes.

A mi abuelita y mis padres Martita, Guido y Luis por guiarme con sus sabios consejos y esas sonrisas que le han dado a mi vida.

A mis hermanos Alexandra, Santos, Thalía y Dayana por todo el amor, y su compañía incondicional, en esas largas horas.

A Angelo, Sabrina, Verónica y Stellamaris por ser mi grandes amigos, mis colegas, la razón de tantas enseñanzas, y tantas sonrisas.

A mis amigos por tanto cariño y momentos de complicidad únicos.

A mi familia por ser parte de esta aventura que es la vida.

Ximena Soledad

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Técnica Particular de Loja por permitirme desarrollarme personal y profesionalmente.

A Agrocalidad por su apoyo constante en la logística de campo.

A mi directora de tesis Jacqueline Rojas por haberme guiado por el buen camino, su amistad, paciencia y acertada dirección en este proyecto de tesis.

A mi Co-tutor Bqf. Darío Cruz, Juan Eguiguren, por la paciencia y todas las enseñanzas además del carisma con el cual siempre me apoyaron.

A mi grupo de trabajo del laboratorio de Sanidad Vegetal quienes hicieron mis días más llevaderos; son los culpables de muchos momentos felices.

A todos los Docentes Investigadores del Departamento de Ciencias Agropecuarias y Alimentos en especial a la Dra. Catalina Rey por sus consejos y esos regañones que tanto me han servido.

A los Docentes de Biología por el ímpetu en cada clase, y porque con sus consejos y sabiduría han sabido guiarme en especial: los Biólogos Máximo, Lorena, Carlos, David y Chris por ser no solo mis guías en esta senda del saber, sino además darme su apoyo incondicional y gratos recuerdos.

A Sabrina, Krupskaya, Ángel, por su apoyo constante en los muestreos, por ser no solo mis compañeros sino también mis grandes amigos.

A mi familia por nunca desampararme, y saberme comprender en cada instante.

Sabrina, Stellamaris, Verónica, Kelly, Marlon, Valeria, Andrea, Cristina, Verónica M, Karen, Liz, Mónica, Aphy, Danilo, Jonathan, José, May, Fernando por soportar tantos ratos, tener tanta confianza en mí y ser parte de mis más gratos recuerdos, mis grandes amigos, por hacer más llevadera esta vida.

A Angelo por su gran apoyo y su amor incondicional.

En todo este tiempo muchas personas han logrado hacerse con una parte de mi agradecimiento profundo, porque han sido parte de mi vida en formas que nunca pensé, aunque no son nombradas aquí, sin ellos todo esto no habría sido posible.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Página

CARÁTULA	I
CERTIFICACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VI
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN (PRÓLOGO)	3
CAPÍTULO I	4
MARCO TEÓRICO	4
1.1 Reino Fungi	5
1.2 Taxonomía de <i>Hemileia vastatrix</i>	5
1.3 Ciclo biológico de <i>Hemileia vastatrix</i>	6
1.3.1 Epidemiología	8
1.4 Distribución mundial de <i>Hemileia vastatrix</i>	10
1.4.1 Distribución de <i>Hemileia vastatrix</i> en Ecuador	10
1.5 Razas de <i>Hemileia vastatrix</i> y Diversidad Genética	11
1.6 OBJETIVOS	14
CAPÍTULO II	15
MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1 Muestreo y colecta	16
2.2 Aislamiento	17
2.3 Caracterización molecular	18
2.4 Análisis Filogenético	19
CAPÍTULO III	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
3.1 Aislamiento	21
3.2 Caracterización Molecular	22
4.CONCLUSIONES	28
5.RECOMENDACIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30
ANEXOS	35

<i>Anexo 1. Fórmula para obtener el número de muestras</i>	36
<i>Anexo 2. Composición de Potato Dextrose Agar (PDA)</i>	36
<i>Anexo 3. Composición de Malt Extract Agar(MEA)</i>	37
<i>Anexo 4. Resultados de secuenciación</i>	37
<i>Anexo 5. Protocolo de Extract-N-Amp Plant PCR</i>	38

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1.- Estructuras que intervienen en el ciclo de vida de <i>Hemileia vastatrix</i>	7
Figura 2.- Epidemiología de la roya del café <i>Hemileia vastatrix</i> .	8
Figura 3.- Epidemiología de <i>Hemileia vastatrix</i>	9
Figura 4.- Distribución mundial de <i>Hemileia vastatrix</i>	10
Figura 4.- Tratamientos en medios de cultivo PDA y MEA	22
Figura 5.- Filograma generado a partir de datos de secuencia de las región ITS de <i>Hemileia vastatrix</i>	23
Figura 6.- Filograma generado a partir de datos de secuencia de las región 28S de <i>Hemileia vastatrix</i>	24
Tabla 1.- Número de muestras tomadas por cantón	17
Tabla 2.- Muestras seleccionadas de los diferentes morfotipos	18
Tabla 3.- Características de los morfotipos de <i>Hemileia vastatrix</i>	23
Tabla 4.- Morfotipos pertenecientes en los diferentes cantones	24
Tabla 5.- Análisis de correlación de pares de bases de las secuencias pertenecientes a la fig. 6 (ITS)	27
Tabla 6.- Análisis de correlación de pares de bases de las secuencias pertenecientes a la fig. 6 (28S parcial)	27

RESUMEN

Hemileia vastatrix comúnmente denominada roya del café ha ocasionado grandes pérdidas para los productores, en el presente trabajo se estudió la diversidad genética en los diferentes morfotipos de la roya del café en plantas infectadas, los cuales fueron colectados en la provincia de Loja, por medio del análisis de secuencias de ADN ribosomal, las cuales se compararon con secuencias obtenidas del GenBank. El análisis de agrupamiento de las regiones ITS1, 5.8S, ITS2 de *H. vastatrix* permitió obtener dos genotipos los cuales presentaron una correlación del 10%, además de una completa diferenciación de las secuencias procedentes de cepas colombianas (GenBank), sin embargo al analizar la región 28S parcial se determinó que estos dos genotipos no son diferentes, pese a las diferencias morfológicas que presentan, las cuales pueden obedecer a factores climáticos, antropogénicos (edad del cultivo, uso de fungicidas), así como a características propias del patógeno como lo es su ciclo reproductivo, el cual se ha determinado es únicamente asexual, lo cual limitaría su variabilidad genética.

Palabras clave: Roya del café, diversidad genética, ADN ribosomal, marcadores ITS

ABSTRACT

Hemileia vastatrix, commonly known as coffee rust, has caused great losses for the coffee producers. In the present research, the genetic diversity in the different coffee rust morphotypes was studied on infected plants, which were collected in Loja Province, through the analysis of the Ribosomal DNA; these were compared to sequences obtained from GenBank. The analysis of the ITS1, 5.8S, and ITS2 regions in *H. vastatrix* grouping allowed us to obtain two genotypes that presented a 10% correlation, as well as a complete differentiation of the sequences originated from Colombian strains; however, while analyzing the partial 28S region it was determined that these two genotypes aren't different, in spite of the morphological differences they present, that can obey climatic or anthropogenic factors (cultivation age, use of fungicides) ; as well as the pathogen's own characteristics like the reproductive cycle, which was determined as entirely asexual, limiting its genetic variability.

Key Words: ITS markers, coffee rust, *Hemileia vastatrix*, genetic diversity, DNA ribosomal.

PRÓLOGO

La presente tesis de pregrado titulada “Identificación molecular de morfotipos *Hemileia vastatrix* causante de la roya del café en la provincia de Loja”, consistió en coleccionar, aislar y caracterizar molecularmente los diferentes morfotipos previamente establecidos, amplificando ADN ribosomal nuclear por medio del uso de espaciador transcrito interno (ITS) que comprende la región ITS 1-5.8S-ITS2 y también la región de la subunidad grande (LSU parcial), siendo el primer paso para poder estudiar la enfermedad a nivel nacional, considerando que el café es uno de los cultivos de importancia económica, social y ambiental.

Esta investigación está dividida en tres capítulos: En el primer capítulo se presenta una descripción taxonómica de *Hemileia vastatrix*, aspectos biológicos, epidemiología, distribución, hospederos, diversidad genética y razas; en el segundo capítulo se habla de los materiales y métodos utilizados para realizar la investigación, aplicados tanto en campo como en laboratorio; el capítulo tres, sintetiza los principales resultados obtenidos en este estudio, de igual manera se discute los mismos en base a otros estudios; y, finalmente se presentan las conclusiones y recomendaciones relacionadas con aspectos técnicos, metodológicos y de gestión de la información que deberían considerarse.

En Ecuador a pesar de la creciente importancia de su impacto devastador en la producción sostenible de los cultivos de café, no existen estudios sobre la diversidad genética de esta especie, la cual ha ocasionado un gran impacto en los cafetales, por ello la importancia del uso de técnicas moleculares y morfológicas que apoyen a la identificación de esta especie y sus morfotipos, permitiendo un mejor control del patógeno, y a su vez ampliar el conocimiento molecular de esta especie, constituyendo una herramienta metodológica que podrá ser usada por actores interesados en el conocimiento y manejo de procesos de la misma.



CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO



1.1 Reino Fungi

En el pasado los hongos fueron considerados como parte del reino vegetal, hasta que Whittaker (1969) realizó una nueva clasificación, creando un quinto reino el cual es conocido como Fungi o hongos, los organismos que se conocen como hongos presentan características generales como: membrana nuclear y otros organelos rodeados de membrana así como las demás características que definen a los eucariontes (Cepero *et al.*, 2012). Dentro del núcleo se encuentran uno o dos nucléolos pequeños y varios cromosomas (Deacon, 2006).

Al germinar, las esporas dan origen a diminutos filamentos llamados hifas, que en conjunto forman una composición estructural denominada micelio, una etapa de crecimiento previa a la formación de nuevas esporas (Cummins y Hiratsuka, 2003). Todos los hongos carecen de clorofila y por lo tanto no puede fotosintetizar su propio alimento por carecer de pigmentos fotosintéticos, característica que los diferencia de las plantas (Salustiano *et al.*, 2008; Doug *et al.*, 2012) Esto implica que deben obtener sus nutrientes desde diferentes sustratos descomponiendo materia orgánica por medios enzimáticos (Hiratsuka y Sato, 1982), o de organismos vivos los cuales pueden ser: bacterias, plantas, animales u otros hongos; ocasionando daño a otros (patógenos) o en simbiosis mutua, estableciendo un beneficio mutuo o comensalista (Piepenbring, 2015).

1.2. Taxonomía de *Hemileia vastatrix*

Hemileia vastatrix Berkeley & Broome (SENASICA, 2013), pertenece al Phylum Basidiomycota, orden Uredinales del género *Hemileia*, la principal forma de multiplicación es la uredospora, la cual es 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).

Hemileia pertenece a la familia de las Chaconiaceae y no a la familia de las Pucciniaceae, en la que anteriormente se clasificaba; esta clasificación basada en características morfológicas ha sido confirmada por estudios moleculares. La especie *H. 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* está alejado del género *Puccinia* y es muy cercano de *Maravalia cryptostegiae* de la familia de las Chaconiaceae, ocupa además una posición basal en el árbol de las royas; es por lo tanto, una roya primitiva (Avelino y Rivas, 2014; Aime, 2006) .

La identidad de *Hemileia vastatrix* entonces se cataloga de la siguiente manera;

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Pucciniomycotina

Orden: Pucciniales

Familia: Chaconiaceae

Género: *Hemileia*

Especie: *Hemileia vastatrix*

Nombre genérico y específico:

Hemileia vastatrix Berkeley & Broome

Sinonimia:

Wardia vastatrix J.F. Hennen & M.M. Hennen 2003

Nombre común:

Roya amarilla del café, roya del café, roya del café, moho del café.

1.3. Ciclo biológico de *Hemileia vastatrix*

El ciclo de vida de *H. 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 germinan, diferenciándose apresorios sobre los estomas (Figura 1) (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 las hojas a través de las aberturas naturales (estomas) situadas en el envés de las hojas maduras (Rayner, 1961; SENASICA, 2013a). 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 haustorios, cuales entran en contacto con las células de la planta y le permiten extraer los nutrientes para su crecimiento. 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, ya que se afecta el crecimiento de los tubos germinativos.

La eficiencia contaminadora óptima es alcanzada cuando se tienen de 15 a 30 esporas 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). Todos estos rasgos junto con el hecho que *H. vastatrix* es considerado uno de los más antiguos linajes de roya, hace de este un sistema biológico singular (Grasso *et al.*, 2006).

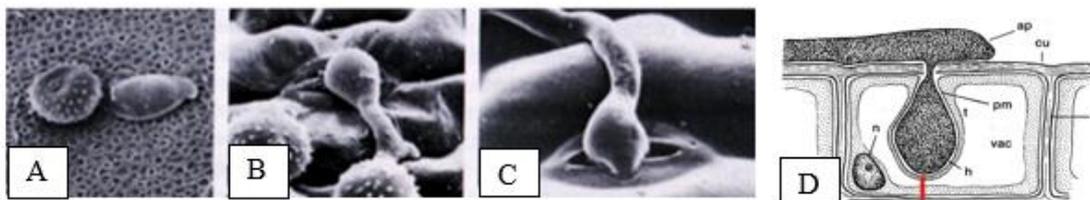


Figura 1. Estructuras que intervienen en el ciclo de vida de *Hemileia vastatrix*. a) Uredosporas, b) Uredospora con tubo germinativo y apresorio, c) Apresorio ingresando al estoma, d) Haustorio formado por el ingreso del apresorio al estoma.

Fuente: Adaptado de Zambolim (1999).

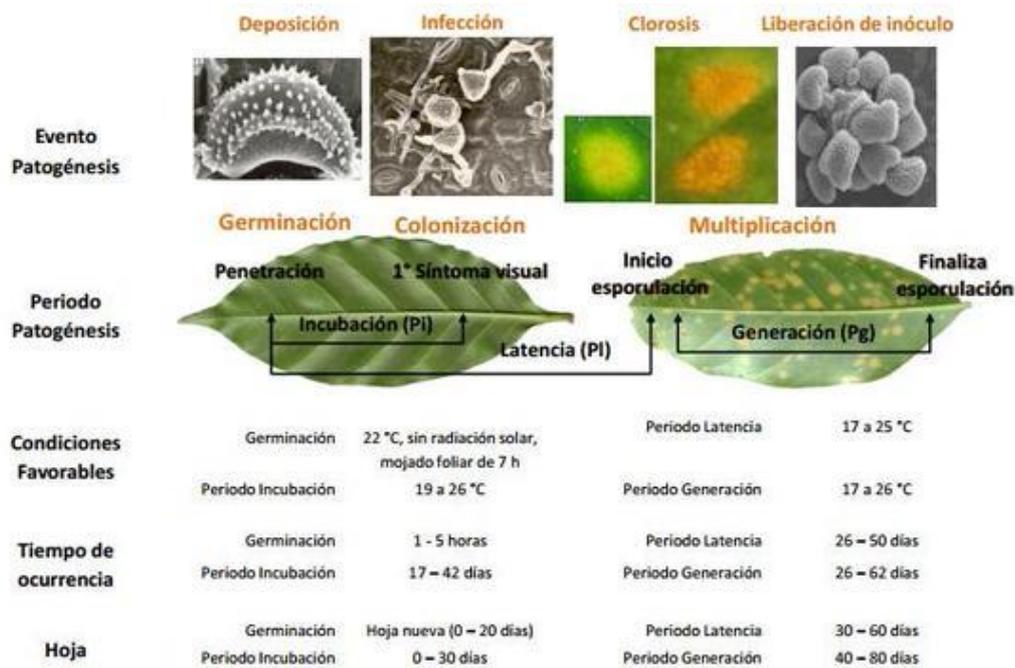


Figura 2. Ciclo biológico de la roya del caféto (*Hemileia vastatrix*).

Fuente: (SENASICA, 2013)

1.4. Epidemiología

En general todas las especies de café son atacadas en mayor o menor grado por *Hemileia vastatrix*. La planta de café es susceptible al ataque de la roya durante todas las etapas de su desarrollo, desde el estado cotiledonar hasta la etapa productiva en el campo (Vandermeer *et al.*, 2010).

La epidemia de la roya anaranjada tiene dos fases (Figura 3), la primera etapa conocida como **crítica** consiste en la formación del inóculo primario o inóculo inicial. Este es el inóculo responsable del desarrollo inicial de la epidemia (Rivillas *et al.*, 2014). La segunda etapa conocida como **post infección** consiste en la repetición del ciclo patológico de la roya anaranjada o policiclo, y la formación del inóculo secundario, como resultado de la fase anterior, el inóculo se dispersa dentro del árbol y entre los árboles, por lo cual ocurren mayor número de infecciones por unidad de tiempo, durante un periodo de dos a tres semanas, donde se puede llegar a presentarse en 30 o más hojas de cada 100 del árbol, finalmente estas caen y el número de hojas sanas es muy reducido por lo cual la enfermedad llega a su máximo por agotamiento del hospedero (Silva-Acuña *et al.*, 1994; SENASICA, 2013; Tirabanti *et al.*, 2013).

La intensidad de la epidemia de roya anaranjada depende más del número de ciclos que se pueden dar en el año que de la cantidad de inóculo primario (Romero *et al.*, 2009). Por lo mismo, pueden formarse focos de inóculo residual más o menos numerosos y dispersos (Teixeira-cabral *et al.*, 2004). Las primeras lluvias reactivan la esporulación sobre las lesiones necrosadas y/o latentes y se forma el inóculo primario (Cummins y Hiratsuka, 2003).

Paradójicamente, las aplicaciones de fungicidas pueden aumentar la cantidad de inóculo residual porque prolongan la vida de las hojas y especialmente de las hojas enfermas (Cummins y Hiratsuka, 2003).

La intensidad del ataque de una enfermedad depende de las interacciones entre el hospedero, el patógeno, el ambiente y el manejo (Carvalho *et al.*, 2011). Aunque se sabe que la agresividad y la virulencia del patógeno pueden variar (SENASICA, 2013), no se han documentado las implicaciones epidemiológicas de estas variaciones en Ecuador.

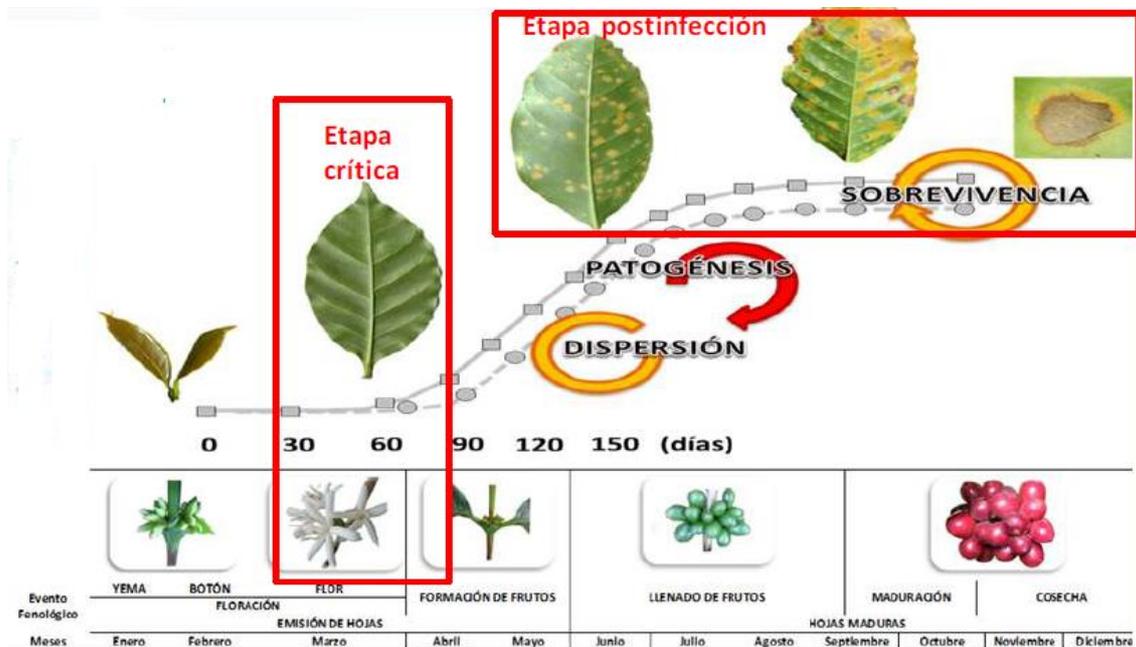


Figura 3 Epidemiología de *Hemileia vastatrix*. A) Etapa crítica o inicial de la epidemia, B) Etapa de post infección; caracterizada por un mayor número de policiclos.

Fuente : Adaptado de (SENASICA, 2013).

1.5. Distribución mundial de *Hemileia vastatrix*

Hemileia vastatrix la roya anaranjada del café fue reportada formalmente por primera vez a principios de 1869 en una plantación de la isla asiática de Ceilán, hoy Sri Lanka. En ese mismo año, el micólogo británico Berkeley describió y nombró el hongo responsable de la enfermedad: *H. vastatrix*. Al llegar a Ceilán, la enfermedad encontró condiciones propicias para su desarrollo, tanto de clima como de sistema de cultivo (García, 1993).

En 1970, la roya del café fue reportada en Brasil causando alarma en el continente americano (el cual produce más del 65% del café mundial). Esta enfermedad también ha sido detectada recientemente en: Paraguay, Argentina, Colombia, Ecuador, Venezuela, y otros más de América del sur (Figura 3). Actualmente, la roya es prácticamente endémica en todas las otras regiones del mundo donde se produce café (Vandermeer *et al.*, 2010; Rivillas *et al.*, 2014).

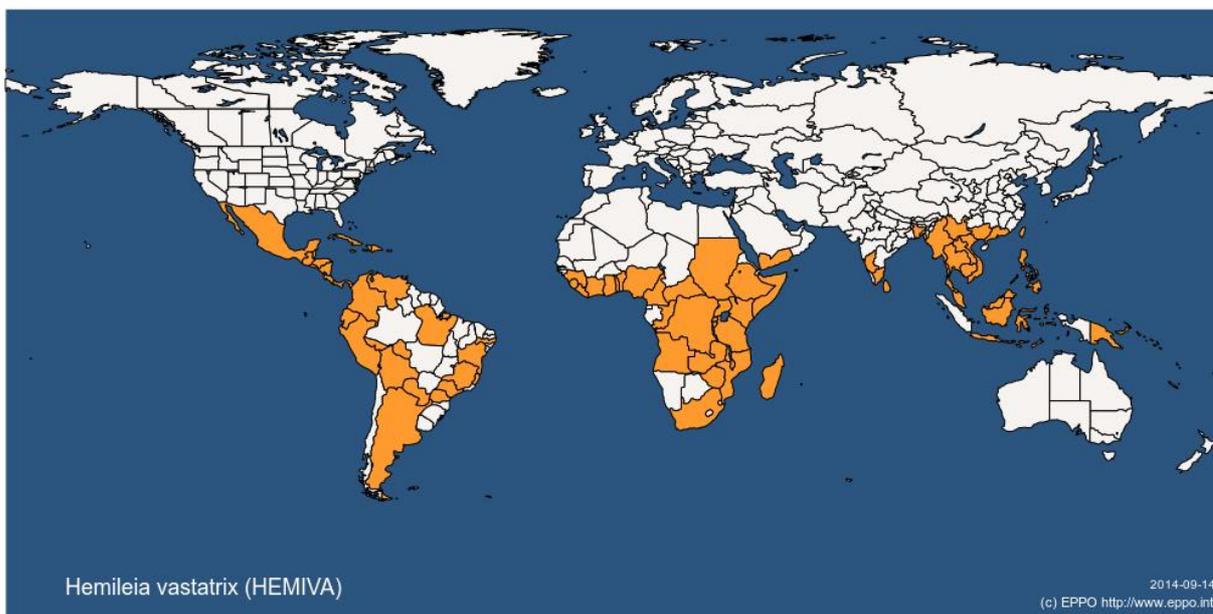


Figura 4 Distribución mundial de *Hemileia vastatrix* (países resaltados en naranja)

Fuente : (EPPO ,2014).

1.6. Distribución de *Hemileia vastatrix* en Ecuador

Ecuador tiene aproximadamente 200 mil hectáreas de plantaciones de café, de las cuales el 55 por ciento fueron afectadas por la roya. Las provincias contempladas en la

emergencia son Loja, Manabí, El Oro, Zamora Chinchipe, Carchi, Pichincha, Santo Domingo de los Tsáchilas, Bolívar e Imbabura (Ministerio de Agricultura, Ganadería, 2013).

Loja, una provincia productora de café, enfrenta el ataque de la plaga de la roya a sus plantaciones. El 80% del café sembrado en Loja, ha sido afectado por la roya. A nivel de la provincia, existe un aproximado de 30.000 hectáreas de café (MAGAP, 2012), de las cuales, el 10% se considera que está en una etapa productiva, de 1 a 10 años de vida, por lo cual han adquirido fácilmente la enfermedad. Pese a que esta plaga ha llegado a toda la provincia, los cantones mayormente afectados han sido: Puyango, Chaguarpamba, Olmedo, Espíndola y Quilanga (Rosillo y Morales, 2013).

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

Entre los hospederos principales se encuentra *Coffea arabigo*, con 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, *Coffea canephora* que produce el café robusta, y el *Coffea liberica* carentes de resistencia genética a la roya (CABI, 2013). 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. arábica* 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).

Se han identificado 6 factores simples y dominantes que condicionan la resistencia de *C. arábica* a *H. vastatrix*. Los factores SH, SH y SH parecen estar únicamente ligados al *C. arábica* (SINAVEF-LAB, 2013). No se ha reportado ningún hospedero alternativo de la roya anaranjada. El hecho que las basidiosporas sí germinen sobre el café pero no logren infectarlo (Cabral *et al.*, 1982) llevó a pensar que el hongo necesitaba de otro hospedero para completar su ciclo, posiblemente una orquídea (Avelino y Rivas, 2014) por lo cual se consideraba que la roya anaranjada era heteroica, pero sin hospedero alternativo conocido.

1.8. Razas de *Hemileia vastatrix* diversidad genética.

Hemileia vastatrix agente causal de la roya anaranjada en las plantas de café, es muy variable fisiológicamente por lo que se han descrito múltiples razas (Cristancho-ardila *et al.*, 2007; Capucho *et al.*, 2012; Garcia, 2012).

A nivel mundial, hay alrededor de 40 razas fisiológicas (etiquetadas por números romanos) para *H. vastatrix* (Capucho *et al.*, 2012); siete razas 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 razas XXII y XXXIV). Dos años más tarde, se registraron cinco nuevas razas del patógeno roya del café en Tanzania (TaCRI, 2009).

De las razas fisiológicas de *Hemileia*, la raza II ha sido la encontrada con mayor frecuencia y la más extendida, le sigue la raza I; las otras razas son de distribución más variada predominando algunas en determinadas localidades (Shigueoka *et al.*, 2014).

Los estudios de evolución e identificación de nuevas razas: tienen gran importancia, ya que no se debe descartar la aparición de razas hipervirulentas que pueden ser devastadoras para un cultivo; el reciente caso de la aparición de la raza ug99 de la roya negra del trigo *Puccinia graminis*, que ha tenido efectos dramáticos en la reducción de la producción del cultivo en África (Wanyera *et al.*, 2006).

Los estudios realizados por Gouveia *et al.*, (2005) demostraron la diversidad genética de las nuevas razas de roya de Colombia, utilizando marcadores moleculares RAPDs, pero no pudieron asociar los patrones de bandas obtenidos con el origen geográfico de las razas, con su espectro de virulencia o con las razas fisiológicas individuales.

Cristancho-Ardila, Escobar-Ochoa, y Ocampo-Muñoz (2007) mencionan la importancia de desarrollar nuevos marcadores moleculares para *H. vastatrix*, que permitan 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).

Debido a la preocupación por el aumento de plantaciones de café con presencia de roya, y con el objetivo de estudiar la diversidad de las razas de roya del café presentes en Ecuador se ensayaron análisis moleculares usando ITS, y sus secuencias se compararon con las obtenidas en otras razas estudiadas en el CENICAFE, determinando así la diversidad genética de la roya en la provincia de Loja.

OBJETIVOS

- **OBJETIVO GENERAL**

Identificar molecularmente morfotipos de *Hemileia vastatrix* causante de la roya del café en la provincia de Loja.

- **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Estandarizar la técnica de PCR para la extracción de ADN de *Hemileia vastatrix* en la provincia de Loja, con la utilización de marcadores espaciadores internos transcritos ITS.

Evaluar la diversidad genética de *Hemileia vastatrix* en los cultivos de café en la provincia de Loja.

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestreo y colecta

Los estudios se realizaron en el sur de Ecuador en la provincia de Loja, en los meses de octubre – diciembre de 2014, la cual posee las siguientes coordenadas geográficas: Latitud 03° 19'56'' y 04° 44'36'' S y Longitud 79° 04'28'' y 80° 29'03'' W, posee un clima variado como resultado de variaciones de altitud y topografía, que originan una serie de microclimas, que van desde el tropical seco. hasta frio húmedo , lo cual permite que sea propicio para la producción de café (Carrión y Jaramillo, 2004).

Para la recolección de muestras se dividieron parcelas de 0,50 ha, seleccionando 30 plantas al azar en donde se recolectaron 10 hojas de 10 plantas infectadas por el hongo, según la metodología propuesta por (Silva - Acuña *et al.*, 1999).

En la selección de las parcelas de muestreo se consideró el criterio de los productores cafetaleros asociados en la Federación Regional de Asociaciones de Pequeños Cafetaleros Ecológicos del Sur (FAPECAFES) e independientes, conjuntamente con la base de datos proporcionadas por AGROCALIDAD.

Empleando la fórmula descrita en el Anexo 1, se calculó un total de 322 muestras, sin embargo debido a la dificultad de acceso y al abandono de los cultivos se tomaron 204 muestras (Tabla 1) de hojas de café infectas por el hongo *H. vastatrix* en la provincia de Loja.

Tabla 1. Número de muestras tomadas por cantón

Provincia de Loja	
Cantón	Número de muestras
Puyango	30
Macará	12
Pindal	10
Celica	12
Olmedo	25
Loja	24
Paltas	10
Sozoranga	10
Calvas	12
Gonzanamá	14
Catamayo	10
Chaguarpamba	10
Quilanga	15
Espíndola	10
Total	204

Fuente: Autora

2.2 Aislamiento

Las muestras de roya utilizadas se seleccionaron previo análisis morfológico como: color de las esporas utilizando el catálogo de la ROYAL HORTICULTURAL SOCIETY, 2011, tamaño de las esporas (ancho x largo), de las 204 muestras, determinándose la existencia de tres morfotipos, los cuales se encuentran descritos por Pardo (2015), a partir de los cuales se seleccionó 60 muestras (Tabla 2).

De la muestras seleccionadas se tomó algunos segmentos frescos de 2 mm x 1 mm aproximadamente, y se insertó en el interior de cajas Petri de 60 x10 mm de diámetro

se utilizaron dos tratamientos de cultivo artificial; Potato Dextrose Agar (PDA 3.6%,Difco) Anexo 2 y Malt Extract Agar (MEA 3.9%, Difco,); estos se incubaron a 25°C en oscuridad por cuatro semanas (Ghini *et al.*, 2011; SENASICA, 2013); los hongos que crecieron en los diferentes puntos de la misma caja se compararon en busca de similitudes morfológicas, hábitos de crecimiento, y análisis molecular de algunas de las muestras que correspondan a *H. vastatrix*,

De igual manera se conservó las muestras tomando discos de hojas de la planta de café que presentaban los síntomas y signos del hongo (Tabla 3), y se los colocó en tubos Eppendorf de 2 ml con 1 gr de sílica gel.

Tabla 2. Número de Muestras seleccionadas de los diferentes morfotipos

M1	32
M2	5
M3	15

Fuente: Autora

2.3. Caracterización molecular

De los discos almacenados previamente con sílica gel, en tubos de 1.5 ml se recogió micelio del hongo para posteriormente realizar la extracción de ADN.

Para extraer el ADN se utilizó el kit Extract-N-Amp Plant PCR anexo 4, haciendo una modificación al protocolo del fabricante, se aplicó a la muestra 10µl del buffer extracción y se incubo a 95°C durante 10 minutos y luego 10µl del buffer dilución proporcionados en el mismo kit.

Para la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), se utilizaron los primers universales ITS1 5´ TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3´ (White *et al.*, 1990) y NL4 5´ GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3´ (White *et al.*, 1990), con la finalidad de amplificar la región ITS y LSU parcial obteniendo un volumen total de 10µl.

Las condiciones de PCR constaron de: una desnaturalización inicial a 94°C por 30 segundos, 30 ciclos, cada ciclo consta de un paso de desnaturalización a 94 °C por 10 segundos, anillamiento de primers a 55°C por 30 segundos, extensión a 72°C por un minuto y 30 segundos y una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR se verificaron por medio de electroforesis (128 V, 200 mA, 20 min) en geles de

agarosa al 1%, a los productos de PCR que tenían el tamaño de banda esperado (aproximadamente 1000 bp). Los productos fueron purificados utilizando el kit Wizard SVClean (PROMEGA) y enviados a secuenciar a Macrogen (Seoul-Korea). Las secuencias obtenidas se editaron mediante el programa Codon Code Aligner, versión 1.2.4 (Codon Code Corp).

2.4. Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas en este estudio se alinearon con las secuencias obtenidas en GenBank utilizando el programa MAFFT v5.667 (Kato *et al.*, 2005) tanto para ITS-5.8S como para 28S. Luego se analizó por el método Maximum likelihood con bootstrap tomando los valores >70, mediante la estrategia G-INS-i. El árbol filogenético presentado en este estudio fue generado en el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011), se analizaron por separado la región ITS y 28S, de igual manera se realizó análisis de correlación de pares de bases, con el fin de saber que tan correlacionadas estaban las secuencias.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Aislamiento

De los 120 ensayos realizados en los diferentes medios (Figura 5) (sesenta muestras por tratamiento) no se obtuvo ningún resultado que diera positivo con *H. vastatrix*, lo cual se podría explicar a su naturaleza como patógeno obligado y hongo biotrófico, por lo cual es difícil tener un cultivo axénico *in vitro*; pese a que ha habido intentos para obtener cultivos axénicos puros (Cabral *et al.*, 1982); estos no han sido muy exitosos, por lo cual el estudio de la roya se ha visto limitado a la infección directa de la planta (Cabral *et al.*, 1982; Fernandes *et al.*, 2009; Capucho *et al.*, 2012). Sin embargo, luego de analizar los aislados molecularmente, se obtuvo resultados positivos para *Colletotrichum acutatum*; si bien otros estudios ya se habían registrado los patógenos *Colletotrichum kahawae*, y *C. acutatum* en café (Prihastuti *et al.*, 2009; Kilambo *et al.*, 2013; Rolz *et al.*, 2013).

En nuestro estudio pudimos observar que *C. acutatum* presenta características de ser hongo endófito, ya que las plantas de café analizadas, ninguna presentaba lesiones características de *C. acutatum*, pero en las zonas donde se desarrollaba *H. vastatrix*, se observó un alto crecimiento de tejido micelar en la zona infectada, así como esporulación sobre la lesión. Es posible entonces que exista un mecanismo diferente al parasitismo en estas dos especies, donde los nutrientes que circulan por los haces vasculares le brindan el alimento necesario para su desarrollo, por lo cual *C. acutatum*, no tiene necesidad de ocasionar ninguna sintomatología de enfermedad.

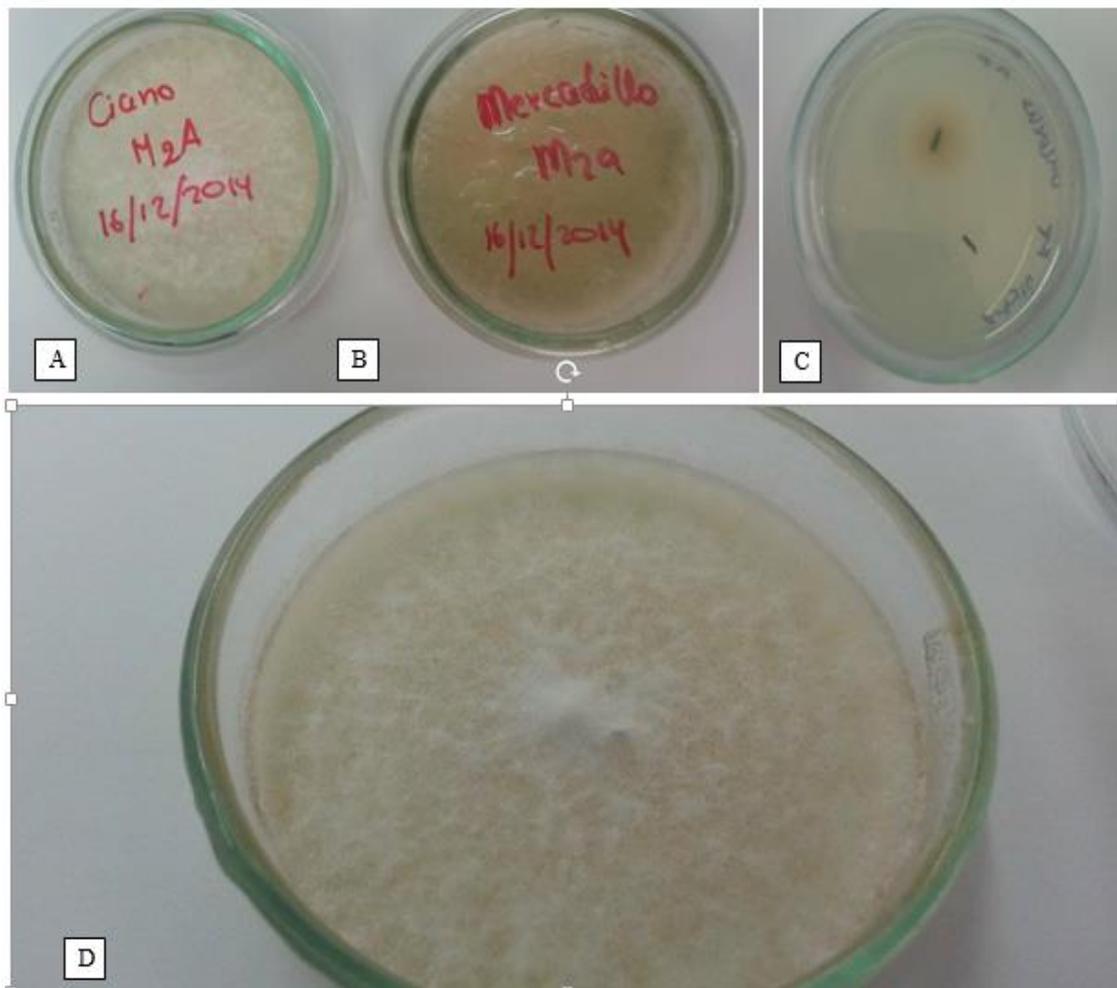


Figura 5. Tratamientos en medios de cultivo PDA y MEA a) Potato Dextrose Agar (PDA 3.6%,Difco) y b) Malt Extract Agar (MEA 3.9%, Difco,) incubados a 25 °C en oscuridad por cuatro semanas, c) y d) *Colletotrichum acutatum* en PDA.

Fuente: Autora

3.2 Caracterización Molecular

La caracterización molecular se realizó en base a la caracterización morfológica realizada por Pardo, 2015 donde se determinó tres morfotipos para la provincia de Loja (Tabla 3).

Tabla 3. Características de los Morfotipos de *Hemileia vastatrix*

Morfotipos	Altitud m s. n. m	Tamaño μm		Color de la Infección
		Largo	Ancho	
Morfotipo 1	1579	36,63	29,75	■
Morfotipo 2	1514	24,63	24,63	■
Morfotipo 3	1740	27	25	■

Fuente: Adaptado de Pardo (2015), trabajo de tesis no publicado

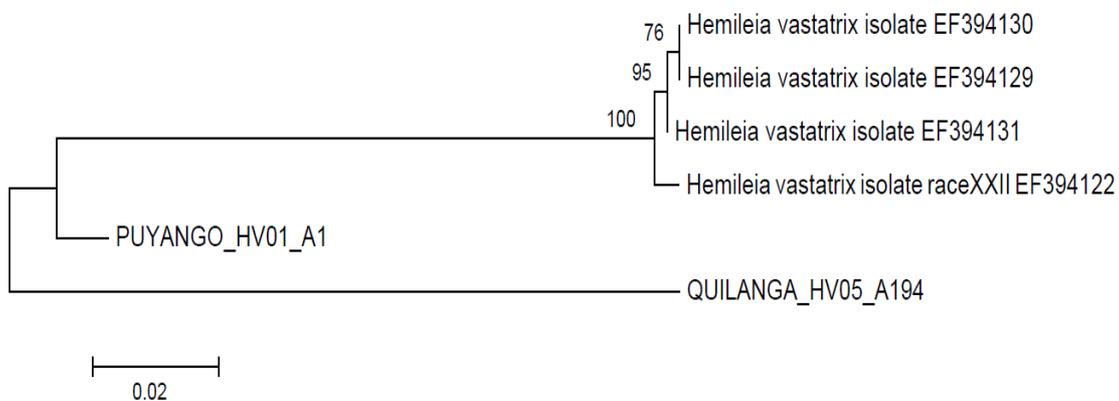


Figura 6. Filograma generado a partir de datos de secuencia de las región ITS de *Hemileia vastatrix*

Fuente: Autora

Hemileia vastatrix

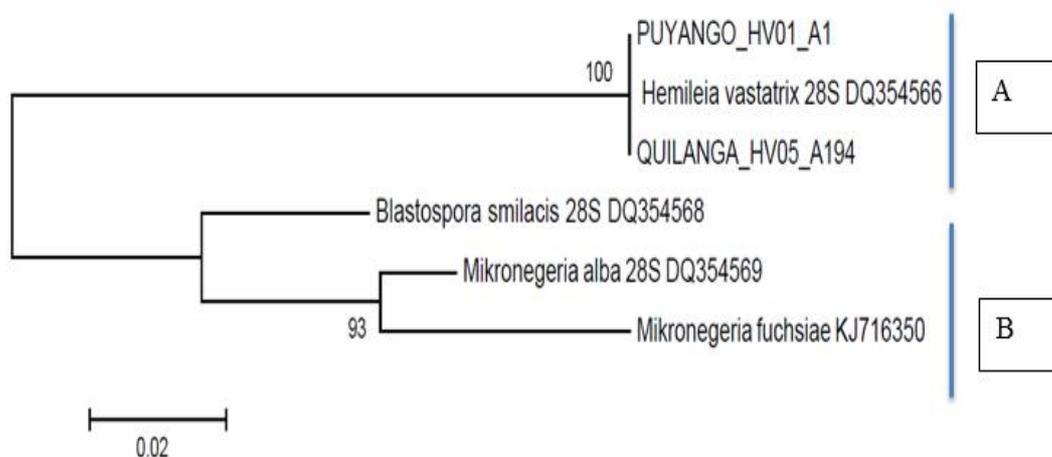


Figura 7.- Filograma generado a partir de datos de secuencia de las región 28S parcial de *Hemileia vastatrix*.

Fuente: Autora

Tabla 4. Morfotipos pertenecientes a diferentes cantones de la provincia de Loja.

Morfotipo	Cantón
Morfotipo II	Pindal
Morfotipo I	Puyango
Morfotipo II	Quilanga

Fuente: Autora

En base a los caracteres morfológicos antes mencionados, se tomaron muestras de micelio directamente de la hoja, obteniendo las secuencias que se incluyeron en los alineamientos desarrollados. De las 23 muestras seleccionadas para secuenciación (anexo 3), solo tres dieron positivo con *H. vastatrix*, las cuales coinciden con los morfotipos I y II del morfotipo III no se pudo obtener secuencias.

Aproximadamente 12 muestras correspondieron a *Coffea arabica* y ocho dieron positivo para *Colletotrichum acutatum* esto se debe a que además de hongos, la región ITS también pueden ser aplicable como un código de barras para otros organismos. Su uso ya se ha mostrado en Chlorophyta y plantas (Buchheim *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011), así como en Oomycota (Robideau *et al.*, 2011); otro factor que pudo influenciar en la amplificación de ADN del patógeno, son los pigmentos vinculantes a ADN u otro metabolito secundario, pudieron haber ocasionado sitios de hibridación del cebador en la plantilla evitando así extensión y amplificación del patógeno (Timonen *et al.*, 1997).

La muestra perteneciente a Pindal, no se tomó en cuenta en la filogenia ya que fue una quimera, las cuales son secuencias artificiales generadas involuntariamente durante la reacción en cadena de la polimerasa, en la que los datos de la secuencia característica son similares con una (o posiblemente más) especies distintas (Nilsson *et al.*, 2010), en nuestro caso esto ocurrió en 100 bp con *Blastospora smilacis*, debido a las grandes similitudes moleculares que presentan por pertenecer al mismo orden (Aime, 2006), donde algunas especies de *Hemileia*; se sospecha que esporulan de manera similar a *B. smilacis*, lo que indica su relación taxonómica; sin embargo, poseen diferencias morfológicas marcadas ya que a diferencia de *Hemileia* cuyas esporas se producen en extremos de células emergentes, las *Blastospora* surgen de protuberancias esporógenas (Hennen *et al.*, 1982; Ono *et al.*, 1986).

En las muestras pertenecientes a Puyango y Quilanga (tabla 4) solo se tuvieron en cuenta los primeros 500-543 pares de bases que incluyen las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 de la secuencia de *H. vastatrix* depositada en el GenBank DQ022191 dando como resultado para la región ITS, un total de 2 genotipos únicos en el análisis de correlación de pares de bases (tabla 5). Estas difieren en un 10% dentro del grupo de 6 secuencias de ITS de *H. vastatrix* analizadas de las cuales ninguna secuencia analizada presentó identidad total con las secuencias de Colombia (Figura 6); sin embargo, en la figura 7, donde se incluyó la región 28S parcial los dos morfotipos obtenidos (tabla 4) fueron idénticos a la misma región ribosomal de *H. vastatrix* depositada en el GenBank (DQ354566), los cuales se agruparon en el grupo A con un valor de 100 % de bootstrap, mientras que en el grupo B se agruparon las muestras correspondientes a la familia *Mikronegeriaceae* con un valor de 93% de bootstrap, obteniéndose como resultado que los dos morfotipos, pertenecen a un mismo genotipo, esto fue apoyado con el análisis de correlación de pares de bases (tabla 7), estas variaciones en los resultados pueden

deberse a que la región ITS pese a que es la región de ADN más ampliamente secuenciada en los hongos; ha sido por lo general más útil para la sistemática molecular a nivel de especie, e incluso dentro de las especies (por ejemplo, para identificar razas geográficas) debido a su alto grado de variación que otras regiones génicas de rDNA (SSU y LSU); sin embargo, se recomienda ampliamente para dar validez a las inferencias filogenéticas la combinación de análisis que combine ITS y LSU, ya que se ha comprobado en diversos estudios (Klaubauf *et al.*, 2010; Stockinger *et al.*, 2010; Robideau *et al.*, 2011) que las diferencias en estas secuencias se correlacionan bien con los conceptos de especies actuales.

Estos resultados indican que la roya del café puede catalogarse como un patógeno con alto potencial evolutivo de acuerdo a la clasificación de McDonald y Linde (2002), dado que tiene un alto potencial de flujo de genes, grandes tamaños efectivos poblacionales y aparentemente una alta tasa de mutación, lo cual permite que los patógenos que presentan estas características tengan además, mayor probabilidad de superar los genes de resistencia de sus hospederos (Cristancho-ardila *et al.*, 2007) esta hipótesis también es sostenida por la existencia de múltiples razas en los cafetales de países productores, (Silva-Acuña *et al.*, 1997; Gouveia *et al.*, 2005; Capucho *et al.*, 2012; Kilambo *et al.*, 2013), sin embargo con los análisis obtenidos en la Figura 7 en nuestro estudio, donde se demuestra la presencia de un solo genotipo pese a las diferencias morfológicas que este presenta (Tabla 3), las cuales desde un principio llevaron a catalogarlo en tres diferentes morfotipos, pueden estar relacionada con las condiciones climáticas, dada por la presencia de variantes altitudinales en la provincia, así como los cambios de temperatura, los cuales se ha comprobado que afectan de manera directa al ciclo biológico del patógeno así como a su potencial de adaptación (Ghini *et al.*, 2011), y por ende la evolución rápida de nuevas razas en pocos años, esto ha sido detectado en royas que atacan otros cultivos como el trigo (Danial *et al.*, 1994), contrario a esto cabe resaltar que dentro de las características biológicas de *H vastatrix*, que podrían explicar su baja diversidad genética estaría la carencia de un huésped alternativo donde se desarrolle su estado sexual, dado que solo se conocen estructuras asexuales como uredosporas y teliosporas. Adicionalmente, la presencia frecuente de áreas sembradas con variedades susceptibles en los diferentes estratos altitudinales, así como la geografía de cada zona, lo cual actúa como presión selectiva sobre la roya del café, que pudiese favorecer la aparición y proliferación de un genotipo virulento, además la ecología y geografía de cada zona actúa a la vez como barrera geográfica y natural haciendo que la introducción de una nueva raza sea más lenta.

Tabla 5. Análisis de correlación de 500-543 pares de bases de las secuencias pertenecientes a la Figura 6 (ITS)

QUILANGA_HV05_A194					
PUYANGO_HV01_A1	10%				
Hemileia_vastatrix_isolate_EF394131	15%	0.8%			
Hemileia_vastatrix_isolate_EF394130	15%	0.8%	0.2%		
Hemileia_vastatrix_isolate_EF394129	15%	0.8%	0.2%	0 %	
Hemileia_vastatrix_isolate_raceXXII_EF394122	0.15%	0.8%	0.6%	0.6%	0.6%

Tabla 6. Análisis de correlación de 600-690 pares de bases de las secuencias pertenecientes a la Figura 6 (28S parcial)

QUILANGA_HV05_A194					
PUYANGO_HV01_A1	0%				
Hemileia_vastatrix_28S_DQ354566	0%	0%			
Blastospora_smilacis_28S_DQ354568	0.8%	0.8%	0.8%		
Mikronegeria_alba_28S_DQ354569	0.9%	0.09	0.9%	0.5%	
Mikronegeria_fuchsiae_KJ716350	10%	10%	10%	0.6%	0.4%

Fuente: Autora

CONCLUSIONES

- Se identificó un solo genotipo de *Hemileia vastatrix* en la provincia de Loja, con diferencias morfológicas, que puede estar influenciada por las condiciones ambientales así como otras variantes como edad del cultivo y nutrientes.
- Se aisló *Collecotricum acutatum*, patógeno causante de enfermedades en plantas, encontrado como hongo endófito, asociado a las lesiones provocadas por *H. vastatrix*.
- La combinación de los primers ITS y LSU, aportan ampliamente dando validez a las inferencias filogenéticas y el posible potencial evolutivo del *H. vastatrix*, correlacionando con los conceptos de especies., que permitan determinar razas geográficas del hongo.
- Para futuras investigaciones el análisis debe llevarse también a nivel del hospedero, con la finalidad de poder tener información completa sobre el sistema de virulencia del hongo y las interacciones con la planta y poder así realizar un manejo adecuado de la enfermedad de la roya.

RECOMENDACIONES

- Complementar los estudios del patógeno *Hemileia vastatrix* con estudios de genes de resistencia del huésped a la virulencia del patógeno.
- Continuar con los estudios moleculares para el análisis poblacional de la roya del café y sus morfotipos a nivel de Ecuador, así como desarrollar diferentes tipos de marcadores moleculares específicos.
- Se recomienda el uso de análisis filogenético que incluya la combinación de ITS y LSU, con el fin de dar mayor fiabilidad a los resultados obtenidos, en especial cuando se analiza morfotipos relacionados a razas geográficas, como fue el caso de *H. vastatrix*.

BIBLIOGRAFÍA

- Aime C. 2006. Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). *Mycoscience* 47: 112–122. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1340354006704119>: [Accessed January 10, 2015].
- Allen E., Eom A., Maynard Z. & Mejía R. 1999. Gallery Sustainable cocoa the fungal community component. A contributed integrated pest management paper.
- Avelino J. & Rivas G. 2014. La Roya Anaranjada del Cafeto. *Hal Archives* 47.
- Becton D. 2012. *Manual of Microbiological Culture Media*. Difco & BBL Manual.
- Buchheim M., Keller A., Koetschan C., Förster F., Merget B., & Wolf M. 2011. Internal transcribed spacer 2 (nu ITS2 rRNA) sequence-structure phylogenetics: towards an automated reconstruction of the green algal tree of life. *PLoS One* 6: 2–10.
- Cabral P.G., Zambolim E.M, Lelis T., Capucho A.S. & Caixeta E.T. 1982. The use of leaf disk inoculations in assessing resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). *Netherlands Journal of Plant Pathology* 88: 127–141. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/BF01977270> [Accessed November 6, 2014].
- Capucho A.S., Zambolim E.M., Freitas R.L., Haddad F., Caixeta E.T., & Zambolim L. 2012. Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica* Catimor derivatives in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes* 7: 189–191. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s13314-012-0081-7> [Accessed November 7, 2014].
- Carrión L. & Jaramillo M. 2004. Distribución, propagación y manejo de Condurango *Marsdenia cundurango* Rchb. en la provincia de Loja. Tesis de grado previa a la obtención del título de Ingeniero Forestal. Universidad Nacional de Loja (UNL).
- Carvalho C.R., Fernandes R.C., Carvalho G.M., Barreto R.W. & Evans H.C. 2011. Cryptosexuality and the genetic diversity paradox in coffee rust, *Hemileia vastatrix*. *PloS one* 6: e26387. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3216932&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 18, 2015].
- Cepero M., Restrepo S. & Franco A. 2012. Generalidades. In *Biología de los Hongos*, 1–5.

- Cristancho-Ardila M.A., Escobar-Ochoa C. & Ocampo-Muñoz J.D. 2007. Evolución de Razas de *Hemileia vastatrix* EN COLOMBIA. CENICAFE 58: 340–359.
- Cummins G. & Hiratsuka Y. 2003. Illustrated genera of rust fungi. American Phytopathological Society 3rd.
- Danial D., Stubbs R.W. & Parlevliet J. 1994. Evolution of virulence patterns in yellow rust races and its implications for breeding for resistance in wheat in Kenya. Euphytica 80: 165–170.
- DEACON J. 2006. Fungal Biology 4th ed. San Diego, EU.
- Doug J., Zemenick K. & Huerta G. 2012. Occurrence in the Soil and dispersal of *Lecanicillium Lecanii*, a fungal pathogen of the green Coffee Scale (*Coccus viridis*) and Coffee Rust (*Hemileia vastatrix*). Tropical and Subtropical Agroecosystems 15: 389–401.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). 2014. World Distribution, *Hemileia vastatrix*. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Available at: <https://gd.eppo.int/taxon/HEMIVA/distribution> [Accessed February 14, 2015].
- Fernandes R., Evans H. & Barreto R. 2009. Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. Tropical Plant Pathology 34: 108–113.
- García E.G. 1993. RESISTENCIA DEL CAFETO A *Hemileia vastatrix*. II. VARIACIONES EN LA CONCENTRACION DE ESTERES FOLIARES. Agronomía Costarricense 17: 95–97.
- García F. 2012. Identificación y Caracterización de Marcadores Moleculares de Introgresión Provenientes de *Coffea Canephora* Pierre Ex Froehner. En Lineas F5 De *Coffea Arabica*.
- Ghini R., Hamada E., Júnior P. & Ribeiro R. 2011. Incubation period of *Hemileia vastatrix* in coffee plants in Brazil simulated under climate change. SUMMA PHYTOPATHOL 37: 85–93.
- Gouveia M., Ribeiro A., & Rodrigues C. 2005. Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. Mycologia 97: 396–404.
- Hennen J., Hennen M., & Figueiredo M. 1982. Indices (Sao, ferrugens (Uredinales) do Brasil. Arch. Inst. Biol. Paulo) 49: 1–201.
- Hiratsuka Y. & Sato S. 1982. Morphology and Taxonomy of Rust Fungi. Morphology and taxonomy of rust fungi C: 1–36.

- Katoh K., Kuma K., H. Miyata. & Toh T. 2005. MAFFT version 5 improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* 3: 511–518.
- Kilambo D.L., Reuben S. & Mamiro D. 2013. Races of *Hemileia vastatrix* and Variation in Pathogenicity of *Colletotrichum kahawae* Isolates to Compact Coffee Genotypes in Tanzania. *Journal of Plant Studies* 2: Available at: <http://www.ccsenet.org/journal/index.php/jps/article/view/27851> [Accessed February 12, 2015].
- Klaubauf S., E. Inselsbacher, W. Zechmeister-Boltenstern, Wanek, R S. Gottsberger Strauss J. & Gorfer M. 2010. Molecular diversity of fungal communities in agricultural soils from Lower Austria. *Fungal Diversity* 44: 65–75.
- Li D., Gao L., Li H., Wang H., Ge X., Liu J. & Chen Z. 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 49.
- MAGAP. 2012. Rendicion-de-cuentas-MAGAP-2012_opt.pdf. 12–40.
- Mcdonald B. & Linde C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40: 349–379.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAGAP). 2013. Plan de reactivación de la producción cafetalera.
- Ono Y., Kakishima M., Kudo A. & Sato S. 1986. Blastospore smilacis a teleomorph of *Caeoma makinoi*, and its sorus development. *Mycologia* 78: 253–262.
- Piepenbring M. 2015. Introducción a los hongos y organismos parecidos a los hongos. In *Introducción a la micología en los trópicos*, 11–12.
- Prihastuti H., Cai L., Chen H., Mckenzie E. & Hyde K. 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Diversity* 39: 89–109.
- Rivillas C., Serna C., Cristancho M. & Gaitán A. 2014. El uso de nombres comerciales en esta publicación tiene como propósito facilitar su identificación y en ningún momento constituye su promoción UNA PUBLICACIÓN DE CENICAFÉ Editor: Diseño Carátula Carmenza Bacca R . Diseño y Diagramación: Fotografía: Imp. Federación Nacional de cafeteros de colombia8–18.

- Robideau G., Decock A., Coffey M., Voglmayr H., Brouwer H., Bala K. & Chitty D. 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Mol Ecol Resour* 6: 1002–11.
- Rolz C., De Leon R. & Paniagua O. 2013. Evidencia de un antagonismo in vitro de especies de *Trichoderma* contra *Hemileia vastatrix* (roya del café). 61–63.
- Romero C., Alvarado A., Cortina G., Ligarreto M., Namer G. & Herrera P. 2009. Partial resistance to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in coffee (*Coffea arabica* L.): genetic analysis and molecular characterization of putative candidate genes. *Molecular Breeding* 25: 685–697. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11032-009-9368-6> [Accessed February 10, 2015].
- ROYAL HORTICULTURAL SOCIETY. 2011. Catálogo de Colores de la Royal Horticultural Society.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural. 2013. Ficha Técnica: Roya del Cafeto *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome. México.
- Saikkonen K., Faeth S., Helander M.L. & Sullivan T.J. 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Rev. Ecol. Syst.* 29: 319–343.
- Salustiano M.E., Pozza E.A., Carlos A., Filho F., Botelho A.O. & Alves E. 2008. Variabilidade Em Dez Populações de *Hemileia Vastatrix* em Relação À Germinação E Ao Comprimento do Tubo Germinativo em Quatro Temperaturas. 1651–1656.
- SENASICA. 2013. Ficha Técnica No. 40 Roya del cafeto *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) 40: 2–23.
- Shigueoka L.H., Sera G.H., Sera T., Cristina I., Fonseca D.B. & Mariucci V. 2014. Selection of Arabic coffee progenies with rust resistance. 88–93.
- Silva – Acuña R., Maffia L., Zambolim L. & Berger R. 1999. Incidence-Severity Relationships in the Pathosystem *Coffea arabica* – *Hemileia vastatrix*. *Plant Dis* 83: 186–188.
- Silva-Acuña R., Zambolim L. & Nieto E. 1997. Identificación de Razas Fisiológicas De La Roya. *Bioagro* 9: 95–98.
- Stockinger H., Krüger M. & Schüssler A. 2010. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytology* 187(2): 461–74.

- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. & Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731–2739.
- Teixeira-Cabral K., Sakiyama N.S., Zambolim L., Pereira A.A., De Barros E.G. & Gomes D. 2004. Characterization of differential coffee tree hosts for *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. with RAPD markers. 68–73.
- Timonen S., Tammi H. & Sen R. 1997. Characterization of the host genotype and fungal diversity in Scots pine ectomycorrhiza from natural humus microcosms using isozyme and PCR-RFLP analyses. *New Phytol* 135: 313–323.
- Tirabanti J., Santos P., Carrión Ó. & Arévalo F. 2013. Impacto económico de *Hemileia vastatrix* en 11 caseríos del ámbito de influencia del proyecto Café , distrito de Alonso de Alvarado , provincia de Lamas , región San Martín Objetivos. Peru.
- Vandermeer J., Perfecto I. & Philpott S. 2010. Ecological Complexity and Pest Control in Organic Coffee Production: Uncovering an Autonomous Ecosystem Service. *BioScience* 60: 527–537. Available at: <http://www.jstor.org/stable/10.1525/bio.2010.60.7.8> [Accessed February 4, 2015].
- White T., Bruns T., Lee S. & Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M. A., Gelfand, Sninsky D. H. & White T. J. (eds), *PCR Protocols: a Guide to Methods and Application*. Academic Press, San Diego 315–322.
- Whittaker R. 1969. New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science* 163: 150–160.
- Zambolim L. 1999. Epidemiologia da ferrugem do cafeeiro. 2–4.



ANEXOS

Anexo 1.

Fórmula para obtener el número de muestras

$$n = \frac{n'}{1 + n'/N}$$

Siendo $n' = \frac{s^2}{\sigma^2}$ sabiendo que

σ^2 = varianza de la población

s^2 =varianza de la muestra

se = error estándar = $u - \bar{X}$ (media poblacional –media muestral)

$$\sigma^2 = se^2$$

$$N = 1654$$

$$se = 0.015$$

$$s^2 = p(1 - p) = 0.9(1 - 0.9) = 0.09$$

$$n = \frac{n'}{1 + \frac{n'}{N}}$$

$$n \frac{400}{1+400/1654} = 322$$

Anexo 2

Composición de Potato Dextrose Agar (PDA)

Compuestos	(g/L)
Almidon de papa	4.0 g
Dextrosa	20.0 g
Agar	15.0 g

Fuente:(Becton, 2012)

Anexo 3

Composición de Malt Extract Agar (MEA)

Compuestos	(g/L)
Maltosa	12.75 g
Dextrina	2.75 g
Glicerol	2.35 g
Peptona	0.78 g
Agar	15.0 g

Fuente: (Becton, 2012)

Anexo 4

Resultados de secuenciación

Código de tubo	Código de muestra	Especie
1	A1	<i>Hemileia vastatrix</i>
2	A44	<i>Hemileia vastatrix</i>
3	A74	<i>Coffea arabica</i>
4	A171	<i>Coffea arabica</i>
5	A194	<i>Hemileia vastatrix</i>
35	A2	<i>Coffea arabica</i>
36	A15	<i>Coffea arabica</i>
37	A41	<i>Coffea arabica</i>
38	A69	<i>Coffea arabica</i>
39	A75	<i>Coffea arabica</i>
40	A164	<i>Coffea arabica</i>
41	A166	<i>Coffea arabica</i>
42	A172	<i>Coffea arabica</i>
43	A176	<i>Colletotrichum acutatum</i>
44	A177	<i>Colletotrichum acutatum</i>
45	A189	<i>Colletotrichum acutatum</i>
46	A197	<i>Colletotrichum acutatum</i>
51	C417	<i>Colletotrichum acutatum</i>

52	C017	<i>Colletotrichum acutatum</i>
53	10C	<i>Colletotrichum acutatum</i>

Fuente: Autora

Anexo 5.

Protocolo del Kit PCR directa Extract-N-Amp Plant PCR

