



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



Estudio de la diversidad genética de la roya (*Hemileia vastatrix* Berk. y Br.) del café (*Coffea arabica*) en la Concordia, Chiapas

TESIS

que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA
TROPICAL

presenta

Fernando Ocaña De la Cruz

Director (a)

Dr. José Alfredo Medina Meléndez

Codirector (a)

Dra. Claudia Guadalupe Torres Calzada

Asesor (a)

Dr. Ramiro Eleazar Ruiz Nájera

Villaflores, Chiapas, México

Agosto, 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
CAMPUS V
DIRECCIÓN



VILLAFLORES, CHIAPAS
18 DE AGOSTO DE 2017
OFICIO N° D/452/17

C. FERNANDO OCAÑA DE LA CRUZ
MAESTRANTE EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
P R E S E N T E.

En atención a que usted ha presentado los votos aprobatorios del Honorable Jurado, designado para su evaluación profesional, de la tesis titulada: **“Estudio de la diversidad genética de la roya (*Hemileia vastatrix* Berk. y Br.) del café (*Coffea arabica*) en la Concordia, Chiapas”**, por este conducto le comunico que se le autoriza la impresión del documento, de acuerdo a los lineamientos vigentes de la Universidad.

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR LA CONCIENCIA DE LA NECESIDAD DE SERVIR”

M. C. ROBERTO REIMUNDO COUTIÑO RUIZ
DIRECTOR



C. c. p. Archivo

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

JESUS OCAÑA RAMIREZ Y JESUS DE LA CRUZ ZARATE

Con cariño, respeto y amor, por el apoyo que me brindaron y valores que me inculcaron durante toda mi formación, por el sacrificio y esfuerzo que realizaron al apoyarme para alcanzar mis objetivos y con ello lograr una etapa más en mi vida y culminar mis estudios para poder recibirme como MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL.

Gracias por depositar su confianza en mí siempre, se los agradeceré por toda la vida, dedicada para ustedes especialmente.

A MIS HERMANOS:

JOSE ANGEL, JUAN CARLOS, JORGE HUMBERTO, AIME Y GABRIELA.

Con mucho aprecio, respeto y amor para todos ustedes que siempre me dieron ánimos de seguir adelante, con sus consejos sabios y prudencia positiva hacia mí, gracias por creer en mí y por nunca dejarme solo en todo momento.

A MI FAMILIA:

En general a cada uno y todos mis tíos, primos, sobrinos quienes siempre estuvieron dando ánimos a seguir luchando por alcanzar mi sueño. Así también a todos mis amigos de la Maestría en Ciencias de la 8va. Promoción de la Universidad Autónoma de Chiapas por contar siempre con ellos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por haberme dado la fuerza y la capacidad para enfrentar la vida y el haber permitido llegar este momento tan importante de mi formación profesional y compartirlo con cada uno de mis seres queridos.

A Mis Padres:

Jesús Ocaña Ramírez y Jesús De la Cruz Zárate

A mi madre, por ser el pilar más importante y darme la vida, por demostrarme con su cariño y apoyo incondicional estuvo al pendiente de mis acciones. A mi padre, que siempre estuvo a mi lado recorriendo cada sendero y luchando junto a mí por llegar a realizar mis sueños.

A los doctores: Dr. José Alfredo Medina Meléndez, la Dra. Claudia Guadalupe Torres Calzada y el Dr. Ramiro Ruiz Nájera, por haberme apoyado en la elaboración de la tesis y por sus consejos sabios, por la dedicación que le pusieron al apoyarme al trabajo de investigación, así como apoyarme en todos momentos de manera prudente y de forma precisa en lo académico.

.
Al Comité Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), gracias a su apoyo que con la ayuda de la beca obtuve la permanencia y la facilidad de poder concluir la Maestría en Producción Agropecuaria Tropical perteneciente al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) posgrado en investigación.

Al Centro de Investigación y Trasferencia de Tecnología del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ) Unidad Sureste que me apoyaron con el financiamiento para la realización del proyecto de investigación y llegar a una culminación en tiempo el trabajo.

A la Sociedad de Productores de la Organización RAMAL SANTA CRUZ, del municipio de La Concordia, que gracias a su colaboración ardua y voluntaria contribuyeron para la realización del trabajo de investigación.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
CAMPUS V**



Esta tesis titulada ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA ROYA (*Hemileia vastatrix* BERK. & BR.) DEL CAFÉ (*Coffea arabica* L.) EN LA CONCORDIA, CHIAPAS, forma parte del proyecto Aumentando la competitividad del cultivo de café en la Región Pacífico Sur (ADESUR): El caso Chiapas, registrado en la Coordinación de Investigación Y Posgrado de la Facultad de Ciencias Agronómicas, financiado por el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Unidad Sureste (CIATEJ) Bajo la dirección de la Dra. Claudia Guadalupe Torres Calzada.

Se incluye en la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: Estudio del sistema de producción del café, del Cuerpo Académico Sistemas Integrales de Producción.

Se incluye en la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: Tecnología e innovación en los sistemas tradicionales y alternativos de producción sustentable del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agropecuaria Tropical.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
CAMPUS V**



Esta tesis titulada ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA ROYA (*Hemileia vastatrix* BERK. & BR.) DEL CAFÉ (*Coffea arabica*) EN LA CONCORDIA, CHIAPAS, fue realizada por el Ing. FERNANDO OCAÑA DE LA CRUZ, bajo la dirección y asesoría del Comité Tutorial indicado, como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

DR. JOSÉ ALFREDO MEDINA MELÉNDEZ

CODIRECTORA

DRA. CLAUDIA GUADALUPE TORRES CALZADA
(CIATEJ-SURESTE)

ASESOR

DR. RAMIRO ELEAZAR RUIZ NÁJERA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
CAMPUS V



Esta tesis titulada ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA ROYA (*Hemileia vastatrix* BERK. & BR.) DEL CAFÉ (*Coffea arabica*) EN LA CONCORDIA, CHIAPAS, realizada por el Ing. FERNANDO OCAÑA DE LA CRUZ, ha sido aprobada por la Comisión Revisora indicada, como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL.

COMISIÓN REVISORA

DR. JOSÉ ALFREDO MEDINA MELÉNDEZ

DRA. CLAUDIA G. TORRES CALZADA
(CIATEJ-SURESTE)

DR. RAMIRO ELEAZAR RUIZ NÁJERA

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivos.....	3
1.1.1 Objetivo general	3
1.1.2 Objetivos específicos.....	3
1.2 Justificación.....	4
1.3 Hipótesis de investigación.....	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1 Generalidades del cultivo del café.....	6
2.2 Descripción de <i>Coffea arabica</i> Linneo.....	6
2.3 Distribución del cultivo del café en México.....	8
2.4 Situación fitosanitaria.....	9
2.4.1 Plagas y enfermedades del cafeto.....	11
2.5 Roya del café en el mundo y México.....	13
2.6 Descripción biológica de la roya.....	15
2.6.1 Morfología de la roya.....	16
2.6.2 Proceso de infección	16
2.6.3 Dispersión.....	18
2.6.4. Multiplicación.....	19
2.6.5 Síntomas y Daños.....	19
2.6.6 Sobrevivencia.....	20

2.7 Producción de café en México.....	21
2.8 Aspectos económicos	26
2.9 Investigaciones realizadas en roya.....	27
2.10 Control químico.....	29
2.10.1 Fungicidas de contacto.....	30
2.10.2 Fungicidas sistémicos.....	30
2.11 Control biológico.....	31
2.12 Control genético.....	32
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
3.1 Localización del área de estudio.....	34
3.2 Variables de estudio	34
3.3 Criterios de selección de las parcelas.....	35
3.4 Metodología de la colecta de hojas.....	35
3.5 Evaluación de severidad.....	36
3.6 Análisis estadístico de daños.....	38
3.7 Técnicas para identificación y caracterización del patógeno.....	39
3.7.1 Colecta de uredias.....	39
3.7.2 Extracción de ADN de <i>H. vastatrix</i>	39
3.7.3 Proceso de secuenciación.....	40
3.7.4 Utilización de los marcadores moleculares ISSR.....	40
3.7.5 Análisis clusters.....	41

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
4.1 Daños por roya en el café.....	42
4.2 Análisis estadístico de daños en hojas y plantas.....	45
4.3 Identificación molecular de <i>H. vastatrix</i>	50
4.4 Caracterización genética de <i>H. vastatrix</i>	50
4.5 Análisis de diversidad genética.....	52
4.5.1 Análisis de similaridad o tipificación.....	56
5. Conclusión.....	58
6. Literatura citada.....	59

Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación de <i>Coffea arábica</i> L.....	6
Cuadro 2. Listado del inventario por tipo de plaga y enfermedades.....	10
Cuadro 3. Clasificación taxonómica de <i>Hemileia vastatrix</i>	16
Cuadro 4. Superficie sembrada por estados en México.....	22
Cuadro 5. Producción de café por estados.....	23
Cuadro 6. Superficie sembrada por distritos en Chiapas.....	24
Cuadro 7. Superficie ha. por región económica.....	24
Cuadro 8 Producción de café por distritos en Chiapas.....	25
Cuadro 9. Superficie sembrada en el Distrito de Villaflores.....	26
Cuadro 10. Producción de café por municipio del distrito Villaflores.....	26
Cuadro 11. Fungicidas para aplicación del control de la roya del café.....	31
Cuadro 12. Escala de severidad para evaluar daños en plantas.....	37
Cuadro 13. Escala de severidad para evaluar daños en hoja	37
Cuadro 14. Evaluación de daños en hojas de café bourbon y caturra	42
Cuadro 15. Análisis de varianza del daño en hojas en bourbon.....	46
Cuadro 16. Análisis de varianza del daño en hojas en caturra.....	47
Cuadro 17. Análisis de varianza de daño en plantas entre altitudes.....	48
Cuadro 18. Análisis de varianza de daño en plantas en dos variedades.....	49
Cuadro 19. Comparación de la secuencia B41-ITS 1.....	52

Cuadro 20. Comparación de la secuencia B41-ITS 4.....	52
Cuadro 21. Índice de similitud de los aislamientos.....	57

Índice de figuras

Figura 1. Principales zonas productoras de café (<i>Coffea spp</i>) en México.....	8
Figura 2. Número de productores por estados de café	9
Figura 3. Distribución de la roya del café.....	14
Figura 4. Uredospora de <i>H. vastatrix</i>	16
Figura 5. Ciclo biológico (patogénesis) de la roya del cafeto	18
Figura 6. Síntomas de roya en hojas de café	20
Figura 7. Ubicación de parcelas cafetaleras en La Concordia.....	34
Figura 8. Método de Muestreo “T”	36
Figura 9. Determinación del porcentaje de daño según el dosel de la planta.....	37
Figura 10. Determinación del porcentaje de infección de hojas dañadas.	38
Figura 11. Programa de amplificación para el iniciador GTG ₅	41
Figura 12. Programa de amplificación para el iniciador CAG ₅	41
Figura 13. Daños de la roya del café en las hojas de Bourbon y Caturra.....	43
Figura 14. Plantas de la variedad bourbon con defoliación	44
Figura 15. Plantas de la variedad caturra con defoliación.....	44
Figura 16. Temperaturas promedio mensuales (diciembre 2015 a abril 2016).....	45
Figura 17. Desviación estándar de daños en hojas de Bourbon y Caturra	48
Figura 18. Alineamiento de la Secuencia B41-ITS1	51
Figura 19. Alineamiento de la Secuencia B41-ITS4.....	51
Figura 20. Huellas de ADN de <i>Hemileia vastatrix</i> con el iniciador CAG ₅	54
Figura 21. Huellas de ADN de <i>Hemileia vastatrix</i> con el iniciador GTG ₅	55
Figura 22. Dendrograma de diversidad de <i>H. vastatrix</i> (CAG) ₅ y (GTG) ₅	56

RESUMEN

México es uno de los principales productores de café a nivel mundial, el estado de Chiapas ocupa el primer lugar en producción nacional de café convencional y orgánico. Debido a la fuerte presencia de la roya anaranjada en las plantaciones de café, éstas han sido afectadas en su rendimiento y calidad del fruto, lo cual se refleja en pérdidas económicas. Gracias al avance en la biología molecular, se han desarrollado métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores moleculares, que se definen como cualquier molécula de proteína, ARN o ADN con una ubicación identificable que se puede rastrear, y se utiliza para diferenciar individuos. En este estudio utilizaron los marcadores moleculares ISSR, con el objetivo de caracterizar aislamientos de roya de café (*Hemileia vastatrix* Berk. y Br.), colectados en plantaciones de cafeto de las variedades bourbon y caturra en sistemas de producción orgánico. Las muestras de ADN se obtuvieron mediante el protocolo de extracción reportado por Tapia-Tusell *et al.*, (2006), los iniciadores GTG₅ y CAG₅ fueron útiles para diferenciar genéticamente los aislamientos bajo estudio, por lo que se demuestra la diversidad genética de esta especie.

Palabras claves: *Coffea arabica*, roya anaranjada, diversidad genética.

1. INTRODUCCIÓN

México es uno de los principales productores de café a nivel mundial, ocupa el 7º lugar, detrás de Brasil, Vietnam, Colombia, Indonesia, Etiopía e India y contribuye con el 2.6 % del total producido en el mundo. En México se producen 4 millones de sacos de café, de los cuales el 70 % se exporta a más de 35 países, entre los cuales destacan Estados Unidos, Alemania y Bélgica. Además es el tercer país en producción de café arábica, después de Brasil y Colombia, y es el líder mundial en la producción de café orgánico certificado, que por su calidad y proceso de cosecha es uno de los más cotizados en el mercado mundial. (OIC, 2009; Barrera *et al.*, 2004).

El cultivo del café en México es considerado importante por el número de divisas que genera, ya que la mayor parte de la producción es destinada al comercio exterior. La superficie sembrada representa más del 3% de la superficie agrícola del país, y se distribuye en 15 estados agrupados en cuatro regiones cafetaleras: la Vertiente del Golfo, la Vertiente del Pacífico, la zona Centro-Norte de Chiapas y la Región Soconusco en Chiapas. El 80 % del volumen de café cereza se produce en los estados de Chiapas, Veracruz, Oaxaca y Puebla (SIAP, 2015), donde el estado de Chiapas ocupa el primer lugar en producción nacional de café convencional y orgánico el cual es producido en su mayoría por agricultores indígenas. Actualmente, la cafecultura en México se ve afectada por diversos problemas entre los que destaca la diversificación de las zonas cafetaleras, donde los procesos de deforestación y cambio de uso de suelo están presentes, generando que el ecosistema se vuelva vulnerable a fenómenos tales como la erosión, la pérdida de nutrientes, la presencia de plagas y enfermedades, entre otros (CEFP, 2001).

Las plagas y enfermedades son consideradas como la segunda amenaza más importante de la biodiversidad, representan un gasto extra en el proceso de producción del café, que se ve afectado por más de 900 de ellas. Las plagas más comunes en este cultivo son, por mencionar algunas: la broca de café (*Hypothenemus hampei*), el chacuatete (*Idiarthron subquadratum*) y los pulgones

(*Toxoptera aurantii*), entre otras. Por otra parte, entre las enfermedades que dañan comúnmente podemos mencionar a: la roya del café (*Hemileia vastatrix*), el mal de hilachas (*Corticium koleroga*), la mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*) y la antracnosis (*Colletotrichum coffeanum*). Por los daños severos que causa, la roya del café es la enfermedad más importante ya que ocasiona pérdidas económicas, debido a la defoliación que provoca en las plantas, lo cual disminuye la capacidad fotosintética y reduce el rendimiento del cultivo.

Desde el año 2012, la presencia de la roya en los cafetales de Chiapas ha ido en aumento, lo cual ha afectado el rendimiento de las cosechas posteriores, así como la calidad del fruto, ocasionando cuantiosas pérdidas económicas. Por lo que es necesario buscar soluciones para controlar o erradicar la enfermedad y mejorar la producción en los cultivos del café. Se requiere conocer al patógeno, lo cual puede hacerse mediante el empleo de técnicas moleculares que permitan su caracterización. Recientemente investigaciones realizadas en diferentes lugares del mundo sobre la roya del café, han permitido conocer la caracterización de las razas fisiológicas de *H. vastatrix* (Cabral *et al.*, 2009), la diversidad genética del patógeno, con el uso de marcadores moleculares RAPD (Gouveia *et al.* 2005; Nunes *et al.*, 2009), RFLP (Cabral *et al.*, 2015), y la aplicación de marcadores AFLP para evaluar su variabilidad molecular (Rozo *et al.*, 2012). Sin embargo, en México aún no se han realizado estudios sobre diversidad genética, morfológica o fisiológica del patógeno, y poco se sabe acerca de los factores que intervienen su desarrollo.

1.1 Objetivos

1.1.1 objetivo general

Determinar los daños en el follaje, así como la diversidad genética de la roya del café (*Hemileia vastatrix*) en las variedades bourbon y caturra utilizando marcadores moleculares ISSR.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Determinar el índice de severidad sobre el follaje en tres estratos de la planta en las variedades de café bourbon y caturra.
- b) Determinar la diversidad genética de *H. vastatrix* mediante la utilización de marcadores moleculares ISSR

1.2 Justificación

Las problemáticas a las que se enfrenta la mayoría de los cafeticultores son múltiples y variadas. Estas inician en que la mayoría de los predios tienen una topografía accidentada y se encuentran ubicadas en zonas con escasa infraestructura. La agricultura convencional acostumbró al cafeticultor al empleo de agroquímicos (fertilizantes y controladores de plagas y enfermedades) cuyos costos son demasiados elevados, por esta razón, los cafeticultores han optado en la cafecultura orgánica, ya que al no contar con los recursos económicos para adquirir dichos agroquímicos necesarios, solo se dedican a cosechar lo que el arbusto produce.

La cafecultura orgánica que se realiza sin planeación, a la sombra de árboles de crecimiento natural útiles para obtener energía (leña). Predios con cafetos viejos y susceptibles a plagas (broca del café, la más importante) y enfermedades (roya naranja también la más importante actualmente). Donde se desconoce el grado de daño y la distribución e importancia de las mismas, aun no se han realizado estudios sobre evaluaciones integrales del cultivo.

De acuerdo a los problemas que se presentan en el cafeto a casusa de plagas y enfermedades, se ha desarrollado la investigación (Estudio de la diversidad genética de la roya (*Hemileia vastatrix* BERK. & BR.) del café (*Coffea arabica*) en la Concordia, Chiapas) en plantas de las variedades Bourbon y Caturra, para conocer genéticamente al patógeno así como su comportamiento en tres altitudes (800, 1200 y 1600 msnm), las variedades Bourbon y Caturra se encuentran entre las variedades que mejor calidad de café en tasa tienen y prefieren los mercados internacionales, sin embargo, son muy susceptibles al ataque de la enfermedad.

1.3 Hipótesis de investigación

La diversidad genética de *Hemileia vastatrix* es diferente para cada variedad de café sembradas a una misma altitud.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del cultivo de café

El café es originario de las regiones tropicales y subtropicales de África (Berthaud *et al.*, 1988), es uno de los principales cultivos en el mundo, se produce en alrededor de 80 países (Pearl *et al.*, 2004), pertenece al género *Coffea* dentro de la familia de las Rubiáceas (Cuadro 1). A pesar de la importancia que representa, de las 126 especies descritas (Davis *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2008), tan sólo dos son las especies explotadas comercialmente y de impacto económico, *Coffea arabica* L (arabica) y *Coffea canephora* Pierre (robusta) (Berthaud *et al.*, 1988; Herrera *et al.*, 2002). La especie *C. arabica* comprende a los genotipos Caturra, Típica, Bourbon, Catuai y Mundo Novo siendo las más cultivadas con un 70% del mercado mundial; mientras que el 30 % de producción restante corresponde a la especie *C. canephora* formada por diferentes genotipos de Robusta (Herrera *et al.*, 2002).

Cuadro 1. Clasificación de *Coffea arabica* L

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Gentianales
Familia:	Rubiaceae
Subfamilia:	Ixoroideae
Género:	<i>Coffea</i>
Especie:	<i>arabica</i> L.

Fuente: Monroig, 2010.

2.2 Descripción de *Coffea arabica* Linneo (café arábigo)

El cafeto es un arbusto perennifolio que puede llegar a medir hasta 6 m de altura, de forma cónica o irregular, desarrolla un solo eje bajo condiciones normales de crecimiento (Costa Rica, 1984). Puede crecer con una sola raíz, pero después

desarrolla raíces múltiples en la raíz principal, las ramificaciones laterales son las responsables de la nutrición mineral y de proveer a la planta de agua. La mayoría de las raíces se distribuyen a 30 cm de profundidad y en un radio de 2.5 m del tronco (Costa Rica, 1989).

Las hojas son elípticas oblongadas, lanceoladas, miden de 7 a 17 cm de largo y de 3 a 8 cm de ancho, de color verde oscuro, brillante en el haz, cerosas y coriáceas, con un verde más pálido y menos brillante en el envés, con nervadura central prominente y márgenes de ondulaciones diversas (Morfin *et al.*, 2006; Liogier, 1997).

Las flores se agrupan en inflorescencia llamada cima, normalmente se presentan de tres cimas por axila y cuatro flores por cima, es decir, 12 flores por axila. Las flores individuales son completas, hermafroditas y autógamas, presentan cáliz, corola, estambres y pistilo, son de color blanco y miden de 6 a 12 mm de largo y de 3 a 4 mm de ancho, tienen un ovario ínfero con dos óvulos (Morfin *et al.*, 2006).

El fruto es una drupa ovoide conocida como cereza, mide de 10 a 17 mm de largo y de 8 a 14 mm de ancho, consta de epicarpio, mesocarpio o pulpa, endocarpio y endospermo o semilla, es color verde (estado inmaduro), para convertirse de rojo a amarillo cuando madura (Morfin *et al.*, 2006).

Las semillas de café son oblongas, planoconvexas, cubiertas por una película lateada (vestigio del tegumento del ovulo). Están constituidas por un endospermo de color verde oscuro amarillento, mide de 10 a 15 mm de largo y de 5 a 10 mm de ancho, está formado por hemicelulosa, proteínas, cafeína, aceite, azúcares, dextrina, celulosa, ácido clorogénico y otros compuestos, además contiene un embrión basal de 1 a 2 mm, un endocarpio fibroso (pergamino). El cultivo del café alcanza su madurez fisiológica a los 220 días, además carece de periodo de latencia y es capaz de germinar inmediatamente (Morfin *et al.*, 2006).

Las variedades más representativas del café arábica son Típica, Bourbon, Caturra, Mundo Novo, Garnica y Catuai; cada una de ellas presenta diferencias en base a la calidad, el volumen que producen, los rendimientos, la resistencia a

plagas y enfermedades, el aroma, la acidez, el cuerpo, entre otros. (CEFP, 2001: Nolasco, 1985; Pérez, 2005).

2.3 Distribución del cultivo del café en México

El café se cultiva en 15 estados de la república mexicana (Figura 1), distribuido en cuatro regiones: la Vertiente del Golfo que comprende los estados de Hidalgo, México, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Veracruz; la Vertiente del Pacífico, conformada por los estados de Colima, Guerrero, Jalisco, Morelos, Michoacán, Nayarit y Oaxaca; la zona Centro-Norte de Chiapas y la Región Soconusco en el estado de Chiapas. El 80 % de la superficie cultivada se encuentra ubicada en los estados de Chiapas, Veracruz, Oaxaca y Puebla (SIAP, 2015). El estado de Chiapas, encabeza la producción nacional tanto de café convencional, como de café orgánico el cual es muy demandado en los mercados norteamericanos y europeos (SIAP, 2014).

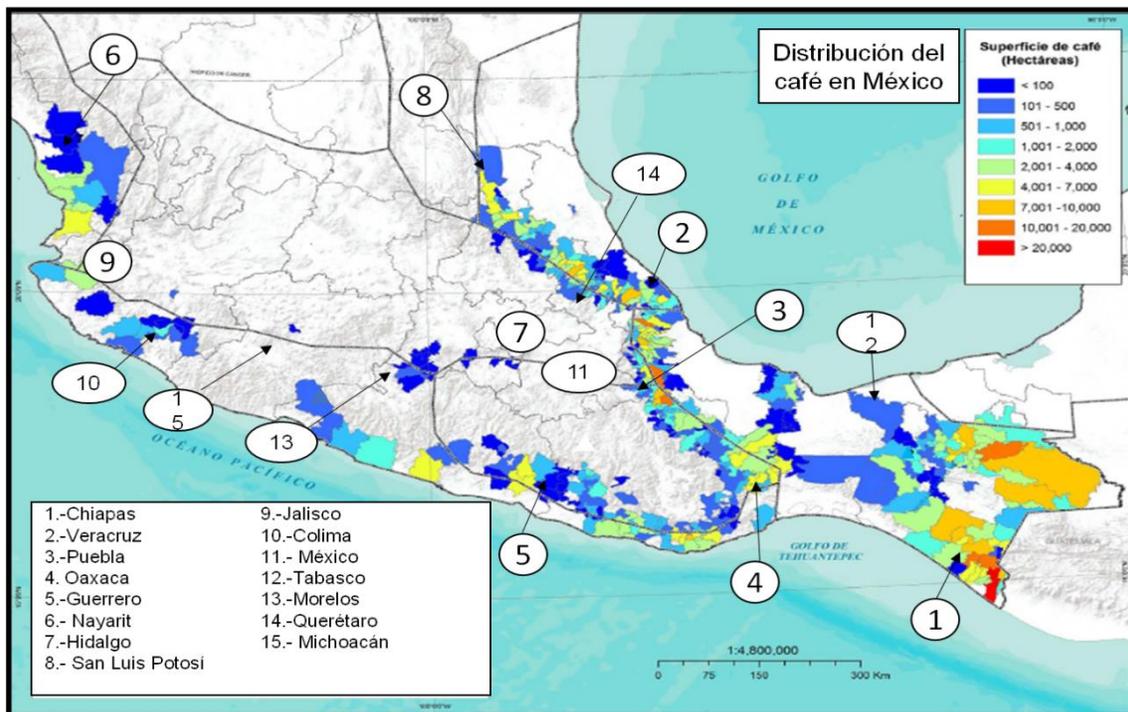


Figura 1. Principales zonas productoras de café (*Coffea spp*) en México. Tomado de SIAP, 2013.

Con base en el registro del Padrón Nacional Cafetalero (PNC), el 97 % del café que se cultiva en México corresponde a la especie *C. arabica* y el 3% a la especie *C. canephora*, en una superficie de 697 mil 366 hectáreas donde se emplean 511,669 productores, la mayoría indígenas. La producción anual de café en el año 2015 fue de 3.6 a 4 millones de sacos más el volumen exportable (SIAP, 2015). De esto, 35 mil 374 sacos se produjeron en el estado de Chiapas, en un área cultivada de 253 mil hectáreas (Figura 2), para lo cual se emplearon a 180 mil productores (SIAP, 2015).

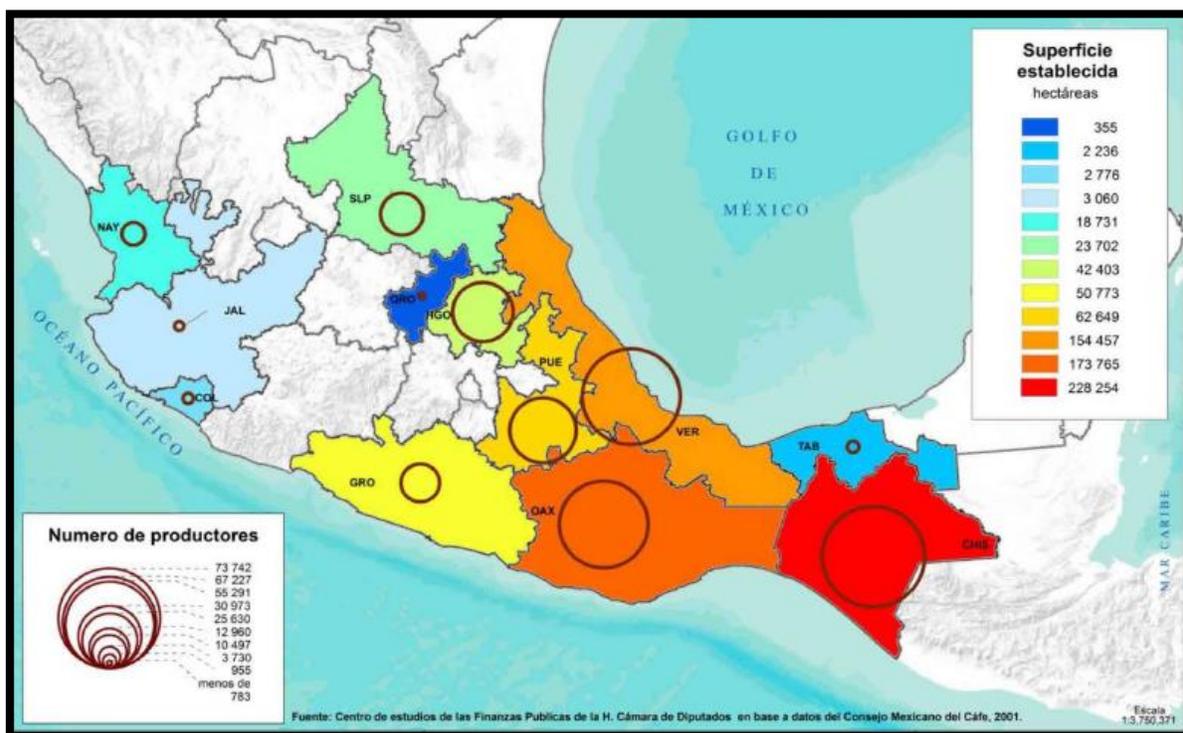


Figura 2. Número de productores por estados de café. Tomado de SINAVEF, 2013.

2.4 Situación fitosanitaria

En el ámbito de la sanidad vegetal, las plagas y enfermedades se definen como los organismos, ya sea insectos, patógenos o malezas, que interfieren con las actividades y propósitos de los humanos, y se encuentran entre los factores limitantes más importantes de la productividad de los sistemas agroforestales y pecuarios ya que son responsables del 37 al 50% de las pérdidas reportadas en la

agricultura mundial (Pimentel *et al.*, 1991; Sweetmore *et al.*, 2001; Oerke, 2005; Barrera, 2007). Las plagas y enfermedades pasan de ser un fenómeno aislado, a ser vistos como partes del sistema, ya que los daños que ocasionan pueden ser económicos (pérdida de la productividad y de los ingresos e inversiones) y físicos (mediante el uso de pesticidas) (Galindo *et al.*, 2008).

Bajo el constante y dinámico intercambio comercial de los productos a nivel internacional, es necesario determinar las plagas y enfermedades involucradas en la importación de productos agrícolas, así como fortalecer la protección del país mediante acciones de inspección, certificación, vigilancia y prever medidas fitosanitarias emergentes en caso de detección de alguna plaga o enfermedad. La Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF), se encarga de establecer las medidas de protección del país, ya que cuenta con un inventario de plagas y enfermedades (SINAVEF, 2010).

En el caso de México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria creó un inventario nacional de plagas y enfermedades, entre las que reporta 1163 plagas y enfermedades reglamentadas, donde el 29.8% son hongos, 29.2% insectos, 13.6% Virus, 9.4% bacterias y 18% restante se encuentra dividido entre Malezas, Nemátodos, Ácaros, Fitoplasmas, Viroides y demás (Cuadro 2).

Cuadro 2. Listado del inventario por tipo de plaga y enfermedades.

Grupo común	N° de plagas y enfermedades
Hongos	347
Insectos	340
Virus	159
Bacterias	110
Malezas	89
Nematodos	42
Ácaros	27
Fitoplasmas	23
Viroides	10
Sin clasificar	9
Moluscos	3
Mamíferos	3
Algas	1

Fuente: Tomado de SINAVEF, 2010.

De acuerdo con la Norma Internacional para Medidas Fitosanitarias (NIMF) n° 19 de la CIPF, la lista de plagas se organiza en:

- Plagas y enfermedades cuarentenarias no presentes: son las plagas o enfermedades de importancia económica potencial para el área en peligro, aun cuando la plaga no esté presente.
- Plagas y enfermedades cuarentenarias presentes: las plagas o enfermedades de importancia económica, que si existen, no están extendidas y se encuentran bajo control oficial.
- Plagas y enfermedades no cuarentenarias reglamentadas: las plagas y enfermedades no cuarentenarias cuya presencia en las plantas para que se utilicen (plantar), afecta el uso destinado con repercusiones económicamente inaceptables y que, por lo tanto, están reglamentadas en el territorio de la parte importadora (FAO, 2009).

Además se integran dos categorías más (sólo para el país) establecidas por Hojas de Referencia Fitosanitaria (HRF) o por Normas Oficiales Mexicanas (NOM's):

- Plagas y enfermedades de importancia económica sujetas a control oficial: estas no tienen cuarentena exterior y en la mayoría de los casos, no tienen implicaciones en los productos que se exportan.
- Plagas y enfermedades cuarentenarias presentes que no están sujetas a control oficial: Estas plagas y enfermedades tienen cuarentena exterior, pero no existe ningún programa de control oficial.

2.4.1 Plagas y enfermedades del café

En los países productores de café se han reportado más de 900 plagas y enfermedades presentes en el cultivo, de las cuales el 90% son insectos y el 10 % enfermedades que dañan diferentes órganos de la planta, como son la raíz, el tallo, las ramas, las hojas y el fruto durante las diferentes etapas de su desarrollo (CABI, 2010).

De las plagas que causan daños al cultivo del café se encuentran la broca del café (*Hypothenemus hampei*), que daña los frutos verdes, maduros y secos, provocándoles un agujero en la parte apical y daña los granos en el fruto (Barrera, 2002); el chacuatete (*Idiarthron subquadratum*), que provoca lesiones irregulares sobre los bordes de las hojas, brotes, cogollos y puntas de las ramas y en el fruto en estado verde e inmaduro lo descubre dejando los granos del café expuesto (Barrera, 2002); el taladrador de la rama del robusta (*Xylosandrus morigerus*), forma agujeros 1.0 mm, en las ramillas y los brotes atacados se tornan amarillentos, posterior a esto se secan hacia la punta y mueren, quebrándose fácilmente (Barrera, 2002); el barrenador del tallo (*Plagiohammus maculosus*), esta plaga afecta los cafetos en la base del tallo al nivel del suelo, se observa aserrín blanco o amarillento como consecuencia de la galería que hace la larva del barrenador en el interior del tallo o la raíz (Barrera *et al.*, 2004); el minador de la hoja (*Leucoptera coffeella*), provoca daños por las minas producidas por las larvas en las hojas, las cuales son verdes claras y posteriormente se tornan marrón claro o negruzco, debilitan la planta mediante la caída de las hojas, decae la acción fotosintética lo que influye directamente en la producción del café (Enríquez *et al.*, 1975).

Entre las enfermedades que dañan al cafeto se encuentra la roya del café (*Hemileia vastatrix*) causando daños severos como defoliación, reduciendo la capacidad fotosintética, y debilitando los arbustos, que en infecciones severas puede ocasionar muerte en ramas e incluso la muerte de los árboles (APS, 2011); la mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*) que son manchas foliares de color café en las hojas y también afecta las cerezas verdes (SENASICA, 2014), el mal de hilachas o chamusco (*Corticium koleroga*), provoca hojas secas y la muerte de éstas manifestándose mediante el colgando de las hojas en las ramas (SENASICA, 2014); el ojo de gallo (*Mycena citricolor*) que forma machas en tallos, hojas y frutos; la antracnosis (*Colletotricum coffeanum*), causa defoliación con condiciones favorables presentes y afecta las cerezas maduras; así también la presencia de los nematodos (*Meloidogyne spp*) que afecta la raíz de forma agresiva ocasionando engrosamiento y disminuye la presencia de raíces laterales

(Campos *et al.* 1990); también se encuentran algunos hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (FAO, 2011).

Entre las plagas y enfermedades que afectan al cultivo del café ocasionando pérdidas económicas, las más destacadas son la broca del fruto café, y la roya del café, la cual se encuentra dispersa en todas las regiones cafetaleras del mundo y ocasiona pérdidas entre el 10 y 40 % (Silvia *et al.*, 2006). Además la roya es una enfermedad reglamentada por la NOM-019-FITO-1996 y en febrero del 2013 se incluyó en el Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (PVEF) (SENASICA, 2013), señalando que se brindará atención a los estados de Chiapas, Veracruz, Puebla y Oaxaca (FAO, 2013).

2.5 Roya del café en el mundo y México

La roya apareció en África Oriental en 1861, pero fue reportada por primera vez a principios de 1869 en la isla asiática de Celián (Moreno 2004). La gama de resistencia genética contra este patógeno observada en los cafetales silvestres de Etiopía apoya la hipótesis de que la enfermedad se originó en África.

La diseminación hacia América Latina se inició en el territorio de Brasil, donde se detectó por primera vez en 1970. En el sur de Brasil se reporta la raza II del hongo, la cual se diseminó rápidamente a las regiones productoras de café (Várzea, 2013). Sobre su introducción a estas regiones existen dos versiones: 1) las urediosporas fueron transportadas por los vientos alisios desde África, 2) la introducción accidental a través de material vegetal o ropas contaminadas. En el año 2000, se identificaron 15 razas fisiológicas de la roya anaranjada, pero la raza II era la más amplia en distribución (Zambolim *et al.*, 2005; Cabral *et al.*, 2009). Capucho *et al.* (2012) detectaron la presencia de otras razas, sin embargo, la raza II estuvo presente de igual manera en la mayoría de las muestras.

En Colombia la roya del café llegó en 1983, reportaron la raza II como responsable de la afectación a la variedad Caturra. En los años 2008 y 2011, después una epidemia severa que presentaron pérdidas superiores al 30% de la producción, se realizaron estudios sobre la presencia de nuevas razas de la enfermedad en el

cual se determinó la presencia de más de diez razas de roya y la presencia de la raza II (Caicedo *et al.*, 2013; Cristancho *et al.*, 2007).

Los reportes de la roya del café presente en países fronterizos como Guatemala y Belice, significan una fuente potencial de inóculo, específicamente por la cercanía de las zonas cafetaleras de Chiapas (CABI, 2013).

En el caso de México la roya del café se presentó en Chiapas en 1981 (Figura 3), posteriormente se dispersó en los cafetales (INMECAFE, 1988). Únicamente se ha reportado la raza II, que es la que se ha encontrado en todo el continente americano (Varzea y Marques, 2005). Para el año 2012, 30 años después de haberse detectado la roya en México, reaparece un brote con características de agresividad y consecuencias de daños graves a la producción del ciclo siguiente (SENASICA, 2013). Además se han reportado daños en la mayoría de los estados productores de café como Veracruz, Puebla, Oaxaca, Colima, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Querétaro y San Luis Potosí (SCOPE, 2013).

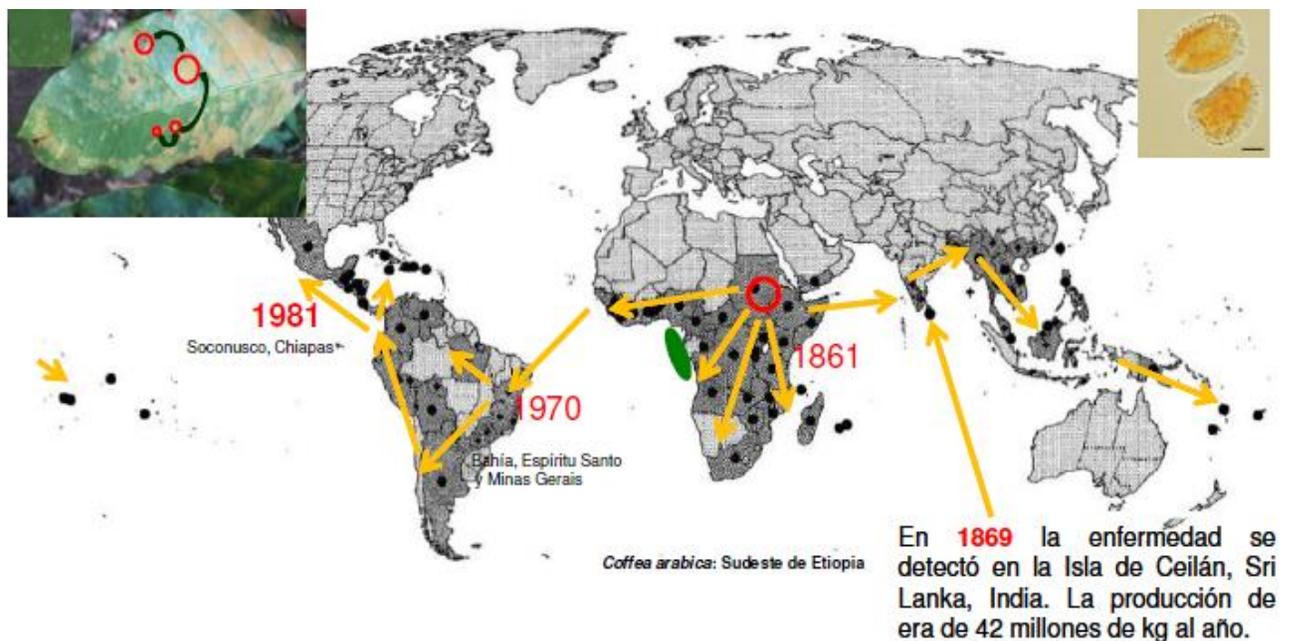


Figura 3. Distribución de la roya del café. Tomado de EPPO, 2013

Por lo que en México, se ha implementado la “Campaña preventiva contra la roya del café” por medio del Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica

Fitosanitaria (CNRF) que se empezó a aplicar en el año 2013 en los estados de Chiapas, Veracruz, Puebla, Oaxaca, Colima, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Querétaro y San Luis Potosí, para determinar la presencia, ausencia y severidad de la roya del café, ya que representa un riesgo para la producción y ante el incremento de la severidad de la enfermedad (SENASICA, 2013).

En Chiapas la aplicación de productos biotecnológicos (el fungicida DR43 y el biofertilizante ALTIA), han resultado satisfactorios, por que inhibe la expansión del hongo, y se evita la alteración del entorno de los cafetales par que los productores de café orgánico conserven su certificación. Las prácticas de control están coordinadas por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) y el Instituto Nacional de Investigaciones, Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) las cuales están siendo aplicadas en los estados productores de café (SAGARPA, 2013).

2.6 Descripción biológica de la roya.

La roya del café es la enfermedad más importante causada por el hongo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. (Martins *et al.*, 2004), pertenece a la familia Puccineaceae del orden de las Uredinales y la clase Basidiomycota (Cuadro 3), tiene un ciclo de vida incompleto, afecta exclusivamente a las especies del género *Coffea spp.* como: *C. arabica*, *C. canephora* y *C. liberica*, pero es más severa en variedades de la especie *C. arabica* (CABI, 2013). Se desarrolla en el envés de las hojas, lo cual disminuye la producción en los ciclos siguientes y ocasiona pérdidas económicas hasta del 40 % (Silvia *et al.*, 2006).

Cuadro 3. Clasificación taxonómica de *Hemileia vastatrix*

Dominio:	Eukaryota
Reino:	Fungi
Phylum:	Basidiomycota
Subphylum:	Pucciniomycotina
Clase:	Pucciniomycetes
Orden:	Puccionales
Género:	<i>Hemileia</i>
Especie:	<i>Hemileia vastatrix</i>

2.6.1 Morfología de la roya

Las urediosporas tienen tamaños de 30 μm de longitud por 20 μm de ancho, reniformes (Figura 4), son lisas en la cara interna y rugosa en la externa, y son producidas en cantidades grandes. En la planta, el síntoma se observa como un polvillo amarillo o naranja que se visualiza en el envés de las hojas de café y que es característico de esta enfermedad (Castro *et al.*, 2009).

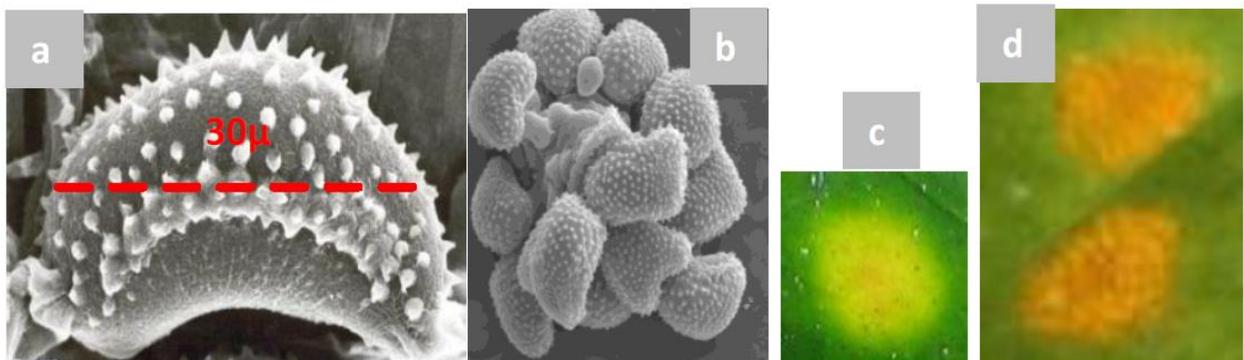


Figura 4. Uredospora de *H. vastatrix*. a-b) observación al MEB; c-d) soros en las hojas. Tomado de Calderón, 2012.

2.6.2 Proceso de infección

El ciclo de infección de *H. vastatrix* tiene las siguientes tres fases (y subfases) resumidas por Hirst y Schein (1965), la esporulación (producción de esporóforos, esporas y su maduración), la diseminación (liberación de esporas, dispersión, llegada de un nuevo hospedero) y la infección (germinación, penetración y colonización). La fase de infección se inicia con el periodo de penetración del

patógeno en los estomas de las hojas y comienza a desarrollar estructuras denominadas haustorios, los cuales entran en contacto con las células de la planta para extraer los nutrientes para crecer (Rayner, 1961). Según McCain y Hennen (1984) las diferentes etapas de la penetración consiste en, primero, la formación de hifas intercelulares, posteriormente se forman las hifas alimenticias y por último las hifas colonizadoras con muchos haustorios intracelulares. El trabajo de algunas hifas es invadir la cámara subestomática y producir un agregado de células esporógenas o protosoro. Algunas emergen por la apertura del estoma y producen un esporóforo. El diámetro del ostiolo condiciona el número de células que pueden emerger, en cada agregado que constituyen un soro o pústula.

Para el desarrollo del patógeno se requiere la presencia de condiciones óptimas como son: una temperatura de 22°C (Nutman *et al.*, 1963), obscuridad, agua libre por un periodo de 7 h durante todo el proceso hasta la penetración (Rayner, 1961; Nutman *et al.*, 1963; Kushalappa *et al.*, 1983). Según Rayner (1961) la germinación ocurre con mayor frecuencia de noche, aunque también podría realizarse de día en cafetales cultivados bajo sombra o con un autosombreamiento importante.

La presencia de alternancia entre las altas temperaturas de 17-25 °C, favorece la germinación de esporas y las bajas temperaturas entre 13- 16°C, favorece la formación del apresorio (Figura 5), el cual permite que la infección tenga lugar (De Jong *et al.*, 1987). Después de germinar a los 30 días, el hongo puede diferenciarse en soros, los cuales se observan como manchas pálidas y de color amarillas o naranja, con presencia de polvo fino donde se producen las esporas del hongo para su liberación (Rivillas *et al.*, 2011).

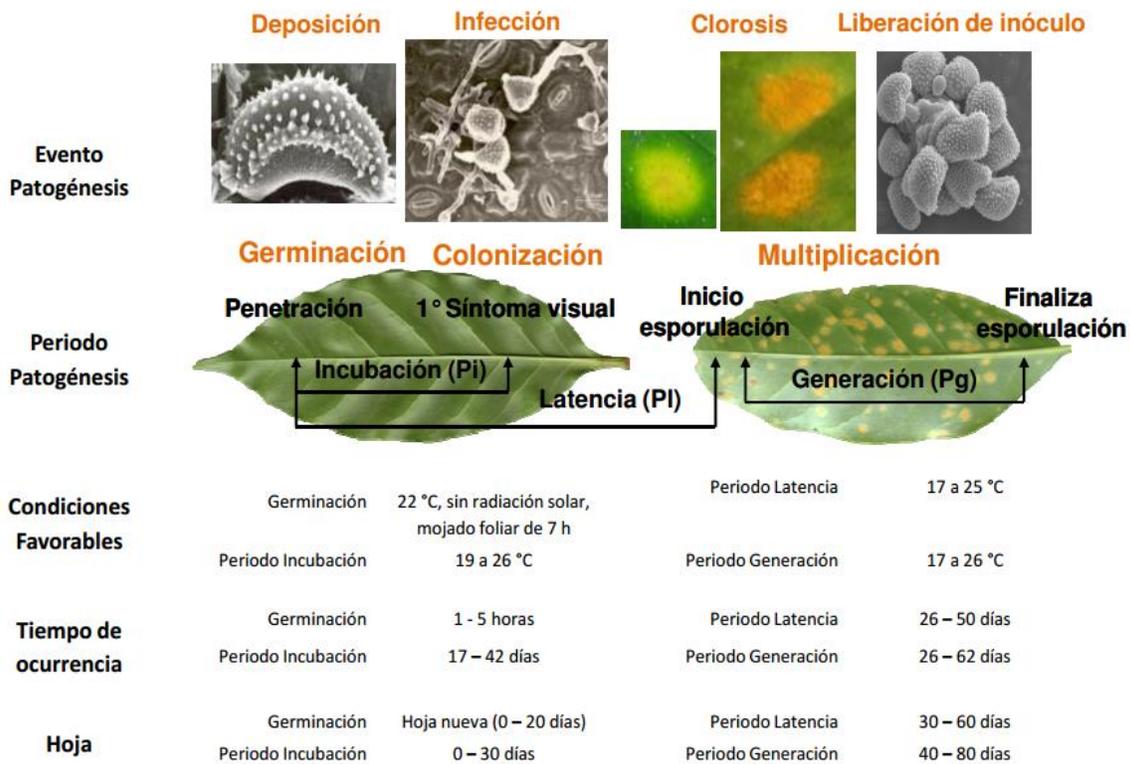


Figura 5. Ciclo biológico (patogénesis) de la roya del caféto (*Hemileia vastatrix*). Tomado de Calderón, 2012.

2.6.3 Dispersión

Para que el patógeno se disperse necesita la presencia de las urediosporas, las cuales son producidas en cantidades grandes y corresponden al polvo amarillo o naranja que se observa en el envés de las hojas, necesita factores abióticos como el viento y la lluvia, mediante el salpique de la lluvia, la dispersión puede presentarse de forma local entre hojas o entre plantas, sobre todo en plantaciones con densidades altas. En el caso del viento juega el papel más importante al dispersar las urediosporas a grandes distancias entre regiones productoras de café (Rivillas *et al.*, 2011; APS, 2011). Además se ha reportado que insectos (trips, moscas y avispas) contribuyen a la dispersión del patógeno en proporciones mínimas y la intervención humana podría estar involucrada también en la dispersión a grandes distancias entre países y continentes (APS, 2011).

2.6.4 Multiplicación

En el periodo de 30 días después de la etapa de infección y colonización del tejido de las hojas, el hongo está lo suficientemente maduro para diferenciarse en estructuras llamadas soros, que son las encargadas de producir nuevas urediosporas. Se produce aproximadamente 1,600 esporas por milímetro cuadrado (mm²) de hoja, durante un período que va de 4 a 5 meses, las cuales serán dispersadas para iniciar el nuevo ciclo de infección. Este fenómeno es observado en países como Brasil, Guatemala y México.

Se ha observado la disminución en los meses lluviosos que coinciden con la época de desarrollo vegetativo de la planta, aparentemente la lluvia tiene un efecto de lavado sobre las esporas del hongo. Pero al término de las lluvias incrementa exponencialmente la producción del inóculo y la severidad de la enfermedad que coinciden con la época de llenado de fruto y cosecha, mientras en los meses de marzo a mayo, los cuales corresponde a meses con temperaturas elevadas y baja precipitación, son restrictivas para el desarrollo de la enfermedad (Méndez, 1982).

En México los comportamientos con los datos históricos reportados de roya muestran el incremento que ocurre durante el invierno (noviembre-febrero). Así también, la altura influye en los niveles de daño, debido a que la mayor incidencia ocurre a altitudes igual o menor a 800 msnm y decrece a medida que aumenta la altitud.

2.6.5 Síntomas y Daños

Los síntomas inician como pequeñas manchas de 1-3 mm, traslucidas y de color amarillo claro. La lesión crece en tamaño y puede coalescer con otras manchas (Figura 6), hasta formar grandes parches con abundante polvo amarillo (esporas) en el envés de las hojas y en su lado opuesto se observan manchas amarillas. Las lesiones viejas se necrosan, pero la esporulación puede continuar en el margen de las lesiones (Castro *et al.*, 2009).

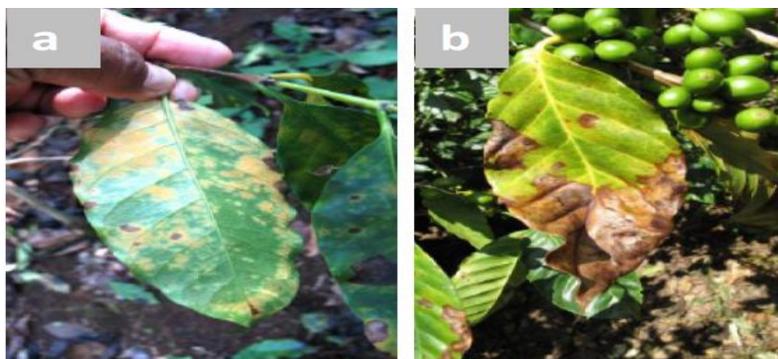


Figura 6. Síntomas de roya en hojas de café. a) envés de la hoja y b) haz de la hoja. Tomado de SINAVEF, 2012.

Los daños severos mayores al 60 % pueden causar defoliación, provocando la caída prematura de las hojas, propiciando la reducción de la capacidad fotosintética, así como el debilitamiento de árboles enfermos y en infecciones severas puede ocasionar muerte regresiva en ramas e incluso la muerte de los árboles (APS, 2011). Si la infección ocurre en etapas tempranas se puede presentar una reducción en el rendimiento. Sin embargo, si la infección se presenta en etapas tardías el efecto se observará en los niveles de amarre de fruto del siguiente ciclo de cultivo (SINAVEF, 2012).

2.6.6 Sobrevivencia

Las urediosporas de *H. vastatrix* pueden sobrevivir bajo condiciones ambientales secas por medio del inóculo primario (inóculo residual), el cual está constituido por las lesiones necrosadas latentes llevadas por las hojas del cafeto que sobrevivieron después de la época seca (Avelino *et al.*, 1991). La cantidad de inóculo residual depende de la intensidad de la defoliación después de la cosecha y como resultado de factores de estrés como una fuerte producción, un desequilibrio nutricional, una fuerte exposición al sol, un bajo potencial hídrico del suelo o un periodo seco muy largo. Paradójicamente, las aplicaciones de fungicidas pueden aumentar el inóculo residual porque prolongan la vida de las hojas (especialmente de las hojas enfermas) (Avelino *et al.*, 1995). La esporulación se reactiva con las primeras lluvias sobre las lesiones necrosadas latentes y forma el inóculo primario para iniciar la dispersión (Muller, 1980; Muthappa, 1980).

2.7 Producción de café en México

Según el SIAP (2016), la superficie sembrada de café a nivel nacional en el año 2012 era de 624,742.46 hectáreas; en el año 2013 la superficie cultivada incrementó en un 12 % en comparación con el año anterior; para el año 2014 la superficie sembrada incremento en un 0.024 % en comparación al año 2013, para el año 2015 la superficie sembrada disminuyó en 1.34 % en comparación con la superficie cultivada en el año 2014; y para el año 2016 la superficie de café incrementó en comparación al año 2015 en un 0.63 % (Cuadro 4). En Chiapas, en el año 2012 el café se cultivaba en una superficie de 258,666.46 hectáreas; para el año 2013 las hectáreas cultivadas incrementaron en 0.25 % en comparación con el año anterior; en el año 2014 la superficie cultivada incrementó en un 0.31 % en comparación con el año 2013; para el caso del año 2015 el incremento del cultivo fue del 0.55 % en comparación al año 2014; y para el año 2016 la superficie cultivada del cafeto presentó una disminución del 1.05 % en comparación al año 2015.

Cuadro 4. Superficie sembrada por estados en México (2012-2016).

Estado	SUP. SEMBRADA (Ha.)				
	2012	2013	2014	2015	2016
Chiapas	258,666.46	259,315.74	260,129.43	261,571.58	258,815
Oaxaca	163,380	142,766	142,117	139,637	139,692
Veracruz	147,664	147,384	146,619	141,237	145,426
Puebla	78,162	72,175	73,179	73,316	73,618
Guerrero	54,342	47,190	47,209	47,114	47,234
Hidalgo	26,279	25,821	25,500	24,622	24,625
Nayarit	18,661	17,693	17,739	17,039	17,155
San Luis Potosí	17,420	17,154	17,006	17,068	17,102
Jalisco	3,983	3,835	3,624	3,462	4,014
Colima	2,506	2,378	2,373	2,373	2,534
Tabasco	1,040	1,040	1,040	950	950
México	465	479	479	573	565
Querétaro	270	270	270	270	270
Morelos	96	78	54	42	34
Michoacán	14	13	16	15	0
Tamaulipas	0	0	0	1	1
Total:	624,742.46	737,112.74	737,295.43	727,385.58	732,036

Fuente: SIAP, 2017.

La producción de café a nivel nacional en el año 2012 fue de 1,165,960.8 toneladas, para el año 2013 la producción incremento en un 8.3 % en comparación al año anterior; en el año 2014 la producción decreció en 6.3 % en comparación con el año 2013; en el año 2015 la producción decreció en un 12.6 % en comparación al año 2014; y para el año 2016 la producción decreció en un 19.5 % en comparación con el año 2015 (Cuadro 5). Para el estado de Chiapas la producción de café cereza en el año 2012 se encontraba en 532,682.8 toneladas, en el año 2013 la producción decreció en un 6.3 % en comparación al año 2012; en el año 2014 la producción decreció en un 19.4 % en comparación al año 2013; en el año 2015 la producción decreció en un 4.7 % en comparación al año 2014; y para el año 2016 la producción decreció en un 5.5 % en comparación al año 2015 (SIAP, 2016).

Cuadro 5. Producción de café por estados en México (2012-2016).

Estado	Producción (Ton de café cereza)				
	2012	2013	2014	2015	2016
Chiapas	532,682.8	499,105.16	402,099.78	383,059.62	361,850
Veracruz	364,846	357,977	338,337	278,975	191,017
Oaxaca	141,505	129,756	129,402	83,076	66,053
Puebla	202,610	159,322	188,212	181,384	121,433
Guerrero	49,717	41,784	48,916	45,252	42,125
Hidalgo	32,873	33,992	35,256	31,811	29,955
Nayarit	13,199	25,358	24,635	16,584	3,554
San Luis Potosí	11,830	16,247	13,052	10,922	10,387
Jalisco	5,311	4,334	5,400	3,084	4,869
Colima	2,044	2,448	2,411	2,555	2,528
México	1,095	1,096	3,810	4,060	2,630
Tabasco	954	847	441	425	852
Morelos	133	126	78	59	45
Querétaro	108	243	135	176	81
Michoacán	49	51	63	51	0
Tamaulipas	0	0	0	0	0
Total:	1,165,960.8	1,272,686.16	1,192,247.78	1,041,473.62	837,379

Fuente: SIAP, 2017.

La superficie sembrada en el estado de Chiapas en el año 2012 era de 239,505.46 hectáreas, para el año 2013 la superficie decreció en un 0.7 % en comparación con el año 2012, en el año 2014 la superficie incrementó en un 8.1 % en comparación con el año 2012, y para el año 2015 la superficie incrementó en un 0.3 % en comparación con el año 2014 (Cuadro 6). En el distrito de Villaflores para el año 2012 la superficie sembrada era de 24,232.75 hectáreas, para el año 2013 la superficie incrementó en un 1.1 % en comparación con el año 2012, para el año 2014 la superficie incrementó en un 0.7 % en comparación con el año 2012, para el año 2015 la superficie incrementó en un 4 % en comparación con el año 2014 (SIAP 2016). Además en cuadro 7 se muestra la superficie de has. en relación con la región económica y los municipios que lo conforman.

Cuadro 6. Superficie sembrada por distritos en Chiapas (2012-2015).

Distrito	Sup. sembrada (Ha.)			
	2012	2013	2014	2015
Tapachula	73,130.35	73,611.38	73,611.13	73,273.13
Palenque	44,198	44,202.25	44,203.75	44,399.75
Motozintla	36,577.86	36,543.86	36,794.35	36,948.95
Pichucalco	27,383	27,382	27,832	27,560
Villaflora	24,232.75	24,505.75	24,678.75	25,712.75
San Cristóbal	20,180	20,200	20,216	20,193
Comitán	19,327	19,327	19,336	19,529
Tuxtla Gutiérrez	9,873.5	9,873.5	9,873.5	9,819
Selva Lacandona	2,654	2,654	2,957	2,965
Tonalá	1,110	1,016	1,076.95	1,171
Total:	239,505.46	239,317.74	260,579.43	261,571.58

Fuente: SIAP, 2016

Cuadro 7. Superficie Ha. por región económica en Chiapas 2011.

Región Económica	Delegación	Municipios	Hectáreas
		Núm.	Núm.
VISelva	08 Ocosingo	4	28,213
	09 Palenque	3	6,312
	10 Yajalón	4	15,488
	Total	11	50,013
VIII Soconusco	12 Tapachula	7	49,84
	Total	7	49,84
VII Sierra	11 Motozintla	10	41,858
	Total	10	41,858
IV Fraylesca	05 Á. A. Corzo	5	26,752
	Total	5	26,752
V Norte	06 Bochil	7	16,388
	07 Pichucalco	12	5,61
	Total	19	21,998
II Altos	03 S. C. de L.C.	11	19,182
	Total	11	19,182
IX Istmo – Costa	13 Mapastepec	6	16,539
	Total	6	16,539
I Centro	01 Copainalá	4	2,987
	02 Ocozacoautla	10	10,352
	Total	14	13,339
III Fronteriza	04 Comitán	5	11,14
	Total	5	11,14

Fuente: SPCCH, 2011

La producción de café en el estado de Chiapas en el año 2012 era de 532,581.92 toneladas, para el año 2013 la producción decreció en un 6.2 % en comparación con el año 2012, para el año 2014 la producción decreció en un 19.4 % en comparación con el año 2013, para el año 2015 la producción decreció en un 4.7 % en comparación con el año 2014 (Cuadro 8). En el distrito de Villaflores para el año 2012 la producción de café era de 63,996.54 toneladas, para el año 2013 la producción incrementó en un 13.7 % en comparación con el año 2012, para el año 2014 la producción decreció en un 44.1 % en comparación con el año 2014, para el año 2015 la producción decreció en un 20.5 % en comparación con el año 2014 (SIAP, 2016).

Cuadro 8. Producción de café por distritos en Chiapas (2012-2015).

Distrito	Producción (Ton de café cereza)			
	2012	2013	2014	2015
Motozintla	128,028.76	122,195.02	90,135.22	78,318.93
Tapachula	110,100.48	96,512.3	67,696.35	70,463.66
Villaflores	63,996.54	74,165.55	41,405.09	32,892.26
San Cristóbal	55,789.77	55,777.31	53,563.58	55,609.51
Pichucalco	50,467.66	52,134.42	47,300.59	47,728.68
Tuxtla Gutiérrez	16,357.68	20,181.08	16,598.89	14,446.3
Comitán	14,660.53	13,490.78	16,423.4	17,041
Palenque	8,9615	61,131.58	65,458.9	61,705.36
Tonalá	2,275.5	2,103.12	2,143.76	2,245.8
Selva Lacandona	1,290	1,415	1,374	2,608.12
Total:	532,581.92	499,106.16	402,099.78	383,059.62

Fuente: SIAP, 2016.

En el municipio de La Concordia la superficie sembrada en el 2012 era de 8,380 hectáreas (Cuadro 9), para el año 2013 la superficie incrementó en un 0.05 % en comparación al año anterior, para el año 2014 la superficie incrementó en un 0.5 % en comparación con el año 2013; en el año 2015 la superficie decreció en un 0.3 % en comparación con el año 2014 (SIAP, 2016).

Cuadro 9. Superficie sembrada del Distrito Villaflores (2012-2015).

Municipio	Sup. sembrada (Ha.)			
	2012	2013	2014	2015
La Concordia	8,380	8,385	8,430	8,404
Ángel A. Corzo	7,421	7,445	7,528	7,478
Monte C. de Gro.	4,430	4,454	4,499	4,462
Villa Corzo	3,198	3,398	3,398	4,545
Villaflores	824	824	824	824
Total:	24,253	24,506	24,679	25,713

Fuente: SIAP, 2016.

En el municipio de La Concordia la producción de café en el año 2012 era de 21,899 toneladas (Cuadro 10), para el año 2013 la producción incrementó en un 18.7 % en comparación con el año anterior; para el año 2014 la producción decreció en un 49.1 % en comparación al año 2013; y para el año 2015 la producción decreció en un 19.5 % en comparación al año 2014 (SIAP, 2016).

Cuadro 10. Producción de café por municipio del Distrito Villaflores (2012-2015).

Municipio	Producción (Ton de café cereza)			
	2012	2013	2014	2015
La Concordia	21,899	26,958	13,703	11,029
Ángel A. Corzo	19,888	22,519	12,085	9,752
Monte C. de Gro.	11,703	13,496	7,202	5,316
Villa Corzo	8,314	8,954	6,317	4,933
Villaflores	2,191	2,237	2,098	1,861
Total:	63,995	74,164	41,405	32,891

Fuente: SIAP, 2016.

2.8 Aspectos económicos.

El cultivo de café es considerado como el producto agrícola más importante en el comercio internacional, y una mínima reducción en el rendimiento o un ligero aumento en los costos de producción de este cultivo por efecto de *H. vastatrix*, puede tener un gran impacto en los cafeticultores y en los países cuyas economías son totalmente dependientes de las exportaciones del café (APS, 2011).

El CABI (2013) menciona que el impacto económico de *H. vastatrix* en el café no solo se debe a la reducción de la cantidad y la calidad de la producción, sino también a la necesidad de implementar costosas medidas de control en los cultivares susceptibles.

La importancia de *H. vastatrix* en México radica en que existe una superficie sembrada del cultivo de café de 760,974.05 hectáreas, de las cuales se cosechan 688,208.41 con una producción de 1, 287, 642 toneladas de café en cereza, cuyo valor de producción es superior a los 6, 815 millones de pesos (SIAP, 2013). Por lo que la presencia de *H. vastatrix*, es un riesgo potencial para la actividad cafetícola nacional por su valor de producción (SIAP, 2013).

En Chiapas, la distribución de severidad foliar promedio a nivel regional fue de 18.1% en el año 2013, lo cual representa un incremento de 2% con respecto al informe del 2012, correspondiente al programa epidemiológico de la roya del café (SENASICA, 2013). Los niveles de intensidad reportados son variables en rangos de 0-62.2 %, los municipios con mayor intensidad fueron Villa Corzo, Ángel Albino Corzo, Bella Vista, Amatenango de la Frontera, Motozintla, Siltepec, Chicomuselo, Huixtla, Chenalhó, con valores entre 20 y 62.7% (SENASICA, 2013).

Algunos municipios en Chiapas como Siltepec, Villa Corzo, Bella Vista, Tuzantán, A. Albino Corzo y Motozintla de Mendoza, se reportan incrementos de los niveles de severidad promedio foliar superior al 20%, debido a la asociación de procesos de reinfección como resultado del ciclo epidémico 2014. Las regiones cafetaleras reportan niveles de daño entre 22.4 – 62.6%, (SENASICA, 2015).

2.9 Investigaciones realizadas en roya

Recientemente se han realizado diferentes estudios de la roya del café en los países productores de café, entre los que se encuentran la determinación de razas presentes en los cultivos, estudios de razas fisiológicas y morfológicas, el estudios de diversidad genética, entre otros, algunos de estos trabajos relacionados con la agresividad y daños presentes, están basados en la utilización de diferentes

marcadores moleculares (RAPS, AFLP, RFLP, Microsatelites) a partir de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Entre los trabajos realizados se encuentran los estudios de Gouveia *et al.* 2005, quienes utilizaron marcadores moleculares RAPD para analizar el polimorfismo molecular entre aislamientos de *H. vastatrix* de diferentes regiones cafetaleras y evaluar los niveles más amplios de diversidad genética en 45 aislamientos, con el propósito de aumentar el conocimiento sobre la variabilidad del patógeno y diferenciación que podrían utilizarse para investigar la evolución del patógeno y diseñar estrategias para el manejo de la enfermedad, así como para desarrollar cultivares nuevos.

Nunes *et al.* (2009) realizaron el estudio de *H. vastatrix* utilizando los marcadores RAPD en 120 aislamientos del patógeno, en sistemas de producción de café orgánico y convencional en dos regiones productoras del estado de Minas Gerais, Brasil. El objetivo del trabajo fue determinar la diversidad genética y estructura de las poblaciones de *H. vastatrix*. Teniendo como resultado diferencias entre los dos sistemas, aun que no se conoce la razón por la cual el patógeno es diferente en un sistema y otro.

Cabral *et al.*, (2009) realizaron estudios de la roya basados en la caracterización de las razas fisiológicas, las cuales se encontraban presentes en 34 poblaciones de las variedades de *C. arabica* y *C. canephora* e híbridos colectados en los estados de Minas Gerais, Espírito Santo y São Paulo, las tres regiones más importantes en producción de café en Brasil. La caracterización fisiológica se realizó en base a la expresión fenotípica de *H. vastatrix*, identificando las razas II, III, XIII, XVII y XXXVII, siendo la raza XXXVII nueva en los cafetales de Brasil.

Gichuru *et al.* (2012) realizaron estudios de identificación de razas fisiológicas en Kenia, los aislamientos fueron colectados en dos zonas productoras de café (Ruiru y Koru), se caracterizaron 24 ejemplares, dentro de los cuales se encontró que 22 ejemplares corresponden a nuevas razas del patógeno, las seis nuevas razas que

se caracterizaron fueron la raza III, XVII, XXIII, XXXVI, XLI y XLII, revelando tres genes nuevos de virulencia del patógeno en el estudio.

Capucho *et al.* (2012) realizaron estudios basándose en una inspección a 64 muestras de hojas con roya procedentes de diferentes regiones, con genotipos de *Coffea arabica*, *C. canephora* y derivados del Híbrido de Timor/Icatu, las cuales se cultivan en las principales zonas de producción de Brasil, el objetivo fue identificar las razas fisiológicas de *H. vastatrix*, y obtuvieron como resultado la identificación de una raza nueva la cual fue la raza XXXIII.

Rozo *et al.* (2012) realizaron el estudio de *Hemileia vastatrix* con el objetivo de evaluar la variabilidad molecular y agresividad en *C. arabica* var. Caturra, procedentes de diferentes altitudes durante una epidemia en Colombia. Para determinar si la epidemia ha sido causada por un nuevo patógeno, se evaluó la diversidad molecular del patógeno causante de la epidemia en diferentes regiones del país, uso de marcadores moleculares AFLP en aislamientos recogidos antes y después del año 2008. Y concluyeron que debido a las presencias de las lluvias en el año 2006 en las áreas productoras de café del país, para el año 2011 el patógeno que estaba presente era un nuevo.

Cabral *et al.* (2015) realizaron estudios utilizando 112 aislamientos de *H.vastatrix* de diferentes localizaciones geográficas y de genotipos diferentes de café utilizando marcadores RFLP, el objetivo de la investigación fue por lo tanto evaluar la diversidad genética y la estructura poblacional de *Hemileia vastatrix* con respecto al origen geográfico del hongo, usando solo aislamientos de uredias de *C. arabica*, *C. canephora* y Híbridos derivados de Timor y Icatu (HDTI) de los cinco estados con mayor producción en Brasil.

2.10 Control químico

El uso de fungicidas ayuda a mantener bajos los niveles del hongo que causa la roya, por lo tanto, reduce el impacto que la enfermedad ocasiona en la producción. Al momento hay disponibles fungicidas de contacto y sistémicos (Cuadro 11) los

cuales se pueden aplicar de la manera siguiente: el sistémico en el período de junio a julio y el de contacto en noviembre y en enero.

Otro régimen de aplicación que también es efectivo es, el sistémico de mayo a junio y el de contacto en agosto y en noviembre después de la cosecha.

2.10.1 Fungicidas de contacto

Solamente inhiben la germinación de esporas o evitan la penetración en la planta, el uso de estos productos requiere de buena cobertura del follaje, principalmente en el envés. El intervalo de aplicación de fungicidas debe ser entre 15 - 25 días los cuales pueden ser utilizados con niveles bajos de incidencia de roya alrededor del 5%.

2.10.2 Fungicidas sistémicos

Cuando el nivel de infección es muy alto se debe seguir el calendario de aplicaciones con productos de tipo sistémico para reducir el ataque de roya, previo a la maduración del café y de acuerdo a las fechas establecidas para la región. No se debe utilizar fungicidas a base de epoxiconazole en la tercera aplicación porque puede generar problemas de residualidad.

Cuadro 11. Fungicidas para aplicación del control de la roya del café.

Nombre comercial	Ingrediente activo	Dosis por manzana
FUNGICIDAS DE CONTACTO		
Caldo Bordelés	sulfato de cobre + hidróxido de calcio	4 - 5 libras
Hidróxido de cobre	Cobre	4 libras
Óxido de cobre	Cobre	4 libras
Oxicloruro de cobre	Cobre	5 libras
Timorex Gold	Melaleuca alternifolia	1000 cc
Vigilante	azufre + cobre	1000 cc
FUNGICIDAS SISTÉMICOS CON UN INGREDIENTE ACTIVO		
Opus 12.5 SC	Epoxiconazole	350 cc
Alto 10 SL	Cyproconazole	280 cc
Caporal 25 DC	Triadimenol	350 - 500 cc
Atlas 25 EW	Tebuconazole	400 - 560 cc
FUNGICIDAS SISTÉMICOS EN MEZCLAS DE DOS INGREDIENTES ACTIVOS		
Silvacur Combi 30 EC	tebuconazole + triadimenol	350 - 500 cc
Duett 25 SC	epoxiconazole + carbendazim	350 cc
Amistar Xtra 28 SC	azoxystrobin + cyproconazole	350 - 400 cc
Opera	epoxiconazole + pyraclostrobin	700 cc

En México, se requiere determinar las condiciones específicas para realizar las aplicaciones de fungicidas de forma efectiva y considerando la fenología de la planta. Por lo que se recomienda al inicio del del nuevo ciclo del cultivo realizar aplicaciones de fungicidas con productos de contacto y posteriormente aplicar un fungicida sistémico para reducir la carga del inóculo. Durante el año 2013, a partir del mes de abril, se mantuvo una vigilancia fitosanitaria sobre los cafetales cada quince días, para detectar oportunamente los primeros síntomas provocados por la roya del café, a fin de iniciar las acciones de manejo. En una fase preventiva se puede aplicar oxicloruro de cobre o en su caso aplicaciones de fungicidas curativos con cyproconazole, azoxistrobin y triadimefon en función de la disponibilidad económica del productor (SINAVEF, 2013).

2.11 Control biológico

Dentro de los controles que se establecen para tratar de minorar los daños producidos por *H. vastatrix*, una alternativa para los cultivos de café en producción orgánica es el control biológico, en el cual se han realizado diferentes estudios de

los los micoparásitos que afectan la roya del café (Carrion y Rico, 2002), entre los que se encuentra *Acremonium bissoydes*, *Calcarisporium ovalisporum*, *Lecanicidium lecanii*, *Sporothrix guttuliformis* y *Fusarium pallidoserum* (Carrion, 2006). El micelio de estos hongos, al crecer sobre las urediosporas, compacta las esporas de la roya e impide su liberación normal.

Lecanicillium lecanii es una de las principales especies utilizadas para el control biológico de la roya. Esta especie tiene la habilidad de afectar a los hongos biotróficos como los mildiús o las royas. Además es uno de los hongos entomopatógenos que controla los áfidos y escamas (Ownley *et al.*, 2010). Staver *et al.* (2001) explican que las condiciones húmedas en el ambiente es especialmente necesario y con abundante sombra para el desarrollo de *L. lecanii*. Vandermeer *et al.* (2009) relacionan la alta abundancia de *L. lecanii* bajo sombra con la presencia de hormigas arborícolas de la especie *Azteca instabilis*.

Recientemente existen algunos productos comerciales que pueden emplearse para el control de *H. vastatrix* como *Bacillus subtilis* (bacteria) *Verticillium hemileiae* que es un hongo parásito de la roya del café y se encuentra de manera natural y están siendo utilizados en algunos cafetales de México (SENASICA, 2013).

2.12 Control genético

La recombinación es muy importante en la evolución de plantas ya que ha permitido el incremento en la diversidad genética, adaptabilidad, producción y resistencia a enfermedades y plagas (Arnold, 1997; Beaumont, 2001; Mahé *et al.*, 2007). Sin embargo, puede causar efectos negativos sobre la especie en la cual se trabaja, esto según investigadores, que mostraron que la hibridación podría generar una baja calidad y contenido nutricional de subproductos, así contribuir a la posible extinción de especies nativas (Levin *et al.*, 1996). Los estudios de herencia de la resistencia realizados por los investigadores del Centro de Investigación de Royas del Café (CIFC) de Portugal, han demostrado que la hipótesis de Flor (1995) se aplica al complejo *Coffea spp*- *H. vastatrix*, de modo que entre ellos ocurre interacción gen a gen, y la formación de nuevas razas es un

fenómeno natural e irreversible de los hongos fitopatógenos como *H. vastatrix* para sobrevivir (Burdo, 1993).

El mejoramiento del café ha hecho uso del recurso de la introgresión de genes y esto ha sido realizado para obtener genotipos en forma de pirámide (acumulación de todos los factores en un sólo genotipo) o para generar variedades de tipo compuesto para garantizar la resistencia durable (Moreno *et al.*, 2000).

Para el caso de la resistencia de la roya en el café, se produce como respuesta a la enfermedad en las hojas una reacción de hipersensibilidad; aunque el patógeno se encuentre en contacto con el huésped y penetre los tejidos, la reacción parasitaria no se establece, en éste caso el ataque no pasa de unas pocas células muertas que lo aíslan, mientras las células vecinas forman pequeñas tumefacciones como reacción de la planta (Rodrigues *et al.*, 1975).

En el caso de la variedad “catimor” la cual presenta resistencia a la roya del café, responde de forma baja a la alta presión del inóculo manteniendo un nivel de infección menor al 15% (Moreno y Alvarado, 2000). En México se han establecidos variedades que presentan resistencia a la roya como son Costa Rica, Colombia, San Román, Sachimor y la variedad Oro Azteca (obtenida por el INIFAP) entre otras (Morfin *et al.*, 2006).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del área de estudio

El trabajo de investigación se realizó en plantaciones de *C. arabica* de la variedad bourbon y caturra en tres comunidades: ubicada en Sajonia a una altitud de 800 mnsnm, Berlín a una altitud de 1200 msnm y Guadalupe a una altitud de 1522 msnm (Figura 7), pertenecientes al municipio de La Concordia, ubicadas dentro de la reserva de la biosfera El Triunfo, en el estado de Chiapas.

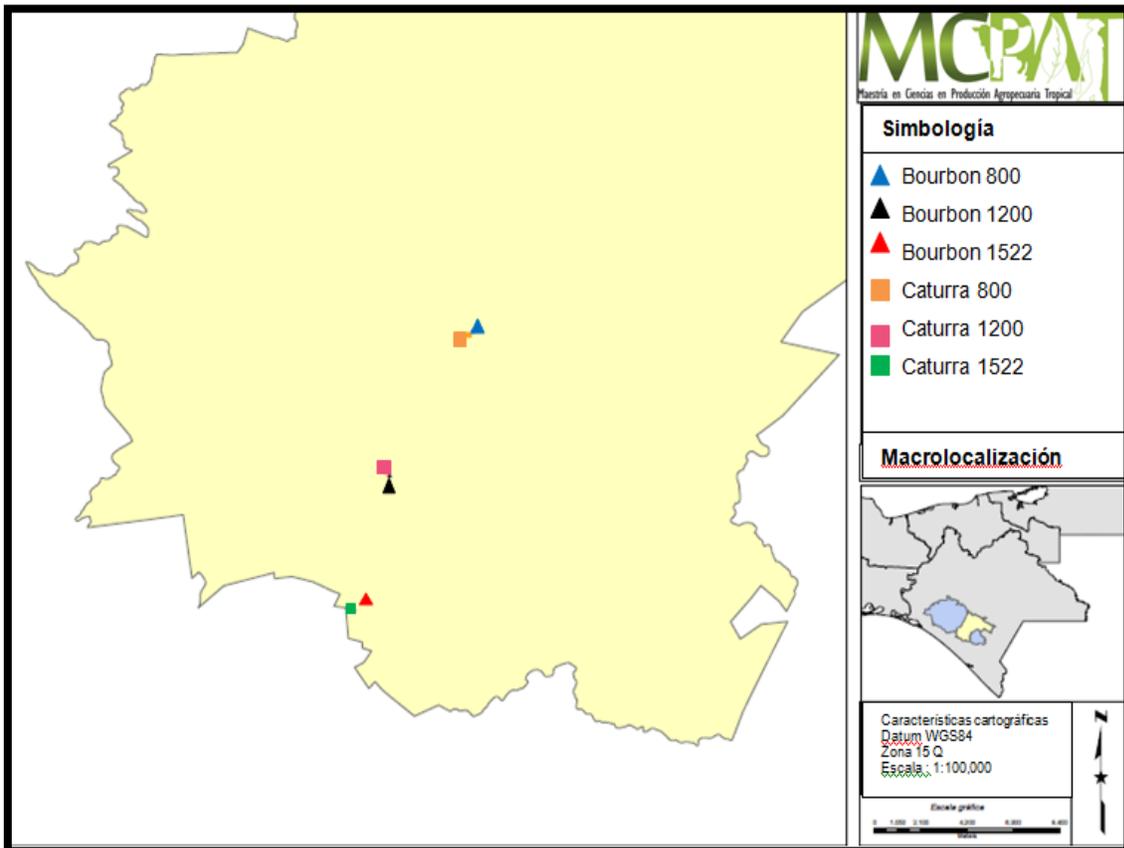


Figura 7. Ubicación de parcelas cafetaleras en el municipio de La Concordia, Chiapas.

3.2 Variables de estudio

- Severidad de *H. vastatrix* para plantas y hojas
- Alineamiento de las secuencias
- Diversidad genética de *H. vastatrix* con el uso de marcadores moleculares

a) Severidad de *H. vastatrix* para plantas y hojas

Para llevar a cabo el estudio de esta variable se realizaron las siguientes actividades:

3.3 Criterios de selección de las parcelas

En México la producción de café se realiza desde los 50 a 2000 msnm, lo cual permite su categorización en 3 estratos: bajo: 800 msnm; medio: 1200 msnm y alto: 1900 msnm (SINAVEF, 2013). Con base a lo anterior, se procedió a seleccionar las variedades de café Bourbon (de fruto color rojo) y Caturra (de fruto color amarillo) y se ubicaron en una parcela de 0.5 ha. para cada variedad a altitudes de 800 msnm categorizado en el estrato bajo; a 1200 msnm categorizado en el estrato medio y a 1522 msnm categorizado en el estrato alto. Los muestreos se realizaron cada quince días, iniciando en diciembre del año 2015 y terminando en abril de 2016. Las parcelas donde se realizaron los muestreos pertenecen a los productores de la organización “Ramal Santa Cruz”.

3.4 Metodología de la colecta de hojas

En cada parcela se aplicó el muestreo de “T” SENASICA (Figura 8). Consistió en seleccionar 20 plantas en cada parcela, se evaluó 5 plantas por parcela y se identificaron con un listón de color rojo para las plantas de la variedad Bourbon y un listón color amarillo las plantas de la variedad Caturra.

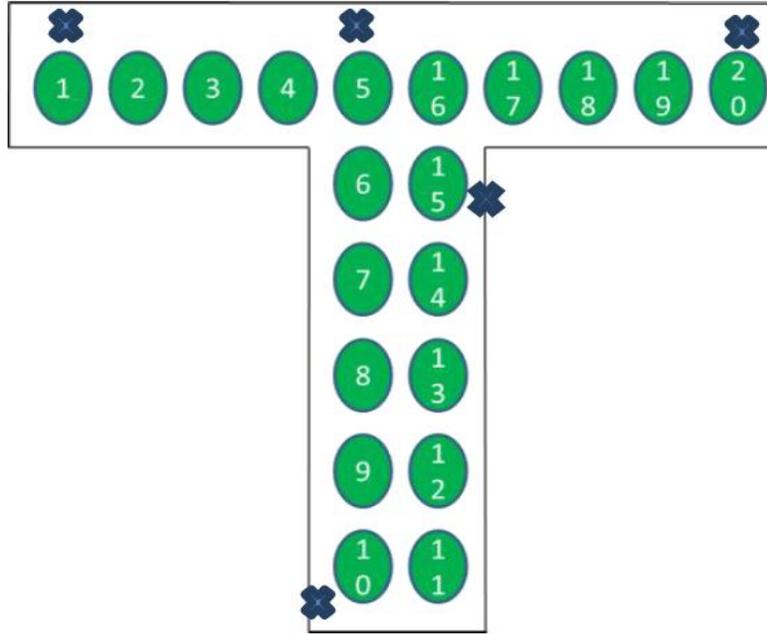


Figura 8. Método de Muestreo “T” para la evaluación de severidad en plantas (20 plantas) y en hojas (5 plantas marcadas con X) (SENASICA, 2013).

3.5 Evaluación de severidad

Se muestrearon un total de 10 hojas infectadas por el patógeno, tres hojas de la parte baja (B), cuatro hojas de la parte media (M) y tres hojas de la parte alta (A) de la planta, siempre se muestrearon las mismas plantas. La severidad de las plantas se evaluó siguiendo la escala presentada por SENASICA (Cuadro 12), y para la severidad de las hojas, también se utilizó la escala presentada por SENASICA (Cuadro 13).

Cuadro 12. Escala de severidad para evaluar daños en plantas.

CLASE	% DE DAÑO EN PLANTA
0	Planta sana
1	3 % de área foliar con presencia de roya
2	10 % de área foliar con presencia de roya
3	30 % de área foliar con presencia de roya
4	60 % de área foliar con presencia de roya
5	Defoliación

Fuente: SENASICA, 2013.



Figura 9. Determinación del porcentaje de daño según el dosel de la planta. Fuente: SENASICA, 2013.

Cuadro 13. Escala de severidad para evaluar daños en hoja.

CLASE	% DE DAÑO EN HOJA
0	Sano sin síntomas visibles
1	1-5 % de área afectada
2	6-20 % de área afectada
3	21-50 % de área afectada
4	>50 % de área afectada

Fuente: SENASICA, 2013



0 **1** **2** **3** **4**
(Sano) **(1-5%)** **(6-20%)** **(21-50%)** **(>50%)**

Figura 10. Determinación del porcentaje de infección de hojas dañadas. Fuente: SENASICA, 2013.

3.6 Análisis estadístico de daños en hojas y plantas de café.

Para el análisis de los datos se utilizó la técnica estadística no paramétrica de Friedman, el motivo de la aplicación de este método, es por la organización de los datos tomados con base en los daños en hojas y plantas, los cuales fueron determinados de acuerdo a la clase de daño de la enfermedad según las tablas presentadas por SENASICA 2013. Debido a que no es posible obtener la media de las muestras, se determinaron rangos y se calculó la mediana, en algunos de los casos se utilizó la X^2 . Para determinar la desviación estándar se utilizó la fórmula de Friedman, y se calculó el coeficiente de variación mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Las fórmulas utilizadas son las siguientes:

Fórmula de prueba de Friedman:

$$F = \frac{12}{nk(k+1)} \sum_{j=1}^k R_j^2 - 3n(k+1)$$

Donde:

F= prueba de Friedman

n= tamaño de la muestra

k= tratamientos

R_j^2 =la suma correspondiente a la columna j-ésima

Fórmula de correlación de Spearman:

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum d^2}{n(n^2 - 1)}$$

Donde:

r_s = coeficiente de correlación de Spearman

d^2 = diferencia entre rangos de X e Y.

n= número de muestras

b) Alineamiento de las secuencias

3.7 Técnicas de colecta y extracción de ADN de *H. vastatrix*.

3.7.1 Colecta de uredias.

La colecta de uredias se realizó identificando las pústulas de polvo herrumbroso color naranja, se utilizó un estereoscopio bajo una campana de flujo laminar, se utilizó la mitad de una caja petri para colocar la hoja infectada y con la aguja de una jeringa se colectó las uredias, las cuales se pusieron en un tubo eppendorf de 1.5 mL con 50 μ L de agua estéril, para que en seguida se conservaran en refrigeración a una temperatura de -20 °C, hasta el proceso de la extracción del ADN.

3.7.2 Extracción de ADN de *H. vastatrix*.

La extracción del ADN se hizo utilizando el método de extracción de Tapia-Tussell *et al.* (2006). El método consistió en colocar 100 μ L de agua estéril a las muestras con uredias, agitar a velocidad máxima durante 5 min, congelar a -80°C durante 10 min, descongelar en termoblock a una temperatura de 60 °C durante 3 min, agitar en vortex a velocidad máxima durante 3 min. Una vez realizado los pasos anteriores se procedió a añadir 800 μ L de buffer de lisis y se incubó durante un

tiempo de 30 min a una temperatura de 65 °C. Se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente y se procedió a añadir 500 µL de cloroformo realizando inversiones suavemente durante 10 minutos.

Cumplido lo anterior se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min y al culminar se transfirió la capa acuosa en un tubo nuevo de eppendorf, posterior a esto se le añadió 700 µL de isopropanol refrigerado, nuevamente se mezcló suavemente por inversión y por último se incubó durante 20 min a -80 °C. Terminado el proceso anterior se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 µL de etanol a una concentración del 70%. Se dejó secar y por último se le agregó al precipitado en 50 µL de agua esteril. Posterior a esto se procedió a cuantificar el ADN, en un espectrofotómetro marca Eppendorf (Modelo AG22331Hamburg) a una absorbancia de 260 nm.

3.7.3 Proceso de secuenciación.

Las muestras se enviaron a secuenciar al Laboratorio MacroGen Inc. en Corea. Las secuencias obtenidas en ambos sentidos fueron analizadas y editadas manualmente con el programa Bioedit.

c) Análisis de diversidad genética

3.7.4 Utilización de los marcadores moleculares ISSR

Se realizó la amplificación utilizando marcadores moleculares ISSR con dos iniciadores (GTG₅ y CAG₅). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de reacción de 25 µL que contenía 50 ng de ADN, 10 X de buffer de PCR (Invitrogen), 0.25 mM de cada dNTP (Invitrogen), 2 mM de MgCl₂, 0.8 µM de iniciadores y 1.25 U *Taq polimerasa* (Invitrogen). La amplificación del ADN se realizó en un termociclador, y constó de un paso de desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguido por 40 ciclos incluyendo, desnaturalización a 95 °C por 40 s, alineación a 50 °C para (GTG)₅ (Figura 11) y a 60 °C para (CAG)₅ (Figura 12), una extensión por 1 min a 72 °C, y una extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos de amplificación fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con tinción de bromuro de etidio, con los productos de las reacciones (GTG)₅ y

(CAG)₅ para las muestras de ADN HVB1, HVB2, HVB3, HVB4 y HVC2, HVC3 y HVC4.

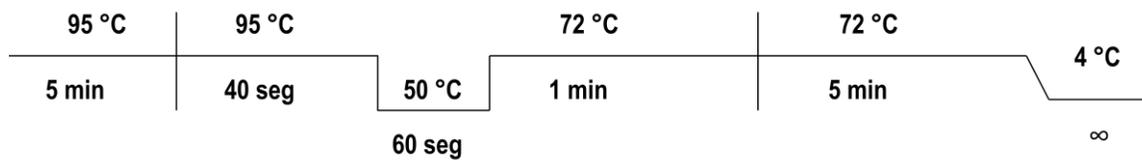


Figura 11. Programa de amplificación para el iniciador GTG₅.

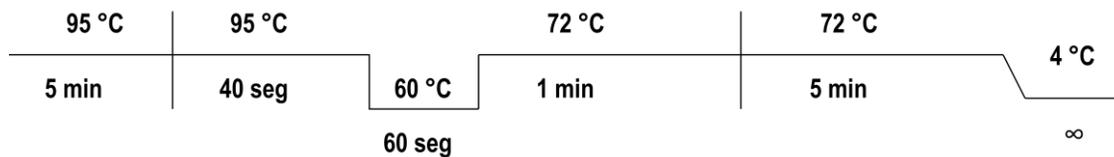


Figura 12. Programa de amplificación para el iniciador CAG₅.

3.7.5 Análisis clusters o de agrupamiento

Se realizó la evaluación visual de los geles. Se generó una matriz binaria para señalar la presencia o ausencia de bandas obtenidas por ISSR. A partir de esta matriz binaria se construyó una matriz de similitud con el software PAST 3.14 utilizando el coeficiente de similitud Dice.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Daño por roya en el cultivo del café.

La roya del cafeto *H. vastatrix*, se encuentra presente en los cafetales del municipio de La Concordia, ocasionando daños en las hojas del café. Los productores identifican la enfermedad por el polvo naranja que se encuentra en el envés de las hojas. La enfermedad aparece en los meses de junio, julio agosto y septiembre, cuando la humedad aumenta. A continuación se presentan los datos obtenidos en campo de severidad en plantas y hojas de café de las variedades bourbon y caturra.

La severidad ocasionada por la roya naranja del café, se pudo cuantificar únicamente durante los tres primeros muestreos, llevados a cabo en los meses de diciembre del año 2015 y enero del año 2016, donde se identificaron los niveles de severidad en hojas del 2 al 4 de acuerdo a la escala presentada por SENASICA 2013(Figura 13), la planta presentó una severidad que llegó al nivel de la defoliación con respecto a la escala presentada por SENASICA, 2013, por lo que se decidió suspender los muestreos (Cuadro 14).

Cuadro 14. Severidad en hojas de café de las variedades bourbon y caturra, durante el ciclo diciembre 2015-enero 2016, tomando como referencia la escala de SENASICA, 2013.

Variedad (Altitud)	Severidad observada		
	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3
Bourbon (800 msnm)	3,03	3,12	3,46
Caturra (800 msnm)	2,9	2,94	3,33
Bourbon (1200 msnm)	2,44	2,68	2,7
Caturra (1200 msnm)	3,06	3,06	3,08
Bourbon (1522 msnm)	2,32	2,58	2,74
Caturra (1522 msnm)	1,76	1,94	2,14

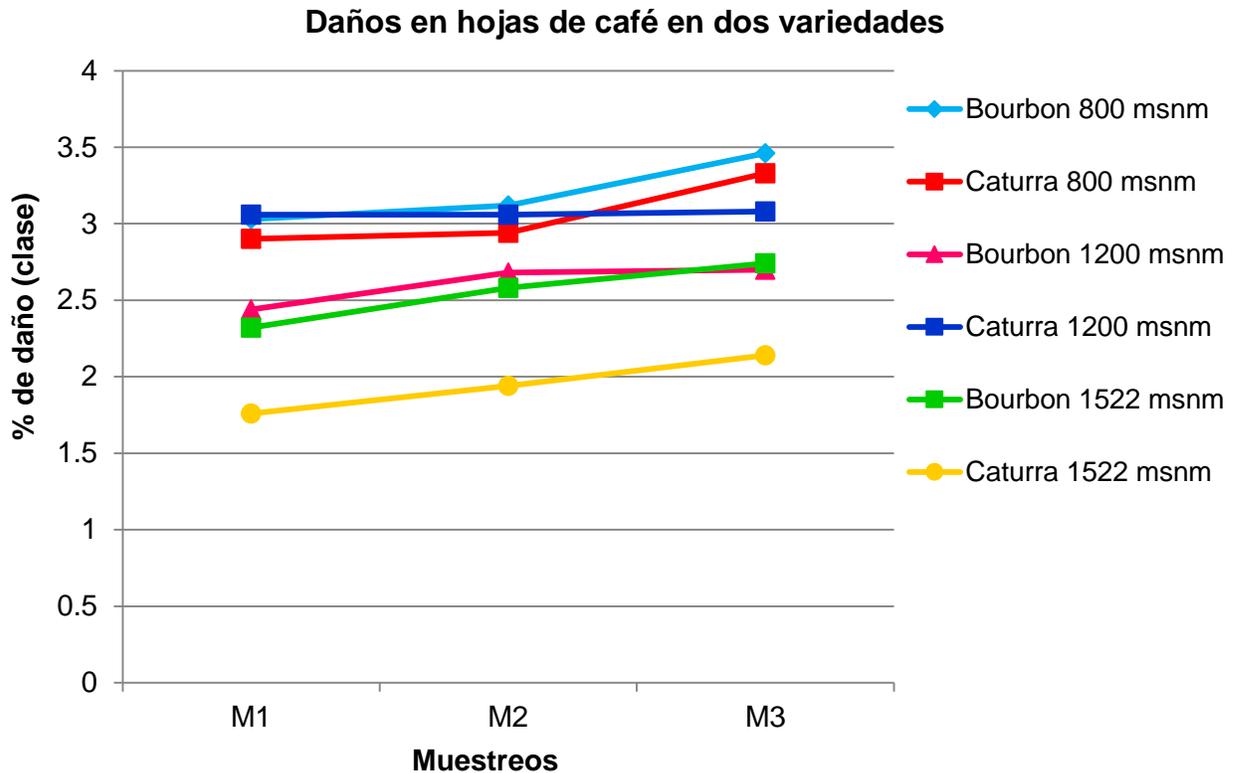


Figura 13. Daños de la roya del café sobre las hojas de las variedades Bourbon y Caturra.

Los resultados de las severidades tanto en hojas y plantas presentadas en los tres muestreos, muestran que para finales del mes de enero se presentó el nivel de severidad para planta mayor (la defoliación) (Figura 14 y 15) y la mayor severidad de las hojas también, además cabe hacer mención que a inicios del mes de febrero se presentó la renovación foliar, de acuerdo a los resultados presentados por SENASICA, las severidades en hojas y plantas se presento de similar forma en los mismo meses en los años 2014 y 2015.



Figura 14. Plantas de café de la variedad bourbon con defoliación a consecuencia de *H. vastatrix*.

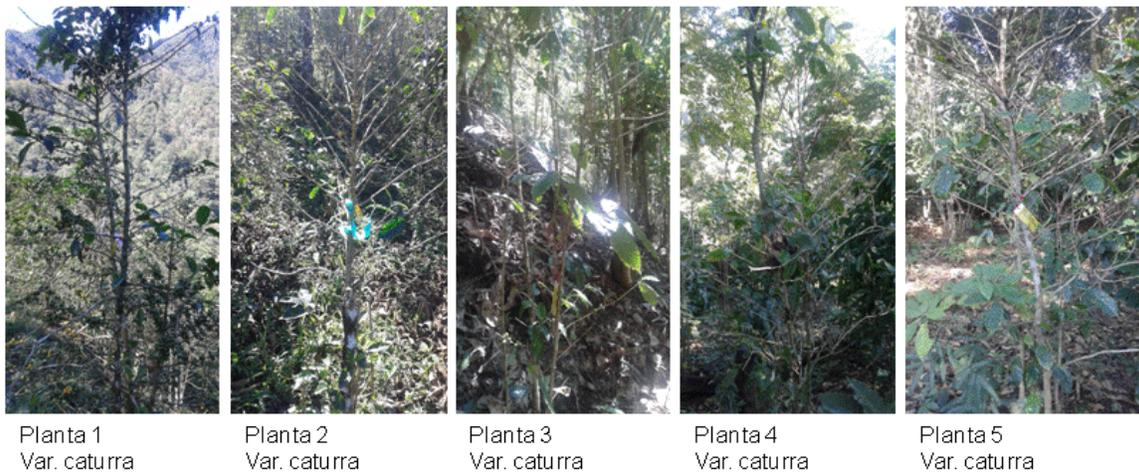


Figura 15. Plantas de café de la variedad caturra con defoliación a consecuencia de *H. vastatrix*.

Rivillas *et al.*, (2011) mencionan que el patógeno necesita para su desarrollo condiciones climáticas apropiadas, entre las que se encuentra la temperatura, la cual debe oscilar entre 17 y 25 °C, de acuerdo a los datos presentados por CONAGUA, en diciembre del 2015 y enero 2016 las temperaturas promedio mensuales fueron de 17.2 y 17.9 °C, a partir de febrero, marzo y abril las temperaturas incrementaron de 18 °C a 24 °C como se muestra en la Figura 16.

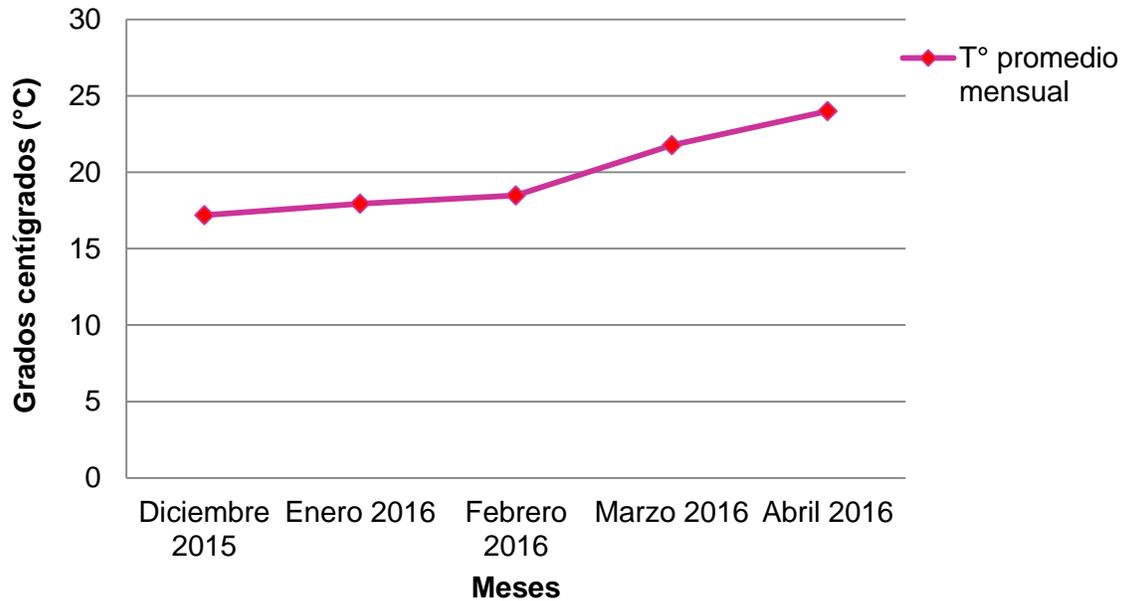


Figura 16. Temperaturas promedios mensuales (diciembre 2015 a abril 2016), estación meteorológica finca Cuxtepeques. CONAGUA 2016.

4.2 Análisis estadístico de daños en hojas y plantas de café.

En el cuadro 15 se observan los daños en las hojas de café en la variedad bourbon cultivadas en tres altitudes diferentes, los resultados muestran que, a la altitud de 800 msnm, a finales del mes de diciembre e inicio del mes de enero existe diferencia significativa con respecto al daño en las hojas de café a causa de la roya (Figura 17). La colecta de las hojas se hizo en la parte alta, media y baja de la planta, los resultados que se obtuvieron demuestran que las hojas colectadas en la parte alta de la planta a 800 msnm presentaron mayor daño a finales del mes de diciembre e inicio del mes de enero, en comparación con las hojas colectadas a 1200 y 1522 msnm, donde el daño se presentó en la parte media de la planta.

Cuadro 15. Análisis de varianza en base del daño en hojas en tres partes de la planta a causa de la roya en la variedad bourbon.

Altitud	Muestreos	Parte de la Alto	Planta Medio	Bajo	Desviación Estándar
800	Diciembre (M1)	19,33	31	25	11,37 b
	Diciembre (M2)	39	29,37	13,5	23,23**a
	Enero (M3)	39,16	27,25	16,16	18,73**a
				C V (%)	2
			error	5	
1200	Diciembre (M1)	20	32,75	28	13,27 b
	Diciembre (M2)	27,33	28,5	26,33	3,73 b
	Enero (M3)	26,5	28,62	27	8,6 b
				C V (%)	1.66
			error	5	
1522	Diciembre (M1)	20	31,12	30,16	8,66 b
	Diciembre (M2)	27,33	33,37	19,83	9,7 b
	Enero (M3)	28,83	29,37	23,66	5,85 b
				C V (%)	2
			Error	5	

** significativamente, con 5 % de nivel estadístico de X².

En el cuadro 16 se observan los daños en las hojas de café en la variedad caturra a tres altitudes diferentes, los resultados señalan que no existe diferencia significativa respecto al daño en las hojas de café a causa de la roya (Figura 17). De acuerdo al método empleado para la colecta de las hojas en la parte alta, media y baja de la planta de café, el daño se presentó de una forma dispersa, para la altitud de 800 msnm el daño mayor se presentó en la parte media de la planta, a la altitud de 1200 el mayor daño se presentó en la parte baja de la planta y a 1522 msnm el daño en las hojas se presentó en la parte media de la planta; todos en el mes de diciembre.

Cuadro 16. Análisis de varianza del daño en hojas en tres partes de la planta a causa de la roya en la variedad caturra.

Altitud	Muestreos	Parte de la planta:			Desviación Estándar
		Alto	Medio	Bajo	
800	Diciembre (M1)	24,5	29,25	28,16	3,65 b
	Diciembre (M2)	21,16	28,87	24	2,75 b
	Enero (M3)	33,16	26,75	22,83	6,05 b
				C V (%)	1
			error	5	
1200	Diciembre (M1)	18,66	29,25	34	13,1 b
	Diciembre (M2)	23,16	33	24,5	5,84 b
	Enero (M3)	29,16	25,87	28	3,07 b
				C V (%)	1.33
			error	5	
1522	Diciembre (M1)	21,66	31,75	26,83	6,44 b
	Diciembre (M2)	24,16	27,37	31,33	4,82 b
	Enero (M3)	30,33	24,25	29	2,71 b
				C V (%)	1
			error	5	

** significativamente, con 5 % de nivel estadístico de X².

Gil *et al.* (1990), mencionan que las hojas con mayor capacidad de recepción para la roya, son las hojas jóvenes flexibles y suaves al tacto con los estomas desarrollados, hojas denominadas “terciopelo”. Además, se atribuyen algunos factores tales como una fuerte intensidad luminosa antes de que se realice la deposición (acompañada de una fuerte temperatura) (Eskes, 1982a; Eskes, 1982b). Otros factores tales como la gran carga de los frutos o una humedad del suelo elevada aumentan la densidad de lesiones (Eskes y Souza, 1981; Hoogstraten *et al.*, 1983).

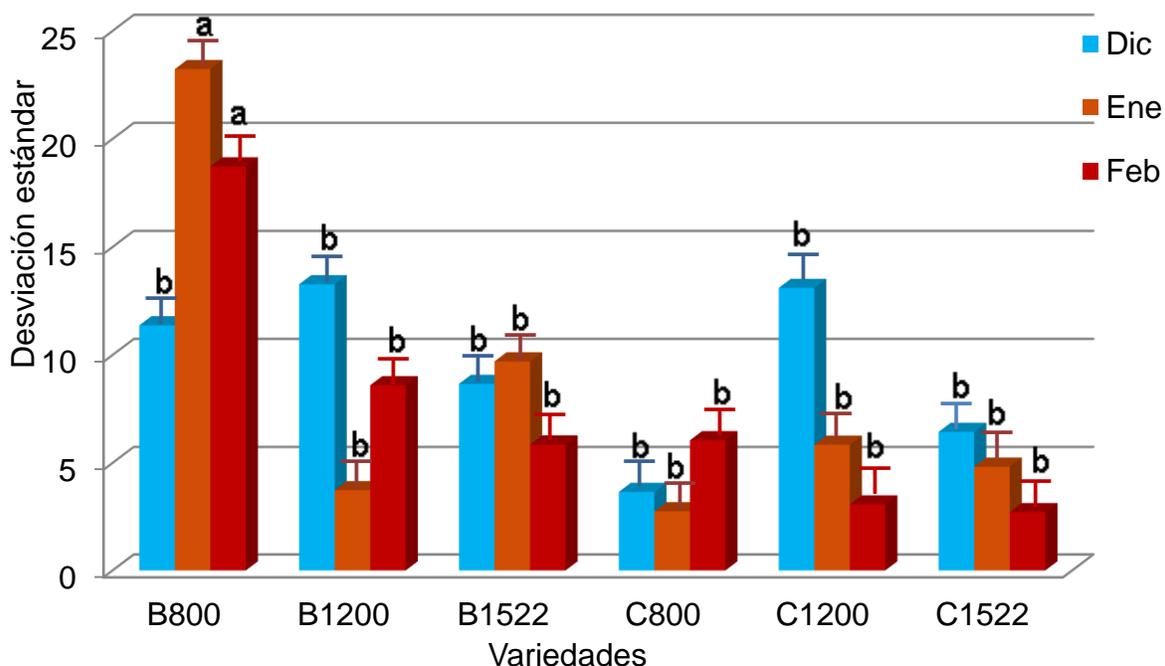


Figura 17. Desviación estándar de daños en hojas en dos variedades Bourbon (B) y Caturra (C), a tres altitudes 800, 1200 y 1522 msnm.

Los resultados presentados en el cuadro 17 del daño en las plantas a causa de la roya del café, muestran que a 800 msnm de altitud no existe diferencia significativa entre ambas variedades de café, el daño es igual para las ambas variedades, sin embargo en las altitudes de 1200 y 1522 msnm existe diferencia significativa entre ambas variedades.

Cuadro 17. Análisis de varianza de daño en plantas a causa de la roya del café entre altitudes.

Altitud	Bourbon	Caturra	Error	Valor estadístico calculado
800 msnm	7.5	7.5	5	3.75 b
1200 msnm	6	9	5	5.1** a
1522 msnm	8	7	5	3.9** a
CV (%)	0.5	0.5		

**significativamente, con 5 % de nivel estadístico de X^2 .

En el cuadro 18 se presentan los resultados de los daños de las plantas por altitud, se observa que existe diferencia significativa a diferentes altitudes en la variedad bourbon, así también existe diferencia significativa entre cada altitud para la variedad caturra.

Cuadro 18. Análisis de varianza de daño en plantas a causa de la roya del café en dos variedades.

Variedad	800 msnm	1200 msnm	1522 msnm	Valor estadístico calculado
Bourbon	13	8	9	17.8 **
Caturra	11.5	11	7.5	16.9 **
Error	5	5	5	
CV (%)	-1	1	-1	

** significativamente, con 5 % de nivel estadístico de X^2 .

4.3 Identificación molecular de *H. vastatrix*

Del ADN extraído, se amplificaron las regiones ITS del ADNr y se enviaron a secuenciar. Se obtuvieron fragmentos de 900 pb aproximadamente de los aislamientos (HVB1, HVB2, HVB3 y HVB4) de la variedad Bourbon, así como de los aislamientos (HVC2, HVC3 y HVC4) de la variedad Caturra, colectadas de plantaciones a 800 msnm.

Se realizó la amplificación de la región ribosomal del aislamiento HVB4 utilizando los iniciadores ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990), se utilizó dicho aislamiento ya que era el que contenía mayor pureza y cantidad de ADN para amplificar. Una vez amplificada esta esta región, la cual ha sido utilizada ampliamente para la identificación de especies de hongos y otros grupos de organismos. La región del ADN amplificado aislado se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) teñidos con bromuro de etidio. Las bandas obtenidas se purificaron y se secuenciaron.

4.4 Caracterización genética de *H. vastatrix*.

Las secuencias editadas fueron comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos del NCBI, mediante la técnica de BLASTn. Los resultados obtenidos confirman la identidad de los aislamientos colectados (Figura 16 y 17).

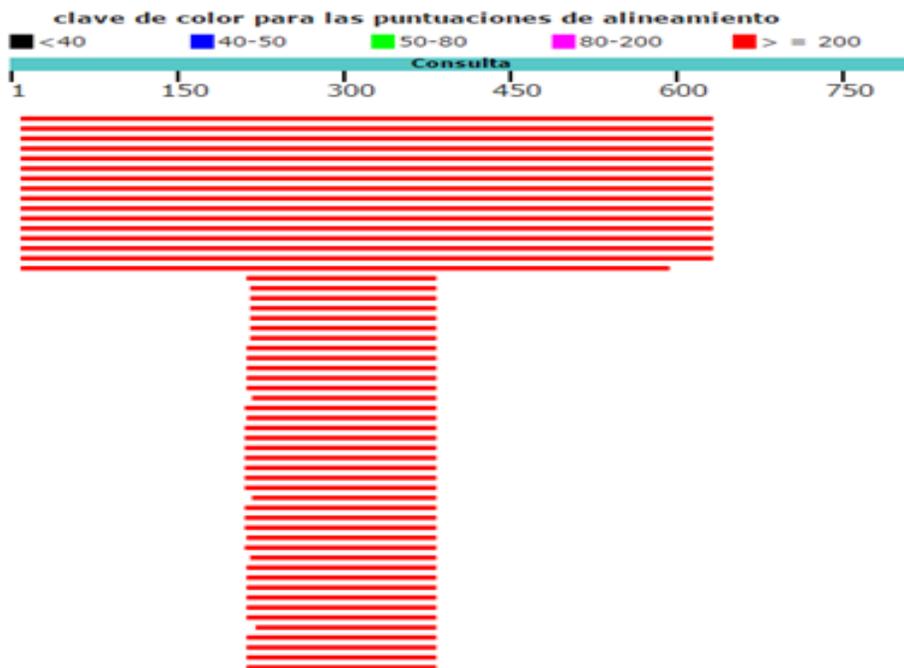


Figura 18. Alineamiento de la Secuencia B41-ITS1



Figura 19. Alineamiento de la Secuencia B41-ITS4

Al realizar la comparación de la secuencia de DNA de B41-ITS 1 en el GenBank utilizando búsqueda BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI), se observó que la secuencia bajo estudio tiene un 91% de identidad con el aislado *Hemileia vastatrix* CT 2 N, con un 76% de cobertura entre las secuencias. Nuestra secuencia también alineó con las secuencias de los aislados *Hemileia vastatrix* CTInNa3, *Hemileia vastatrix* Racell-1126, *Hemileia vastatrix* raceXXII-

535, *Hemileia vastatrix* CTSol 1, con el mismo porcentaje de cobertura (76 %) y una identidad del 90 %, lo que confirma la identidad de los aislados bajo estudio.

Cuadro 19. Resultado de los análisis BLASTn en la secuencia B41-ITS 1

Secuencias (NCBI)	Cobertura de ADN de interés	Max. identidad
<i>Hemileia vastatrix</i> isolate CT 2 N	76 %	91 %
<i>Hemileia vastatrix</i> isolate CTInNa3	76 %	90 %
<i>Hemileia vastatrix</i> isolate Racell-1126	76 %	90 %
<i>Hemileia vastatrix</i> isolate raceXXII-535	76 %	90 %
<i>Hemileia vastatrix</i> isolate CTSol 1	76 %	90 %

De igual forma al comparar la secuencia B41-ITS 4 de DNA en el GenBank utilizando búsqueda BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI), se obtuvo que los resultados de la secuencia se alinean con los aislados *Hemileia vastatrix* CTInNa2, *Hemileia vastatrix* Racell-1126, *Hemileia vastatrix* raceXXII-535, *Hemileia vastatrix* CT 13 v, *Hemileia vastatrix* CTSol con un porcentaje de cobertura del 62 % del cual el 91% es idéntico a la secuencia del NCBI (Cuadro 20)

Cuadro 20. Resultados de los análisis de BLASTn en la secuencia B41-ITS 4

Secuencias (NCBI)	cobertura de ADN de interés	Max identidad
<i>Hemileia vastatrix</i> isolate CTInNa2	62 %	91 %
<i>Hemileia vastatrix</i> isolate Racell-1126	62 %	91 %
<i>Hemileia vastatrix</i> isolate raceXXII-535	62 %	91 %
<i>Hemileia vastatrix</i> isolate CT 13 v	62 %	91 %
<i>Hemileia vastatrix</i> isolate CTSol 1	62 %	91 %

4.5 Análisis de diversidad genética

Para efectos de la investigación se realizó una caracterización molecular del ADN de *H. vastatrix*, se seleccionaron las muestras de la variedad bourbon, (HVB1,

HVB2, HVB3 y HVB4) y de la variedad caturra (HVC2, HVC3 y HVC4) por ser las que presentaron mayor concentración de ADN.

Todas las muestras generaron bandas de amplificación visibles para los dos ISSR, para el iniciador CAG₅ se generó 36 bandas diferentes para las muestras de ADN de la variedad bourbon y 26 para las muestras de ADN de la variedad caturra, obteniendo un total de 62 bandas generadas con este iniciador (Figura 20); para el iniciador GTG₅ se generó 25 bandas diferentes para las muestras de ADN de la variedad bourbon y 20 para las muestras de ADN de la variedad caturra, obteniendo un total de 45 bandas generadas con este iniciador como se presenta en la figura 21.

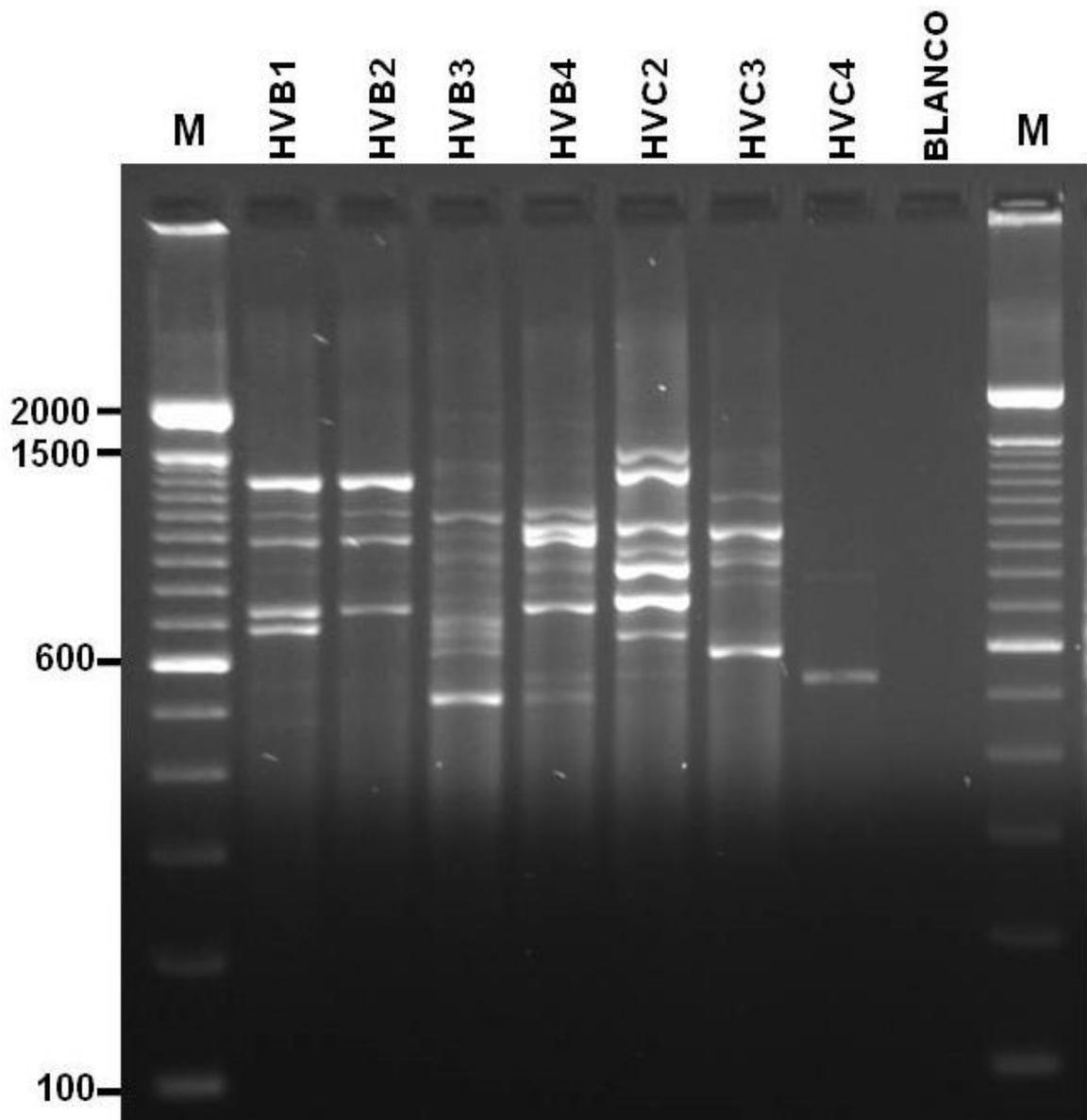


Figura 20. Huellas de ADN de *Hemileia vastatrix* obtenidas con la técnica AP-PCR con el iniciador CAG₅, M= marcador molecular de 100pb; HVB1-HVB4= muestras de ADN de la variedad Bourbon y HVC2-HVC4= muestras de ADN de la variedad catarra.

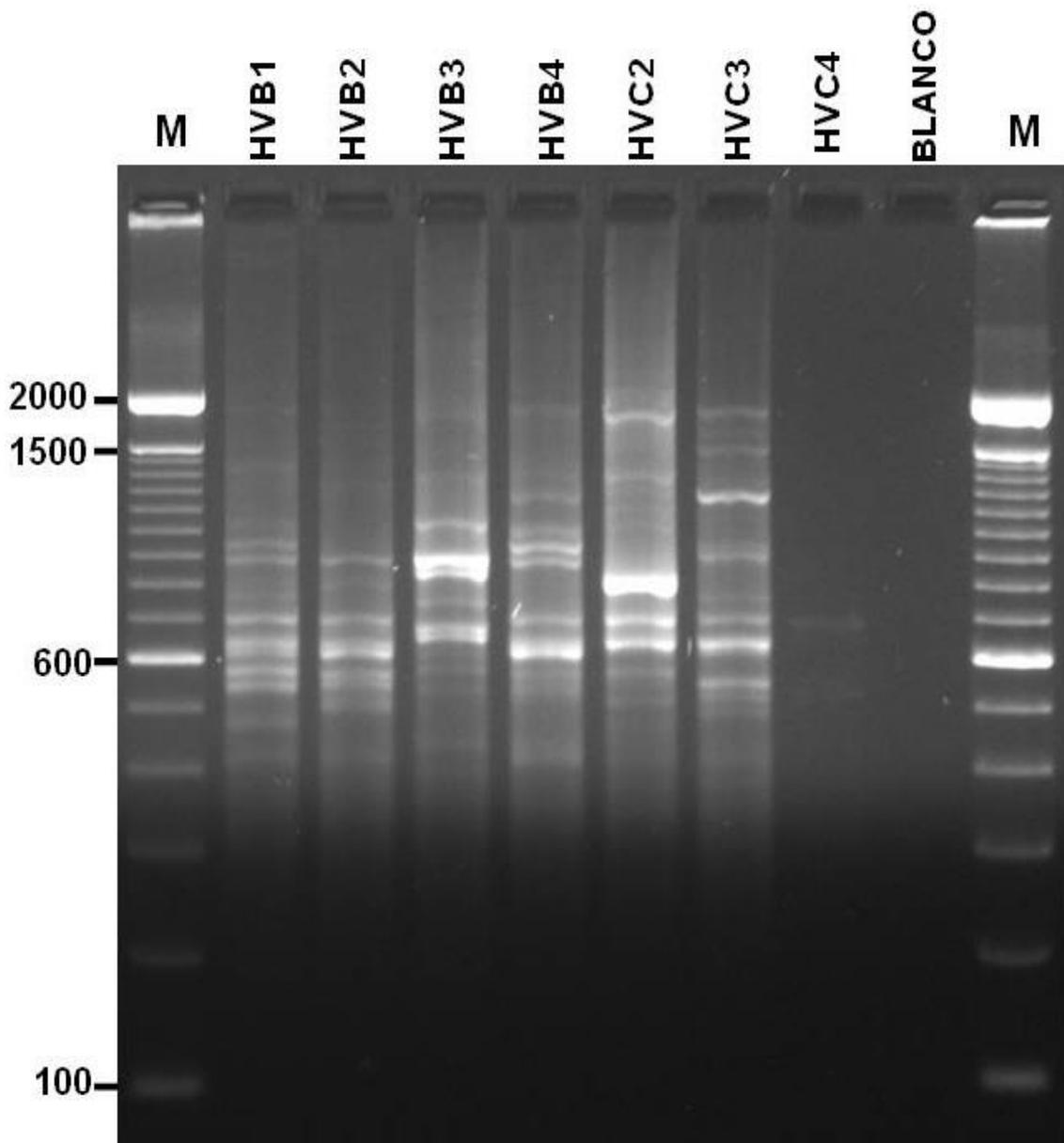


Figura 21. Huellas de ADN de *Hemileia vastatrix* obtenidas con la técnica AP-PCR con el iniciador GTG₅, M= marcador molecular de 100pb; HVB1-HVB4= muestras de ADN de la variedad Bourbon y HVC2-HVC4= muestras de ADN de la variedad caturra.

4.5.1 Análisis de similitud o tipificación

Con base en los patrones de las bandas, se realizó una matriz en código binario, dentro de una tabla en el programa PAST 3.14 y el empleo del coeficiente de similitud Dice. Las diferencias reveladas en el dendrograma (Figura 22), permiten diferenciar las cepas, y clasificarlas dentro de subgrupos, los cuales presentan un tipo de similitud en iniciadores diferentes.

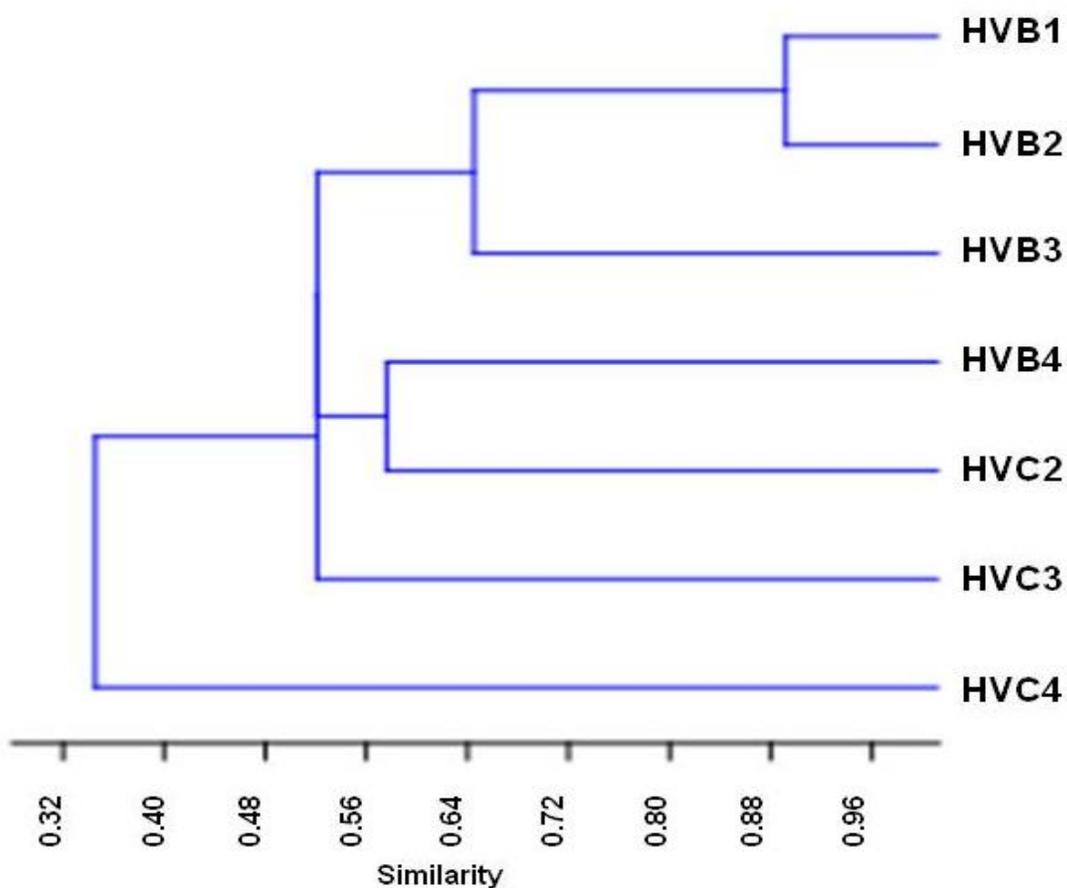


Figura 22. Dendrograma de diversidad y relación entre aislamientos de *Hemileia vastatrix* utilizando los cebadores (CAG)₅ y (GTG)₅ con el programa PAST. (HVB1=aislamiento de *Hemileia vastatrix* Bourbon planta 1, HVB2=aislamiento de *Hemileia vastatrix* Bourbon planta 2, HVB3=aislamiento de *Hemileia vastatrix* Bourbon planta 3, HVB4=aislamiento de *Hemileia vastatrix* Bourbon planta 4; HVC2=aislamiento de *Hemileia vastatrix* Caturra planta 2, HVC3=aislamiento de *Hemileia vastatrix* Caturra planta 3, HVC4=aislamiento de *Hemileia vastatrix* Caturra planta 4).

La relación genética varía entre 0.32 y 0.96, además se observan tres grupos, de los cuales el primero agrupa a HVB1, HVB2 y HVB3, pertenecientes a aislamientos de la variedad Bourbon con un coeficiente de similitud de 0.66; un segundo grupo constituido por HVB4, HVC2 y HVC3 con una similitud de 0.60; y un tercer grupo constituido únicamente por HVC4, que presenta una similitud de 0.31 (Cuadro 21).

Cuadro 21. Índice de similitud y distancia de aislamientos de *H. vastatrix*

	HVB1	HVB2	HVB3	HVB4	HVC2	HVC3	HVC4
HVB1	1	0.88	0.66666667	0.4516129	0.5	0.60606061	0.31578947
HVB2	0.88	1	0.6	0.42857143	0.48484848	0.53333333	0.375
HVB3	0.66666667	0.6	1	0.55555556	0.63414634	0.68421053	0.33333333
HVB4	0.4516129	0.42857143	0.55555556	1	0.56410256	0.44444444	0.27272727
HVC2	0.5	0.48484848	0.63414634	0.56410256	1	0.53658537	0.37037037
HVC3	0.60606061	0.53333333	0.68421053	0.44444444	0.53658537	1	0.33333333
HVC4	0.31578947	0.375	0.33333333	0.27272727	0.37037037	0.33333333	1

Los resultados encontrados en la investigación de las diferencias genéticas de los aislamientos de *Hemileia vastatrix*, en los cuales se puede observar que con el empleo de los marcadores moleculares ISSR se obtuvo una clara diferencia entre las muestras evaluadas lo que permite afirmar que existe diversidad genética del patógeno. Estudios diversos realizado en países como Brasil, Colombia, Portugal entre otros, han permitido conocer un poco más sobre el patógeno, como por ejemplo se ha encontrado diversidad genética de *H. vastatrix* con el empleo de marcadores RAPD (Gouveia *et al.*, 2005). También con la aplicación de secuencias ITS (Cristancho *et al.*, 2007) y la aplicación de marcadores ISSR de especies relacionadas al hongo (Cristancho y Escobar 2008). Cabral *et al.*, 2015, encontraron en su estudio que existe diversidad genética del patógeno con el empleo de marcadores AFLP; (Gouveia *et al.*, 2005) también empleo los marcadores anteriores mencionados y encontró en su estudio que existe diversidad genética. Para México, aún no se realizan estudios referentes a caracterización genotípica y fenotípica del patógeno, por lo que se requiere que se realice más estudios para conocer a dicho patógeno el cual es de suma importancia debido a los daños que está provocando en las producciones de dicho cultivo.

5 CONCLUSIÓN

La roya del café (*Hemileia vastatrix*) es una enfermedad que daña severamente a este cultivo, ya que de acuerdo a las evaluaciones realizadas tomando en cuenta las escalas de la severidades tanto en hojas y plantas se observó que, la roya es más severa en la variedad Bourbon que en la variedad caturra a los 800 msnm, además el daño es más severo en la parte alta de la planta. Al comparar las severidades provocadas por el patógeno en altitudes diferentes, esta presenta severidades diferentes para cada altitud y en cada variedad. Debido a la época de muestreo en que se realizo dicha investigación se obtuvo que la defoliación de la planta se presentó a inicios del mes de febrero, así como los máximos niveles de severidad del patógeno presente en las hojas.

En la caracterización de *Hemileia vastatrix*, primeramente el ADN utilizando el protocolo de extracción de Tapia-Tussell *et al.* (2006), el cual resulto muy eficiente ya que se obtuvo un ADN integro y de buena calidad; además con la realización de la amplificación de las regiones ITS del ADNr, se logró confirmar mediante la secuenciación y el empleo del BLAST de nucleótidos del NCBI que el ADN de los aislamientos colectados pertenecían a *Hemileia vastatrix*. En la evaluación genética de las muestras estudiadas (diversidad genética) en conocer si es el mismo patógeno que daña a la variedad bourbon y caturra, se obtuvo una clara y amplia diferencia con la aplicación de los dos iniciadores (GTG₅ y CAG₅), demostrando que son patógenos muy diferentes los que dañan a ambas variedades.

Por lo que, la aplicación de los marcadores moleculares ISSR, fueron muy eficientes en esta investigación debido a que, permitieron obtener diferencias claras entre el patógeno para ambas variedades mediante su caracterización del mismo.

6 LITERATURA CITADA

APS. 2011. The American Phytopathological Society. Coffee rust (*Hemileia vastatrix*). En línea: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/CoffeeRust.aspx>. Barrera F. 2007. Manejo holísticos de plagas: más allá de MIP. Memorias del XXX Congreso Nacional de Centro Biológico Simposio de IOBC, Mérida, Yucatán.

Avelino, J., Muller, R.A., Cilas, C., y Velasco Pascual, H., 1991. Development and behavior of coffee orange rust (*Hemileia vastatrix* Berk. and Br.) in plantations undergoing modernization, planted with dwarf varieties in South-East Mexico. *Café Cacao Thé*. 35(1): 21-37.

Avelino, J., Toledo, J.C., y Medina, B., 1995. Evaluación de épocas y número de aplicaciones de óxido de cobre para el control de la roya anaranjada del cafeto (*Hemileia vastatrix*) en una finca del suroeste de Guatemala, in: XVI Simposio sobre caficultura latinoamericana, IICAPROMECAFE: Managua, Nicaragua

Arnold M. 1997. Natural Hybridization and Evolution. Oxford University Press, New York.

Barrera J.F. 2002. Tres plagas de café en Chiapas. El Colegio de la Frontera Sur, México. Pag. 7-10, 17-20, 45-48.

Barrera, J. F., M. Parra Vázquez, O. B. Herrera Hernández, R. Jarquín Gálvez & J. Pohlan. 2004. Plan Estatal de Manejo Agroecológico del Café en Chiapas: Guía hacia una caficultura sustentable. Comisión para el Desarrollo y Fomento del café de Chiapas y El Colegio de la Frontera Sur. Tapachula, Chiapas, México. 164 p. Beaumont MBE. Genetic diversity and introgression in the Scottish wildcat. 2001. *MolecularEcology*.;319-336.

Barrera F. 2007. Manejo holísticos de plagas: más allá de MIP. Memorias del XXX Congreso Nacional de Centro Biológico- Simposio de IOBC, Mérida Yucatán

Beaumont B. 2001. Genetic diversity and introgression in the Scottish wildcat. *Molecular Ecology*;319-336.

Berthaud J., Charrier A. 1988. Genetic resources of *Coffea*. Elsevier Applied science.

Burdon J. 1993. Genetic variation in pathogen populations and its implications for adaptation to host resistance in: Jacobs. Th: Parlevliet. J. E.(Eds.).Durability of disease resistance. Dordrecht. Kluwer Academic Publisher. 41-56 pp.

CABI. 2010. Crop Protection Compendium (Alpha). Datashment. <http://cabi.org/cpc/>

CABI. 2013. Crop Protection Compendium. CAB International, Wallingford, UK, 2013. Consultado en línea: <http://www.cabi.org/compedia/cpc/>. Fecha de consulta: 17 de enero 2013.

Cabral, P.G.C., Zambolim, E.M., Zambolim, L., Lelis, T.P., Capucho, A.S., Caixeta, E.T. 2009. Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. *Australasian Plant Dis. Notes* 4: 129–130.

Cabral, P.G.C.E., Maciel-Zambolim, S.A.S., Oliveira, E., Caixeta T. and L. Zambolim. 2015. Genetic diversity and structure of *Hemileia vastatrix* populations on *Coffea* spp. *PLANT PATHOLOGY*. 1-8 pp

Caicedo C.B.L., Cortina G.H.A., Rouxl, J., Wingfield, M.J. 2013. New coffee (*Coffea arabica*) genotypes derived from *Coffea canephora* exhibiting high levels of resistance to leaf rust and *Ceratocystis* canker. *Tropical Plant Pathology* 38(6): 485-494.

Campos, V.P., Srivapalan, P., Gnanapragasam, N.C. 1990. Nematode parasites in coffee, cocoa and tea. *In* Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Eds. M. Luc; R.A. Sikora; J. Bridge., Wallington, Reino Unido, CAB International. p. 387-430.

Capucho, AS; Zambolim, EM; Freitas, RL; Haddad, F; Caixeta, ET; Zambolim, L. 2012. Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on Coffea Arabica Catimor derivatives in Brazil. Australasian Plant Dis. Notes 7:189– 191. DOI: 10.1007/s13314-012-0081-7

Carrion, G. y Rico-Gray, V., 2002. Mycoparasites on the coffee rust in Mexico. Fungal Diversity. 11: 49-60.

Carrion G. 2006. La naturaleza de las interacciones entre la roya del cafeto y sus hongos hiperparasitarios. Tesis de doctorado (biológica). Facultad de Ciencias de la UNAM. 111 pp.

Castro F, R, Charles E, H, and Barreto, RW. 2009. Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. Tropical Plant Pathology, 34 (2): 108-113.

CEFP (Centro de Estudios de las Finanzas Publicas). 2001. El mercado del café en México. Centro de Estudios de las Finanzas Públicas, Cámara de Diputados H. Congreso de la Unión. Clave de Proyecto: CEF/054/2001.

Costa Rica. 1989. Curso fundamentos de la cafecultura moderna. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanzas (CATIE) Turrialba, Costa Rica, 47 pp.

Costa Rica. 1984. Manual de Recomendaciones para el cultivo del café. Editor Sánchez Vindos. 6ª. Del Instituto del café de Costa Rica. MAG. San Jose Costa Rica. 121 pp

Cristancho-Ardila, MA; Escobar-Ochoa, C; Ocampo-Muñoz, JD. 2007. Evolución de razas de *Hemileia vastatrix* en Colombia. Cenicafé 58(4): 340-359.

Cristancho MA y Escobar C. (2008) Transferability of SSRs markers from related Uredinales species to the coffee rust, *Hemileia vastatrix*. Genet Mol Res 7:1186-1192.

Davis A., Maurin O., Chester M., Mvungi F., Fay F. 2006. Phylogenetic relationships in *Coffea* (Rubiaceae) inferred from sequence data. 21e Colloque: Association Scientifique Internationale du Café, Montpellier: 56.

Davis A, Rakotonasolo, F. 2008. A taxonomic revision of the *Coffea* alliance: nine remarkable *Coffea* species from western Madagascar. Botanical Journal of the Linnean Society.;158(3):355-390.

De Jong, E., Eskes, A., Hoogstraten, J., y Zadoks, J., 1987. Temperature requirements for germination, germ tube growth and appressorium formation of urediospores of *Hemileia vastatrix* European Journal of Plant Pathology. 93(2): 61-71

Enríquez E., S. Bejarano y V. Vila. 1975. Biología de *Leucoptera coffeella*-Morfología, Ciclo Biológico y Comportamiento de *Leucoptera coffeella*. Disponible en:<http://www.revperuentomol.com.pe/publicaciones/vol18/BIOLOGIA-DE-LEUCOPTERA-COFFEELLA79.pdf>.

EPPO. 2012. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Consultado en línea: <http://www.eppo.int>

Eskes A.B. 1982a. The use of leaf disk inoculations in assessing resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). Netherland Journal of Plant Patology. 88(4): 127-147.

Eskes, A., 1982. The effect of light intensity on incomplete resistance of coffee to *Hemileia vastatrix*. Netherlands Journal of Plant Pathology. 88(5): 191-202.

Eskes, A.B. y Souza, E.Z., 1981. Ataque da ferrugem em ramos come sem produção, de plantas do cultivar catuaí, in: 9º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, IBC: Sao Lourenzo, Minas Gerais, Brasil. p. 186-188.

FAO, 2009. Normas Internacionales para las Medidas Fitosanitarias. No. 1 a 32. Food & Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia. 473 p.

FAO. Food and agriculture Organization of the United Nations 2011. Organizacio de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentacion. Directrices para prevenir la formación de moho en el café. Disponible en: ftp://ftp.fao.org/ag/agn/coffee/guidelines_final_es.

Flor H.1995. Host-parite interaction in fla-rust, its genetics and other implications. *Phytopatology* 45(12)680-685.

Galindo, G. Olvera, L. y Contreras, C. 2008. Metodología para determinar zonas de peligro al ataque de la plaga de langosta centroamericana (*Schistocerca piceifrons piceifrons* walter, 1870) apoyados en sensores de alta resolución y SIG. Estudio de caso: la Huasteca Potosina-México. En Teorías y métodos en geosistemas. Estudios regionales. Raúl Aguirre Coordinador. Instituto de Geografía de la UNAM, Plaza y Valdez. pp.67-89.

Gichuru E., Ithiru J., Silva M., Pereira P., Varzea P. (2012). Additional physiological races of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) identified in Kenya. *Tropical Plant Pathology* 37 (6): 424-427.

Gouveia M., Ribeiro A., Várzea, V., Rodrigues J. 2005.Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. *Mycologia*, 97: 396–404.

Herrera J., Combes M., Anthony F., Charrier A y Lashermes P. 2002. Introgression into the allotetraploid coffee (*Coffea arabica* L.): segregation and recombination of the *C. canephora*; genome in the tetraploid interspecific hybrid (*C. arabica* x *C. canephora*). *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 104(4):661-668.

Hoogstraten, J.G.J., Toma-Braghini, M., y Eskes, A.B., 1983. Influencia da umidade do solo e umidade relativa do ar sobre a resistencia do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*, in: 10° Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, IBC/GERCA: Poços de Caldas, Minas Gerais, Brasil. p. 110-111.

Hirst, J.M. y Schein, R.D. 1965. Terminology of infection processes. *Phytopathology*, v.55, p.1157.

INMECAFE (Instituto Mexicano del Café). 1990. El cultivo de cafeto en México. Mexico, Xalapa, Veracruz.

Kushalappa, A.C., Akutsu, M., y Ludwig, A., 1983. Application of survival ratio for monocyclic process of *Hemileia vastatrix* in predicting coffee rust infection rates. *Phytopathology*. 73(1): 96-103.

Levin D., Francisco-Ortega J., Jansen R. 1996. Hybridization and the Extinction of Rare Plant Species *Conservation Biology*. 10(1):10-16.

Liogier A. 1997. Descriptive flora of Puerto Rico and adjacent islands. Vol. 5. Editorial de la Universidad de Puerto Rico. 436 pp.

Mahé L., Le Pierrès D., Combes M., Lashermes P. 2007. Introgressive hybridization between the allotetraploid *Coffea arabica* and one of its diploid ancestors, *Coffea canephora*, in an exceptional sympatric zone in New Caledonia. *Genome*. 50(3):316-324.

McCain, J.W. y Hennen, J.F., 1984. Development of the uredinal thallus and sorus in the orange coffee rust fungus, *Hemileia vastatrix*. *Phytopathology*. 74(6): 714-721.

Monroig M.F. 2010 Ecos del café. Disponible en <http://academic.uprm.edu/mmonroig/id4.htm>

Moreno R., y Alvarado A. 2000. La Variedad Colombia 20 años de adopción y comportamiento frente a nuevas razas de la roya del cafeto. *Cenicafé. Boletín técnico* (22): 1-32

Moreno. R. et-al., 2000. La variedad Colombia; veinte años de adopción y comportamiento frente a nuevas razas de la roya del cafeto. *Boletín Técnico* (22): 1-32.

Moreno R. 2004. Obtención de variedades de café con resistencia durable a enfermedades usando la diversidad genética como estrategia de mejoramiento. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales; 28:187-200.

Morfing A., Vizcaino A., Castillo G. 2006. El cultivo de café (*Coffea arabica* L.) en Colima. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Folleto Técnico Núm. 1. Campo experimental. Ticoman. 85 pp.

Muller, R.A., 1980. Contribution à la connaissance de la phycomycocénose, *Coffea arabica* L., *Colletotrichum coffeanum* Noack sensu Hindorf, *Hemileia vastatrix* B. et Br., *Hemileia coffeicola* Maublanc et Roger. Bulletin IFCC. Vol. 15: IFCC. 174 p.

Muthappa, B.N., 1980. Behaviour of *Hemileia vastatrix* during unfavourable weather. Journal of Coffee Research. 10(2): 31-35.

Nolasco M. 1985. Café y Sociedad en México. Centro de Ecodesarrollo. Pág. 108-109, 412-413.

Nunes C., Maffia L., Mizubuti E., Brommonschenkel S y Silva J. 2009. Genetic diversity of populations of *Hemileia vastatrix* from organic and conventional coffee plantations in Brazil. Australasian Plant Pathology, 38, 445–452

Nutman, F.J., Roberts, F.M., y Clarke, R.T., 1963. Studies on the biology of *Hemileia vastatrix* Berk & Br. Transactions of the British Mycological Society. 46(1): 27-44

Oerke C. 2005. Crop losses to pests. J. Of Agr. Sci. Pág. 1-3.

OIC. 2008. (Organizacion Internacional de Cafe). 2009. Estadísticas en <http://www.ico.org>

Ownley, B.H., Gwinn, K.D., y Vega, F.E. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. Biocontrol. 55 (1): 113-128

Pearl H., Nagai C., Moore P., Steiger D., Osgood R. y Ming R. 2004. Construction of a genetic map for arabica coffee. TAG Theoretical and Applied

Perez R. 2005. Impacto económico por daño de la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae) en Santiago Choapan, Oaxaca. Tesis de licenciatura. Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma de Chapingo.

Pimentel, D., McLaughlin, L., Zepp, A., Lakitan, B., Kraus, T., Kleinman, P., Vancini, F., Roach, W.J., Graap, E., Keeton, W.S., Selig, G. 1991. Environmental and economic effects of reducing pesticide use. *BioScience*, 41: 402-409.

Rayner W. 1961. Germination and penetration studies on coffee rust (*Hemileia vastatrix* B. & Br.). *Annals of Applied Biology* 49, 497-505.

Rivillas C., Serna C., Cristancho M. y Gaitán A. 2011. La Roya del Cafeto en Colombia (Impacto, manejos y costos del control, resultados de investigación). Centro Nacional de Investigación del Café (Cenicafé). Chinchiná, Caldas, Colombia. 53 pp.

Rodriguez J., Bettencourt A., Rijo L. 1975. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. *Annual Review of Phytopathology* 13:49-70.

- , Va'rzea P., Silva C., Guerra L., Rocheta M., Marques V. 2001. Recent advances on coffee leaf rust. In: Prakash NS, Raghuramulu Y, Devasia J, eds. *Proceedings of the International Scientific Symposium on Coffee*. Bangalore Central Coffee Research Institute, Coffee Board. p 179–193.

Rozo Y., Escobar C., Gaitán A. and Cristancho M. 2012. Aggressiveness Genetic Diversity of *Hemileia vastatrix* During an Epidemic in Colombia. *Journal of Phytopathology* 160:732–740

SAGARPA. 2013. México, pionero en el control de la roya del cafeto con innovación y transferencia de tecnología orgánica. <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2013B421.aspx>

SCOPE. 2013. Sistema coordinado para la Vigilancia de Plagas Reglamentadas. <https://scopepublico.zedxinc.com/cgi-bin/index.cgi>

SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2013. Campañas nacionales. Servicio nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. En <http://senasicaw.senasica.sagarpa.gob.mx/campana.nacionales.html>

SENASICA. 2014. Vigilancia Epidemiológica en el cultivo de café. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Disponible en <http://www.senasica.gob.mx>.

SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2015. Campañas nacionales. Servicio nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Disponible en <http://www.senasica.gob.mx>.

SIAP (2014). Sistemas Producto Café. Descripción consultada el 08 de diciembre de 2014 en <http://w4.siap.gob.mx/sispro/portales/agricolas/cafe/Descripcion.pdf>

SIAP (2015). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [En línea]. Consultado Junio 2015. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>

SIAP (2016). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [En línea]. Consultado Junio 2015. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>

SIAP (2017). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [En línea]. Consultado Junio 2015. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>

SINAVEF. 2010. Reporte anual 2009. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. SAGARPA.

SINAVEF. 2012. DGSV-CNRF. Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria de la Roya del Café 2012.

SINAVEF. 2013. DGSV-LANREF. Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria de la Roya del Café 2013. (<http://royacafe.lanref.org.mx/index.php>).

SINAVEF. 2014. DGSV-LANREF. Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria de la Roya del Café 2014. (<http://royacafe.lanref.org.mx/index.php>).

SINAVEF, 2015.DGSV-LANREF. Escalas de severidad de roya del café en hoja y planta. En línea: <http://www.royacafe.lanref.org.mx/documentos/EscalaseveridadDefoliacionPlantayHoja.pdf>.

Silva MC, Várzea V, Guerra-Guimarães L, Azinheira HG, Fernandez D, Petitot AS, Bertrand B, Lashermes P, Nicole M. (2006) Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18:119-147.

Staver, C., Guharay, F., Monterroso, D., y Muschler, R.G., 2001. Designing pest suppressive multistrata perennial crop systems: shade-grown coffee in Central America. *Agroforestry Systems*. 53: 151-170

Sweetmore, A.; Rothschild G.; Eden-Green, S. (eds.). 2001. Perspectives on pests: Achievements of research under the UK Department for International Development's Crop Protection Programme, 1996-2000. National Resource International Limited, UK, 125 p.

Tapia-Tussell, R., Quijano-Ramayo, A., Rojas-Herrera, R., Larque-Saavedra, A., and Perez-Brito, D. 2006. A fast, simple and reliable high-yielding method for DNA extraction from different plant species. *Mol. Biotechnol.* 31, 137-139.

The American Phytopathological Society (APS). 2011. Coffee rust (*Hemileia vastatrix*). Consultado en línea el 25 de enero de 2013: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/CoffeeRust.aspx>

Vandermeer, J., Perfecto, I., y Liere, H., 2009. Evidence for hyperparasitism of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) by the entomogenous fungus, *Lecanicillium lecanii*, through a complex ecological web. *Plant Pathology*. 58(4): 636-641.

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. y Marques D. 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* versus coffee durable resistance. In: Zambolim L, Zambolim E, Várzea VMP. (eds). *Durable Resistance to Coffee Leaf Rust*. Viçosa MG, Univ. Federal de Viçosa, pp 53–74.

Zambolim L., Zambolim E., Várzea V. 2005. Durable resistance to coffee leaf rust. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa,. 450 p.

White, T. J. ; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. (Eds.). *PCR protocols: A guide to methods and applications*. San Diego, Academic Press, p. 315-322.