



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



Incidencia y caracterización genética de la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk y Br) en la Frailesca Chiapas

T E S I S

que para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA
TROPICAL**

Presenta

Melsar Méndez Zunún

Director (a)

Dr. José Alfredo Medina Meléndez

Codirector (a)

Dr. Ariel Vázquez Elorza

Asesor

Dr. Ramiro Eleazar Ruiz Nájera

Villaflores, Chiapas, México. Febrero del 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS, CAMPUS V.
DIRECCIÓN



VILLAFLORES, CHIAPAS
05 DE FEBRERO DE 2020
OFICIO NO. D/044/20

C. MELSAR MÉNDEZ ZUNÚN
MAESTRANTE EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS CAMPUS V
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 de posgrado, de la tesis titulada: **"Incidencia y caracterización genética de la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk y Br) en la Frailesca, 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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
CAMPUS V



Esta tesis titulada **Incidencia y caracterización genética de la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk y Br) en la Frailesca Chiapas**, forma parte del proyecto producción y aprovechamiento del café, prospección sistémica de la cadena de valor en los estados de Chiapas, Oaxaca y Guerrero. 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 (CIATEJ) A.C bajo la conducción del Dr. ARIEL VÁZQUEZ ELORZA.

Se incluye en la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: caracterización de recursos genéticos, 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 **Incidencia y caracterización genética de la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk y Br) en la Frailesca Chiapas**, fue realizada por el Ing. MELSAR MENDEZ ZUNUN, 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

CODIRECTOR

DR. ARIEL VAZQUEZ ELORZA
(CIATEJ)

ASESOR

DR. RAMIRO ELEAZAR RUIZ NAJERA



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



Esta tesis titulada **Incidencia y caracterización genética de la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk y Br) en la Frailesca Chiapas**, realizada por el Ing. MELSAR MENDEZ ZUNUN, 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

DR. ARIEL VAZQUEZ ELORZA
(CIATEJ)

DR. RAMIRO ELEAZAR RUIZ NÁJERA

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a mi esposa Guadalupe V. Gonzalez Diaz, a mis hijas Yojari Victoria y Hadayansin Lupita Méndez González, por el apoyo y comprensión de todo corazón para concretar mis estudios de Maestro en Ciencias en Producción Agropecuaria Tropical.

A mi madre Leonila Zunún Gutiérrez, por su cariño, amor sin medida, apoyo y consejos para ser siempre un profesionista con valores y disciplina.

A mi hermanos Bersi y Viga Méndez zunún, por el apoyo moral que me brindaron a lo largo de este proceso de formación.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a DIOS, por haberme permitido la vida, por ser el inspirador para lograr uno de los anhelos más deseados en mi formación académica.

Agradezco a los doctores José Alfredo Medina Meléndez, Ramiro Ruiz Nájera por brindarme su apoyo y darme la oportunidad en su equipo y llevar a cabo la investigación como parte del proceso de formación de la Maestría en Ciencias en Producción Agropecuaria Tropical.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico que permitió solventar los gastos durante los estudios de la Maestría en Ciencia en Producción Agropecuaria Tropical.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) A.C unidad Guadalajara por el apoyo con el financiamiento para la realización del proyecto de investigación, bajo la conducción del Doctor Ariel Vázquez Elorza.

A los productores de café de las comunidades de Sajonia, Progreso y Altamira de la región Frailesca, por brindar el espacio y realizar parte de la investigación en sus parcelas.

De igual manera mis agradecimientos a la Universidad Autónoma de Chiapas, a los profesores de la Facultad de Ciencias Agronómicas, quienes con la enseñanza de sus valiosos conocimientos hicieron posible este logro trascendental en mi formación. Gracias a cada uno de ustedes por su paciencia, dedicación, apoyo incondicional y amistad.

INDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Objetivo general.....	2
1.2	Objetivos específicos	2
2	REVISION DE LITERATURA.....	3
2.1	Generalidades del cafeto	3
2.2	Clasificación taxonómica del café	3
2.3	Origen y distribución del café	3
2.4	Plagas y enfermedades asociadas al café	3
2.5	Origen y distribución de la roya del café en el mundo.....	4
2.6	Clasificación taxonómica de la roya del café	4
2.7	Descripción y síntomas del agente causal de la enfermedad	5
2.8	Factores ambientales que influyen en el desarrollo de la roya	6
2.9	Gradiente altitudinal en el comportamiento de la roya del café.....	6
2.10	Razas de roya.....	6
2.11	Método para el diagnóstico de la roya del café a nivel de campo	6
2.12	Incidencia.....	7
2.13	Severidad.....	7
2.14	Interacción planta-patógeno.....	7
2.15	Patogenicidad y virulencia en hongos patógenos	7
2.16	Fungicidas químicos	7
2.17	Diagnóstico y caracterización molecular	8
2.18	Secuenciación.....	8
2.19	Método de secuenciación Sanger	9
2.20	Secuenciación de segunda generación Next Generation Sequencing.....	9
2.21	Roche /454 GS FLX Titanium sequencer.....	10
3	MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1	Área de estudio.....	13
3.2	Estimación del porcentaje de incidencia y severidad de roya	13
3.3	Factores climáticos	14
3.4	Colecta de material biológico para estudios genéticos	14
3.5	Aislamiento del ADN	14
3.6	PCR convencional.....	14
3.7	Visualización de DNA.....	15
3.8	Preparación de genoteca de <i>Hemileia vastatrix</i>	15
3.9	Reparación de fragmentos y ligación con adaptadores MID.....	15
3.10	Remoción de pequeños fragmentos	15
3.11	Preparación de la mezcla de PCR en emulsión	16
3.12	Preparación de solución Mock y reactivos de aceite de emulsion	16
3.13	Preparación de la mezcla de amplificación simulada y pre emulsiones.....	16
3.14	Preparación reacción de PCR en emulsión	17
3.15	Dispersión de la mezcla de emulsión y reacción de amplificación	17
3.16	Rotura de emulsión asistida por vacío	17
3.17	Lavado y recuperación de perlas enriquecidas de ADN	17

3.18	Enriquecimiento de perlas de la genoteca de ADN	18
3.19	Preparación de perlas de enriquecimiento de ADN	18
3.20	Enriquecimiento de perlas de captura de ADN	18
3.21	Preparación de ADN Bead Incubación Mix (DBIM)	19
3.22	Descarga de la muestra	19
3.23	Preparación de reactivos de secuenciación	19
4	RESULTADOS Y DISCUSION	20
4.1	Estudios de campo	20
4.2	incidencia y severidad	20
4.3	Análisis estadístico	21
4.4	Correlación del comportamiento de la roya con factores climáticos	23
4.5	Estudios moleculares	24
4.6	Visualización de amplicones en gel de agarosa	24
4.7	Preparación de la genoteca	25
4.8	Secuenciación del aislado de roya colectado en Sajonia	25
4.9	Alineamiento de secuencia	25
4.10	Anotación del genoma	26
4.11	Anotación de secuencias	27
5	CONCLUSIONES	33
6	LITERATURA CITADA	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Origen y distribución de la roya del café	4
Figura 2. Características de la roya del café. A) Uredias, B) Uredias vista en microscopio	5
Figura 3. Proceso de secuenciación por pirosecuenciación.....	10
Figura 4. Ubicación del área de estudio	13
Figura 5. Escala diagramática para estimar severidad por roya en planta	13
Figura 6. Comportamiento de la roya del café, basado en el nivel de incidencia y severidad en tres altitudes en la región Fraileca, Chiapas.	21
Figura 7. Comportamiento de la roya con relación a factores climáticos.	24
Figura 8. Amplicones en gel de agarosa. 1) Marcador de referencia, 2) control negativo, 3)aislado en Sajonia, 4) aislado en Progreso, 5) aislado en Altamira.....	25
Figura 9. Alineamiento de secuencia aislado de roya colectado en Sajonia ubicado a 740 m.s.n.m.	26
Figura 10. Similitud del aislado de roya colectado en Sajonia, ubicado a 740 m.s.n.m.	26
Figura 11. Representación esquemática del genoma a partir de los <i>contigs</i> ensamblados. Aislado de la roya del café colectado en Sajonia ubicado a 740 m.s.n.m.	27
Figura 12. Proporción de secuencias en cada <i>contigs</i> del genoma, aislado de la roya el café colectado en Sajonia ubicado a 740 m.s.n.m.	28

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Porcentaje de incidencia de roya del café en tres localidades de la región Frailesca, Chiapas, México.	20
Cuadro 2. Porcentaje de severidad de roya del café en tres localidades de la región Frailesca, Chiapas, México.	20
Cuadro 3. Comparación múltiple de la incidencia en tres localidades de la región Frailesca, Chiapas, Mexico.	21
Cuadro 4. Comparación múltiple de la severidad en tres localidades de la región Frailesca, Chiapas, Mexico.	22
Cuadro 5. Datos climáticos tomados del Servicio Meteorológico Nacional. Estación Cuxtepeques en https://smn.conagua.gob.mx	23
Cuadro 6. Correlación del comportamiento de roya con factores climáticos	23
Cuadro 7. Anotación de secuencias del aislado de roya del café colectado en Sajonia ubicado a 740 m.s.n.m	29
Cuadro 8. Dominios de secuencias conservadas en el genoma de la roya del café. Colectado en Sajonia ubicado a 740 m.s.n.m	32

RESUMEN

Se estudió la roya del café *Hemileia vastatrix*, en condiciones de campo y desde el punto de vista genético. Para conocer su comportamiento a nivel de campo se realizaron cinco muestreos en tres localidades ubicadas en tres gradientes altitudinales. Sajonia a 740 m; Progreso a 920 m; y Altamira a 1100 m; en la región Frailesca, Chiapas, México. En el periodo comprendido de septiembre del 2018 a enero del 2019. Para conocer las características genéticas se colectaron muestras de roya en Sajonia ubicado a 740 m.s.n.m. Se estimó el porcentaje de incidencia y severidad, su relación con precipitación, temperatura, radiación solar y humedad relativa. Se secuenciaron 48623 pb del aislado de roya colectado en Sajonia, utilizando tecnologías NGS 454. Del análisis se determinó que existe diferencia estadísticamente significativa de la incidencia y severidad en tres localidades $p < 0.05$. Se encontró una correlación significativa de la incidencia con factores climáticos. La caracterización del genoma permitió evidenciar secuencias relacionadas con la transcripción de elementos repetidos, con patogenicidad, virulencia, mecanismos de defensa, transducción de señales, secuencias de proteínas de función desconocida no caracterizada. No obstante, con homología en otros microorganismos y secuencias de dominios conservados.

Palabras clave: roya naranja, *Coffea spp*, secuenciación, incidencia

ABSTRACT

Hemileia vastatrix coffee rust was studied under field conditions and from the genetic point of view. To know their behavior at the field level, five samples were carried out in three locations located in three altitudinal gradients. Sajonia at 740 m; Progreso at 920 m; and Altamira at 1100 m; in the Frailesca region, Chiapas, Mexico. In the period from September 2018 to January 2019. To know the genetic characteristics, samples of rust were collected in Sajonia. The incidence and severity percentage, its relationship with precipitation, temperature, solar radiation and relative humidity were estimated. 48623 bp of the rust isolate collected in Sajonia was sequenced, using NGS 454 technologies. From the analysis it was determined that there is a statistically significant difference in incidence and severity in three locations $p < 0.05$. A significant correlation of the incidence with climatic factors was found. The genome characterization allowed to show sequences related to the transcription of repeated elements, with pathogenicity, virulence, defense mechanisms, signal transduction, protein sequences of unknown function. However, with homology in other microorganisms and sequences of conserved domains.

Keywords: orange rust, *Coffea spp*, sequencing, incidence

1 INTRODUCCIÓN

Hemileia vastatrix Berk y Br es el agente causal de la enfermedad denominada roya del café, es un patógeno que se alimenta del tejido foliar del cafeto, se conoce como roya por inducir pústulas que contienen esporas de tamaño microscópico con apariencia de polvillo de color naranja sobre el tejido foliar de su hospedero. Es de importancia económica en todos los países cafetaleros del mundo desde que hizo aparición en África Oriental (Jacques y Rivas, 2013) ocasiona daños físicos en hojas y frutos, altera el desarrollo fisiológico del cafeto y como consecuencia disminuye el rendimiento por hectárea.

El cultivo de café es de importancia agroindustrial estratégico para la economía de países en desarrollo, se cultiva en países tropicales ubicados en América Latina, Asia y África (CEDRSSA, 2014). Ha trascendido en su importancia no solo en el aspecto económico, sino social, ambiental, cultural y educativo; este último por el hecho que se convierte en un espacio de aprendizaje, ofrece fuente de trabajo a más de 20 millones de personas en actividades de producción, transformación, procesamiento y comercialización del producto en todo el mundo, como materia prima se comercializa en mercados internacionales generando ingresos anuales mayores a los 15 mil millones de dólares para los más de 50 países productores (Canet *et al.*, 2016).

En México, el cultivo de café se ha consolidado como una actividad estratégica para la economía nacional, se cultiva en doce estados de la república Mexicana, entre ellos Chiapas, como el principal productor nacional que en el ciclo 2018-2019 se cosecharon 178,102 t/ha en una superficie de 229,242 ha (SIAP¹, 2019). Los beneficios que ofrece el cultivo de café se ven amenazados por el hongo roya del café y como consecuencia disminución de los ingresos económicos de las familias que dependen de esta actividad optando por cambio de uso de suelo, problemas sociales como migración. Ante esto es importante buscar alternativas de control que aporten a mitigar los efectos de la enfermedad. Dentro del marco general del proyecto “Producción y aprovechamiento del café, prospección sistémica de la cadena de valor en los estados de Chiapas, Oaxaca y Guerrero”, se incluye el estudio del agente causal de la enfermedad en condiciones de campo y desde el punto de vista genético mediante métodos en campo, herramientas de biología molecular y bioinformático que en conjunto permiten el diagnóstico de patógenos e identificación de secuencias, genes y proteínas de interés así como su relación con factores ambientales.

¹ SIAP. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera

1.1 Objetivo general

Estudiar el comportamiento de la roya del café *Hemileia vastatrix* en condiciones de campo en tres altitudes e identificar características genéticas de un aislado de la región cafetalera de la Frailesca, Chiapas.

1.2 Objetivos específicos

- a) Estimar el porcentaje de incidencia y severidad de la roya del café *Hemileia vastatrix* en plantaciones de café ubicadas a 740, 920 y 1100 m.s.n.m.
- b) Analizar el efecto de temperatura, precipitación, humedad relativa y radiación solar en el desarrollo y comportamiento de la roya del café *H. vastatrix*.
- c) Secuenciar el genoma de un aislado de roya del café *H. vastatrix* mediante la plataforma de secuenciación de segunda generación.

2 REVISION DE LITERATURA

2.1 Generalidades del cafeto

El cafeto es un arbusto de porte variado, de ciclo perenne, de climas tropicales y subtropicales, familia de las rubiáceas del cual se obtiene frutos de color café cereza de su proceso se obtienen semillas que se convierten en materia prima para preparar una bebida como infusión que se consume en todos los países del mundo, además de diversos usos industriales. Por su importancia comercial sobresalen dos especies de café; *coffea arábica* y *coffea canephora*, los arábicos se caracterizan por ser cafés de alta calidad en taza, de mayor producción y comercialización. Sin embargo, es susceptibles a enfermedades como la roya naranja, el café robusta se caracteriza por ser de porte alto tolerante a la roya, es utilizado como patrón para mejoramiento genético (Hernández y Velázquez 2016), posee una concentración rica en cafeína mayor que en arabica (Centro de Comercio Internacional, s.f), usualmente usado para la fabricación de café soluble o instantáneo.

2.2 Clasificación taxonómica del café

Reino: vegetal

Subreino: angiosperma

Clase: dicotiledónea

Orden: rubiales

Familia: rubiácea

Género: *Cofia*

Especie: *C. arábica* L

2.3 Origen y distribución del café

La historia del café empieza en África, en Etiopía, donde el cafeto tuvo su origen probablemente en la provincia de Kaffa. Hay varios relatos, pero poco probables. Sin embargo, el café se cultivaba en el Yemen ya en el siglo XV (OIC, 2019).

2.4 Plagas y enfermedades asociadas al café

Existen más de 8,000 especies de hongos que causan enfermedades en los vegetales (National Academy of Sciences, 1980), (Rodríguez, 2001). Existe a nivel mundial 380 registros de hongos y bacterias asociados al cultivo del café, se describen 40 especies plagas (37 insectos, 3 acaros) y 26 especies de

enfermedades (1 virus, 1 fitoplasma, 3 bacterias, 17 hongos 3 nematodos y 1 alga) (Barrera, s.f).

2.5 Origen y distribución de la roya del café en el mundo

La roya del café tiene sus orígenes en África Oriental. Se observó por primera vez en Ceilán hoy Sri Lanka en 1869 (McCook, 2006). (Figura 1). Fue descrita por Miles Joseph Berkeley, le dio el nombre científico de *Hemileia vastatrix* (Jacques & Rivas, 2013). En la década de los 70's se expandió a Brasil, Colombia, Costa Rica y Guatemala. A México llegó en 1981 (McCook, 2009).

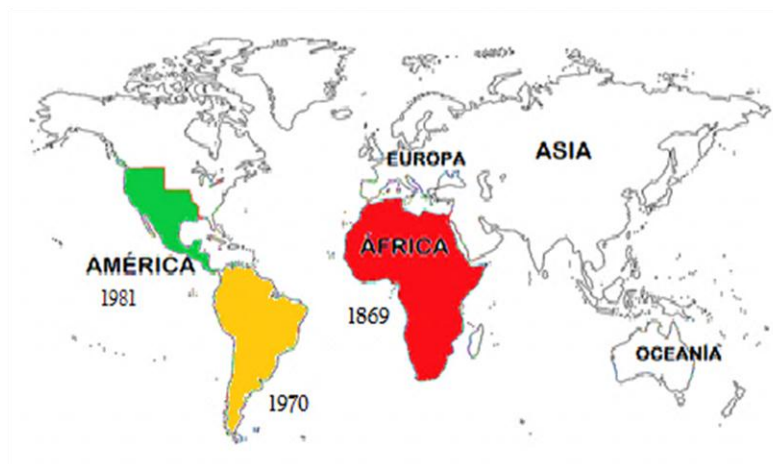


Figura 1. Origen y distribución de la roya del café

2.6 Clasificación taxonómica de la roya del café

La roya del café es producida por un hongo de la clase Urediniomycetes perteneciente al género *Hemileia*, que significa mitad liso por la característica que presentan las uredosporas (Figura 2). El género *Hemileia* tiene 50 especies (Aime, 2006) de las cuales sólo dos son capaces de afectar al café, *Hemileia vastatrix* y *Hemileia coffeicola*. Esta última es responsable de la enfermedad denominada la roya harinosa del café y está presente únicamente en África (Arneson, 2000). *Hemileia vastatrix* pertenece a la familia de las Chaconiaceae (Cummins y Hiratsuka, 2003) y no a la familia de las Puccineaceae, en las que anteriormente se clasificaba. Esta clasificación ha sido confirmada a través de estudios moleculares.

Clasificación taxonómica de la roya del café (Cummins y Hiratsuka, 2003)

Reino: fungí

Phylum: Basidiomycota

Clase: Urediniomycetes

Orden: Uredinales

Familia: Chaconiaceae

Género: *Hemileia*

Especie: *vastatrix*

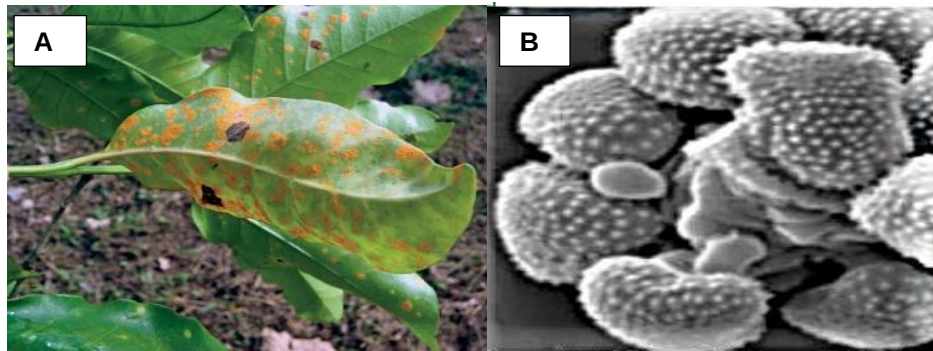


Figura 2. Características de la roya del café. A) Uredias, B) Uredias vista en microscopio

2.7 Descripción y síntomas del agente causal de la enfermedad

Hemileia vastatrix es un patógeno obligado que parasita al tejido foliar del género *coffea spp*, ataca principalmente a la especie arábica (CABI², 2016). El ciclo biológico del hongo inicia con el proceso de liberación y deposición de la espora en la hoja del cafeto, la espora germina y se inicia el proceso de infección, posteriormente la colonización y la esporulación (Jacques y Rivas, 2013). Los primeros síntomas de la enfermedad son pequeñas manchas cloróticas de color amarillo pálido que se observan en la parte superior de las hojas, estas manchas aumentan de forma gradual, el hongo produce basidiosporas, teliosporas, urediosporas y soros, las urediosporas están adaptadas para la supervivencia, la dispersión, la infección y la reproducción sexual (Carvalho *et al.*, 2011). Las urediosporas albergan un proceso de meiosis (Rajendren, 1967). Esta reproducción sexual escondida fue denominada criptosexualidad (Carvalho *et al.*, 2011).

² CABI. Center for Agricultural Bioscience International

2.8 Factores ambientales que influyen en el desarrollo de la roya

Las condiciones favorables de humedad relativa, temperatura, precipitación, radiación solar y susceptibilidad de la planta son factores importantes para el desarrollo de una epidemia por roya (Rivillas *et al.*, 2011). La germinación del hongo se da bajo la presencia de agua libre sobre las hojas, temperatura de 18 a 24 °C y de oscuridad, la precipitación actúa como factor determinante en la germinación y dispersión de las esporas (Barquero, 2013).

2.9 Gradiente altitudinal en el comportamiento de la roya del café

El desarrollo y comportamiento de la roya del café depende en cierta medida de la ubicación geográfica, en este caso de la variable altitud (m.s.n.m) por lo que se presentan diferentes condiciones de temperatura y precipitación durante el año entre una y otra altitud, por lo que el progreso e intensidad de la enfermedad es de acuerdo a las condiciones presentes (Barquero, 2013).

2.10 Razas de roya

Estudios realizados han demostrado que el hongo ha evolucionado y desarrollado variantes genéticas. Las razas del hongo atacan de forma diferenciada a las especies y variedades de café dependiendo de los genes de resistencia de la planta y de los genes de virulencia del hongo (Cristancho *et al.*, 2012). En el año 2000 en Brasil, se identificaron 15 razas fisiológicas de la roya naranja: I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXI, XXIII, XXIV, XXV, XXXI y XXXVII (Gil y Ocampo 1988). La raza II es la de más amplia distribución en el mundo (Cabral *et al.*, 2009) y Leguizamón *et al.*, 1984).

2.11 Método para el diagnóstico de la roya del café a nivel de campo

Una de las formas para tener un conocimiento oportuno de la situación de la enfermedad y su avance en el tiempo es la implementación de muestreos en campo, una mejor comprensión del progreso de la enfermedad es posible obtenerlo al realizar un muestreo de forma mensual (Barquero, 2013). De esta forma, se podrá tener un criterio técnico de la condición de la enfermedad, los controles que se deben implementar y cuándo aplicarlos.

2.12 Incidencia

La incidencia es un estimador que determina la presencia o ausencia de la enfermedad dentro de una parcela, que está dado por la siguiente ecuación (SENASICA,³ 2013).

$$\% \text{ INCIDENCIA} = \frac{\text{TOTAL DE HOJAS INFECTADAS}}{\text{TOTAL DE HOJAS MUESTREADAS}} \times 100$$

2.13 Severidad

La severidad es un estimador por visualización directa el cual nos indica el porcentaje del área foliar enferma en el cafeto ocasionado por el patógeno de acuerdo a la escala diagramática (SENASICA 2013).

2.14 Interacción planta-patógeno

Los hongos fitopatógenos obligados requieren de la célula huésped viva y emplean para ello mecanismos de invasión. Entre los patógenos biotróficos se encuentran los virus, los nematodos y algunos hongos especializados como las royas, para ello se debe estudiar la virulencia o patogenicidad de un patógeno siempre en relación con la resistencia o susceptibilidad del huésped (Hoyos *et al.*, 2003).

2.15 Patogenicidad y virulencia en hongos patógenos

La patogenicidad se refiere a la habilidad de un patógeno para causar enfermedad en un huésped particular, mientras que el término virulencia hace referencia al grado de daño causado por el patógeno en el huésped (Sacristán y García, 2008).

2.16 Fungicidas químicos

Existen dos tipos de fungicidas para el control de roya del café. De contacto y sistémicos, estos deben elegirse en función del nivel de daño, los fungicidas preventivos como el oxiclورو de cobre y sulfato de cobre que inhiben la

³ SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria

germinación de las esporas deben ser utilizados con niveles de incidencia inferiores al 5% y fungicidas sistémicos cuando el nivel de daño es severo tales como benzimidazol, estrobirulinas y triazoles (Orozco, 2015). Sin embargo, el uso de estos productos químicos compromete a la aparición de patógenos resistentes. Resistencia que puede originarse por varios mecanismos como reducción de la unión del fungicida, descomposición metabólica del fungicida o un flujo activo o reducción de la cantidad admitida de fungicida alteración del sitio diana, síntesis de una enzima alternativa capaz de sustituir a la enzima diana, sobreproducción de la diana del fungicida (Fernández *et al.*, 2008).

En los hongos, los sistemas de transporte han evolucionado para conferir resistencia natural contra las sustancias tóxicas. Dos familias de sistemas transportadores de membrana se han relacionado con la secreción de compuestos tóxicos: los transportadores ABC y los MFS. Los transportadores ABC utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para el transporte de diversas sustancias en contra del gradiente de concentración a través de la membrana plasmática. Los transportadores MFS, son incapaces de hidrolizar el ATP y usan la fuerza motriz de los protones para facilitar el transporte no sólo de tóxicos sino también de azúcares, péptidos e iones (Neelabh y Karuna, 2018). Estos transportadores han sido descritos en varios hongos filamentosos como *Aspergillus nidulans*, *Botrytis cinerea*, *Mycosphaerella graminicola*, *Magnaporthe grisea*, *P. digitatum* (Andrade *et al.*, 2000).

2.17 Diagnóstico y caracterización molecular

La búsqueda de soluciones a los problemas causados por hongos fitopatógenos en los últimos años se ha encaminado a la secuenciación completa de sus genomas, las herramientas involucradas en el análisis de dichos genomas han surgido a partir de su amplio uso en otros organismos modelos, el mapeo se ha enfocado hacia la búsqueda de genes, proteínas, enzimas de interés, tales como los de virulencia/patogenicidad (Manzo *et al.*, 2007). La identificación basada en estudios taxonómicos de hongos y su patología sobre hospedero requiere tiempo y experiencias considerables, los métodos moleculares agilizan la identificación analizando regiones específicas dentro de genes (Lafuente *et al.*, 2016) tanto para estudios de variabilidad genética como para análisis de regiones conservadas.

2.18 Secuenciación

Secuenciar una molécula de ADN consiste en determinar el orden de nucleótidos (A, T, C, G) que componen la molécula de ADN. El primer método diseñado para secuenciar el ADN fue desarrollado por Allan Maxam y Walter Gilbert en 1977 (Maxam y Gilbert, 1997). Es un método químico que somete la molécula de ADN a

distintos métodos de ruptura, cada método escinde la molécula donde haya un nucleótido específico. Este método es bastante laborioso y, hoy en día, ha sido sustituido por métodos enzimáticos que, además, se pueden llevar a cabo de forma automatizada (Sanger y Coulson, 1975). Las regiones más utilizadas del ADN nuclear de hongos en la identificación genética tanto para estudios de filogenia como en taxonomía, son las que codifican para el ARN ribosómico (ADNr) 18S, 28S y 5.8S ARNr (Rodríguez *et al.*, 2004).

Las regiones ITS-5.8S del ADNr se amplifican con los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990), generan fragmentos de ADN con longitud de 600 y 900 pb. La región de los ITS por el hecho de ser intrones es un área de alta variabilidad al no tener una función biológica aparente y por esto acumulan mutaciones neutrales a lo largo del tiempo, lo que permite diferenciar individuos relacionados genéticamente, ésta región es el fragmento de ADN más secuenciado en hongos, ha sido útil para estudios de sistemática molecular al nivel de especie y aún dentro de la especie.

2.19 Método de secuenciación Sanger

El método de secuenciación automática de Sanger en honor al bioquímico inglés Frederick Sanger, fue utilizado en trabajos de secuenciación por casi 20 años. Con este método se realizó la secuenciación del primer genoma bacteriano *Haemophilus influenzae* y la primera secuencia completa del genoma humano (Aguilar y Falquet, 2015). Sin embargo, algunas de las limitaciones de la tecnología Sanger trajeron consigo la necesidad de desarrollar nuevas y mejores alternativas para la secuenciación de un gran número de genomas en corto tiempo. A partir de esto surgen las tecnologías de secuenciación de nueva generación NGS (*Next Generation Sequencing*) que extiende la metodología de Sanger a un método masivo y en paralelo que minimizan los costos y el tiempo para obtener la secuencia genómica (Goodwin *et al.*, 2016).

2.20 Secuenciación de segunda generación Next Generation Sequencing

Las NGS son las tecnologías que en la actualidad son destinadas a llevar a cabo secuenciación masiva a gran escala de ácidos nucleicos. Con las tecnologías NGS en 2005 se logró una revolución en el ámbito de la investigación de genómica básica y aplicada, esto gracias a la capacidad de generar una mayor cantidad de lecturas del genoma que permiten obtener un resultado más sólido, reduciendo costos y tiempo (Zhanga *et al.*, 2011).

2.21 Roche /454 GS FLX Titanium sequencer

La plataforma *454 GS FLX* de Roche, es uno de los métodos de secuenciación de nueva generación que se fundamenta en la polimerasa pirosecuenciación y PCR en emulsión con una longitud de lecturas de 250 a 400 Pb desarrollado por Pal Nyrén y Mustafá Ronaghi en el Instituto real de Tecnología Royal Institute of Technology (Metzker, 2010). Es una técnica no fluorescente que mide la liberación de pirofosfato en una reacción de polimerización mediante una serie de reacciones enzimáticas acopladas que liberan luz cada vez que se incorpora un nucleótido; la acción de enzimas como la sulfurilasa y la luciferasa (Figura 3), produce una imagen que se analiza para proporcionar flujogramas que, una vez interpretados por el ordenador, devuelven las secuencias de nucleótidos (Roche, 2015).

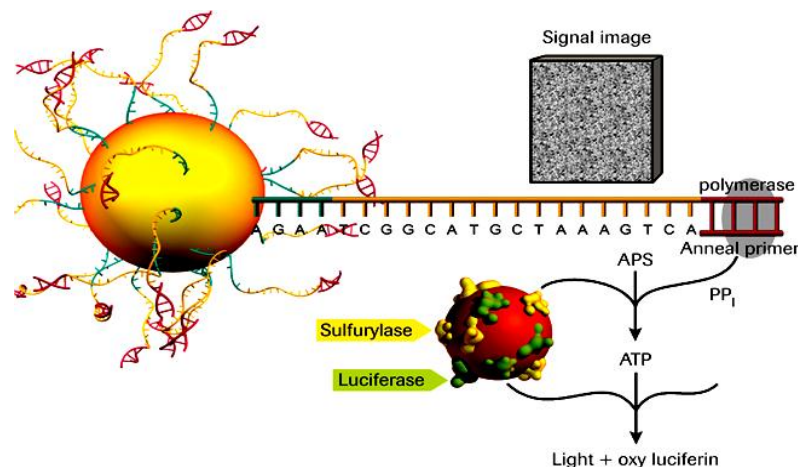


Figura 3. Proceso de secuenciación por pirosecuenciación.

Quispe *et al.* (2017) analizaron la diversidad genética del patógeno del café *Hemileia vastatrix*, a través de secuenciación de los espaciadores internos transcribibles del ADN ribosomal (ITS) en muestras de roya de 12 predios. Determinaron que ambas regiones productoras presentan valores altos de diversidad genética, analizaron las secuencias de la región ITS de *H. vastatrix* y las almacenadas en el GenBank, no encontrándose distribución de las poblaciones por región geográfica.

Cristancho *et al.* (2007) identificaron la evolución de la roya del café a través del uso de cafetos derivados del Híbrido de Timor y en plantas diferenciales, así mismo estudiaron la diversidad genética del hongo a través del análisis de secuenciación de

ADN ribosomal. La identificación de roya en materiales diferenciales desarrollados en el CIFIC⁴ confirmó la presencia de la raza XXIX en Colombia.

Cristancho *et al.* (2014) secuenciaron montajes separados de los genomas de ocho aislados de la roya del café, debido a las características inherentes y la composición del genoma (bajo contenido de GC y riqueza en elementos transponibles (ET)) solo obtuvieron ensamblajes parciales del genoma. El 74.4% de los *contigs* ensamblados albergan elementos transponibles. El 73.8% de secuencias fueron homólogas a otros genomas de especies pucciniales, 483 proteínas secretadas predichas que representan genes efectores candidatos que proporcionan pistas para descifrar la virulencia en el hongo de la roya del café.

Duplessis *et al.* (2014) demostraron que los genomas de los microorganismos royas exhiben tamaños de genomas muy grandes y contenidos altos de elementos transponibles (TE) lo que dificulta su secuenciación y ensamblaje.

Castillo, (1992) obtuvo valores significativos negativos del coeficiente de correlación de la incidencia y factores climáticos. Incidencia y temperatura de $r = -0.895$ a -0.934 , incidencia y precipitación $r = -0.380$ a -0.688 . Siendo la temperatura que más influye en la incidencia de la enfermedad. En cuanto a la humedad relativa, el autor referido menciona que esta no contribuye al desarrollo de la enfermedad de manera significativa. Así también, Loasiga (1993), reportó valores significativos y negativos de correlación de la precipitación con el desarrollo de la epidemia. Oseguera (1991) sostiene que la precipitación es la variable que mejor explica el desarrollo y comportamiento de la enfermedad.

Avelino *et al.* (1991) observaron que en el sur de México a mayor altitud los niveles de infección alcanzados son menores. A 1100 m de altitud obtuvieron una infección máxima por roya del 16%, a 730 m el porcentaje fue de 24%, mientras que a 460 m se alcanzó un porcentaje de 32%, que el control de la enfermedad es menos necesario en zonas altas, y en todo caso que éste podría iniciar más tardíamente a esas altitudes debido al retraso en el desarrollo de la epidemia.

Rocha, (2017) identificó los retrotransposones LTR que podrían estar contribuyendo con la modulación de la expresión génica y por lo tanto afectando la variabilidad del patógeno. Es una posibilidad de que los elementos de ADN transponibles sean responsables de aumentar la variabilidad genética de *H. vastatrix*.

⁴ CIFIC. Centro de Investigación de la Roya del Café

El comportamiento de la roya del café históricamente reportado en México, muestran que el incremento de la incidencia ocurre a partir de septiembre a febrero y que la altitud influye sobre los niveles de daño, ya que la mayor incidencia ocurre a menos de 800 msnm; mientras que a más de 1000 m.s.n.m la incidencia de la enfermedad suele ser menor (Méndez *et al.*,1985).

Gamarra *et al.* (2016) mencionan que el factor cambio climático es una variable independiente pero determinante en la aparición de nuevos brotes de la roya y que ha mantenido una variación desde el año 2012 en toda la región de México y Latinoamérica.

Rivillas *et al.* (2011) mencionan que en investigaciones recientes realizadas por CENICAFE, se ha apreciado el efecto de las variaciones climáticas en los últimos años sobre la roya del cafeto, sobre los períodos de incubación y de latencia, los cuales transitoriamente sufren aumentos o disminuciones, dependiendo de las condiciones ambientales, como la temperatura.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en la región de la Frailesca Chiapas, en tres localidades Sajonia a 740 m.s.n.m en las coordenadas geográficas 15° 49' 57.13''N, 92° 56' 34.52''O., Progreso a 920 m.s.n.m en las coordenadas geográficas 15° 44' 57.73''N, 92° 37' 57.44''O y Altamira a 1100 m.s.n.m en las coordenadas geográficas 15° 44' 26.71'' N, 92° 37' 22.69''O (Figura 4). Para conocer el comportamiento de la roya en cada área de estudio se llevaron a cabo cinco muestreos de incidencia y severidad iniciando en el mes de septiembre del 2018 a enero del 2019, en una superficie de 1 ha en variedad caturra.

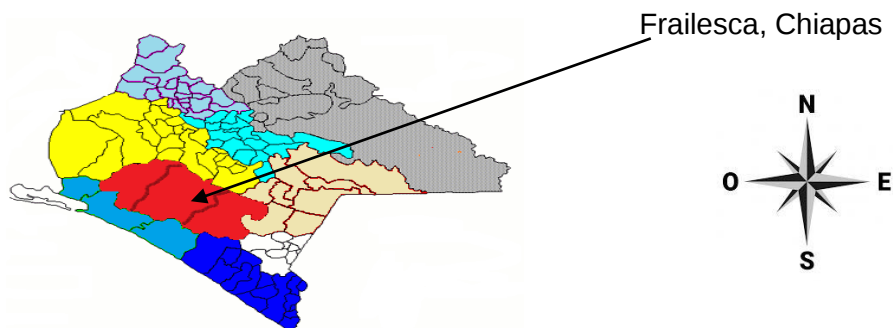


Figura 4. Ubicación del área de estudio

3.2 Estimación del porcentaje de incidencia y severidad de roya

Se empleó el método de muestreo cinco de oros, se revisaron cinco plantas por sitio y de estas se observaron diez hojas por planta, del estrato alto, medio y bajo. El porcentaje de incidencia se estimó contabilizando el número de hojas infectadas entre el total de hojas muestreadas por cien, la severidad siguiendo la escala diagramática (Figura 5) (SENASICA, 2013).



Figura 5. Escala diagramática para estimar severidad por roya en planta

3.3 Factores climáticos

Los datos climatológicos como temperatura, precipitación, humedad relativa y radiación solar se tomaron de los reportes mensuales emitidos por el Servicio Meteorológico Nacional. Estación Finca Cuxtepeques.

3.4 Colecta de material biológico para estudios genéticos

Se identificó el polvillo de color naranja sobre el tejido foliar del cafeto situado a 740 m.s.n.m. Con el apoyo de un bisturí se colectaron las uredias y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Se conservaron a una temperatura de -20°C hasta el aislamiento del ADN.

3.5 Aislamiento del ADN

El aislamiento del ADN se llevó a cabo a través de un kit comercial de purificación y extracción de ADN de Promega®, en el laboratorio de servicio de constatación de salud animal del SENASICA en Jiutepec del estado de Morelos. Consistió en lo siguiente. Se depositaron las uredias de *H.vastatrix* en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se agregaron 300µL de solución de lisis, se agitó en vortex y se incubó en termoblok de calentamiento marca BIDER modelo HB100 65°C por 2 h. Se agregaron perlas de lisado y se colocaron en centrífuga marca Eppendorf modelo 5424R, a 3000 g. por 3 min. Se agregaron 100 µL de solución de precipitación de proteína y se centrifugó a 16000 g. por 3 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo que contenía 300 µL de isopropanol y se centrifugó a 16000 g. por 2 min. Se decantó el sobrenadante en un tubo que contenía 300 µL de etanol al 70% y se centrifugó a 16000 g. Se aspiró el etanol y se agregaron 50 µL de solución de rehidratación ADN. Se agregaron 1.5 µL de ARNasa y se incubó a 37°C por 15 min y finalmente a 65°C por 1 h en el termoblok.

3.6 PCR convencional

Se amplificó la región ITS-5.8S rADN con los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-5'). La mezcla PCR consistió en lo siguiente para una reacción total de 25 µL. 12.5 µL de master mix, 1.0 µL de primer forward, 1.0 µL de forward reverse, 9.5 µL de H₂O grado molecular y 1µL de muestra ADN.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador marca applied biosystems modelo veriti a una temperatura inicial de 94°C por 5 min, 94°C por 30 s, 40 °C por 1 min, 72°C por 2 min y finalmente 72°C por 2 min. por 30 ciclos.

3.7 Visualización de DNA

Se observó la integridad del ADN extraído de *H. vastatrix* en una electroforesis en gel de agarosa al 1% con solución amortiguadora de TAE 1X. El corrimiento electroforético se realizó a 80v durante 30 min. Los amplicones fueron visualizados en un trans-iluminador UV Marca Carestream.

3.8 Preparación de genoteca de *Hemileia vastatrix*

Se cuantificó el ADN genómico utilizando el kit de Quant-iT Pico Green® invitrogen utilizando un fluorómetro modelo Qubit 2.0, marca invitrogen. Para la preparación de la genoteca, se inició con 500 ng de ADN en un tubo de microcentrifuga de 1.7 mL. Se agregó Buffer TE a un volumen final de 100 µL. Se colocó un tubo del condensador del nebulizador con el tubo de aspiración. Se mezcló la muestra de 100 µL de ADN en la copa del nebulizador. Se agregaron 500 µL de tampón de nebulización. Se atornilló la tapa del nebulizador y se conectó al tanque de nitrógeno. Se aplicaron 30 Psi de presión de gas nitrógeno durante 1 min. Se agregaron 2.5 mL de tampón PBI. Se purificó la muestra nebulizada en una columna de purificación Qiagen MinElute PCR, centrifugando a 13,000 rpm en una centrifuga de mesa. Se cargó la muestra del ADN nebulizado en una columna, se centrifugó durante 15 s. Se desechó el flujo directo. Se agregaron 750 µL de tampón PE. Se centrifugó durante 1 min y se desechó el flujo directo. Se eluyó en un tubo nuevo con 16 µL de tampón TE centrifugando por 1 min. Se transfirió la muestra a un tubo de PCR de 200 µL.

3.9 Reparación de fragmentos y ligación con adaptadores MID

Se realizó la reparación y ligación de fragmentos con adaptadores MID de acuerdo al manual Rapid Library Preparation 454. En un tubo de microcentrifuga de 1.7 mL se mezclaron 2.5 µL de RL 10× PNK Buffer, 2.5 µL de RL ATP, 1 µL de RL dNTP, 1 µL de RL T4 Polimerasa, 1 µL de RL PNK, 1 µL de RL Taq Polimerasa y 16 µL de muestra de ADN fragmentado. Se llevó al termociclador a 25 °C por 20 min, 72 °C por 20 min y 4 °C. Posterior al ciclado, al tubo de reacción se le agregó 1 µL de adaptador RL y 1 µL de ligase RL, se agitó en vortex durante 5 s. Se centrifugó durante 2 s. Finalmente la reacción se llevó nuevamente al termociclador a 25°C por 10 min.

3.10 Remoción de pequeños fragmentos

Siguiendo las indicaciones del manual Rapid Library Preparation 454, se tomó una alícuota de 125 µL de las perlas AMPure y se colocó en un tubo de 2 mL en el

Concentrador Magnético de Partículas (MPC). Cuando las perlas formaron un pellet en la pared del tubo se desechó el flotante. Se agregaron 100 μ L de TE Buffer y 500 μ L de solución sizing, se agitó en vortex durante 5 s. Se añadió la muestra a las perlas AMPure ya preparadas. Se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se colocó el tubo en el MPC, se desechó el sobrenadante cuando las perlas formaron el pellet en la pared del tubo. Se añadieron 100 μ L de TE Buffer y 500 μ L de solución sizing, se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se colocó el tubo en el MPC, se desechó el sobrenadante cuando las perlas formaron completamente el pellet. Se añadieron 100 μ L de TE Buffer y 500 μ L de solución sizing, se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se colocó el tubo en el MPC, se removió el sobrenadante hasta que las perlas formaron el pellet. Posteriormente se agregó 1 mL de etanol al 70%, se desechó el etanol y se agregaron 53 μ L de Buffer TE. Se agitó en vortex durante 5 s. y se centrifugó durante 2 s. Una vez formado el pellet en la pared del tubo. Se transfirieron 50 μ L del sobrenadante que contenía la genoteca a un tubo nuevo de 1.7 mL. Se etiquetó y se guardó la muestra a -20°C.

3.11 Preparacion de la mezcla de PCR en emulsión

El contenido de las perlas de captura se agitaron en vortex, posteriormente se realizó un *spin* rotando el frasco a 180°, se desechó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 1 mL de Wash Buffer (500 μ L de 1x Wash Buffer con 4.5 mL de H₂O grado biología molecular. Una vez preparadas las perlas de captura se colocaron en hielo para su posterior uso.

3.12 Preparación de solución Mock y reactivos de aceite de emulsion

En un tubo de 15 mL se añadieron 2 mL de 5x Mock Amplificación Mix y 8 mL de H₂O grado biología molecular. Los reactivos emPCR contenidos en frascos se descongelaron a temperatura ambiente, las enzimas se tuvieron entre 15 y 25 °C. Se agitaron en vortex y se calentó el frasco del aditivo emPCR a 55 °C durante 5 min. Se instalaron los frascos contenidos de aceite de emulsión de forma segura en el Tissuelyser, se agitó a 28 Hz durante 2 min.

3.13 Preparación de la mezcla de amplificación simulada y pre emulsiones

Se diluyeron 2 mL de 5 xMock Amplificación Mix con 8 mL H₂O grado biología molecular y se agitó en vortex. Se agregó 1 mL de la solución de trabajo Mock Amplificación Mix a cada frasco de emulsión. Se invirtieron los frascos 2 a 3 veces para mezclarlos. Los frascos se colocaron en el *Tissuelyser* asegurándolos firmemente y se agitaron a 28 Hz durante 5 min.

Según las indicaciones de GS FLX Titanium series métodos, para un volumen final de 7830 μL se mezclaron 2100 μL de H_2O biología molecular, 3000 μL de emPCR aditivo, 1720 μL de 5 x Amplificación Mix, 600 μL de amplificación primers, 400 μL de emPCR enzima Mix y 10 μL de PPIasa. Se tomaron 20 μL de la genoteca en un tubo de PCR la cual se mezcló con 80 μL de buffer TE.

3.14 Preparación reacción de PCR en emulsión

Para formar el microreactor de aceite se colocaron dos frascos de aceite de emulsión (2 LV) en el equipo de disrupción y homogeneización Tissuelyser a 28Hz por 2 min. Se agregaron 5 mL de la solución Mock, se invirtió tres veces y nuevamente se colocó en el equipo de disrupción y homogeneización a 58 Hz por 5 min. Se realizó la desnaturalización de la genoteca ya diluida con 80 μL de Buffer TE en el termociclador a 95°C por 2 min. La muestra se colocó en perlas de captura, se agitó en vortex y se agregaron 1000 μL del Live Amplificación Mix, se agitó en vortex y se transfirió la mezcla al frasco de aceite. Al vaso con la mezcla se agregaron 2.75 mL de Live Amplificación Mix. Se agregó la mezcla al frasco y se agitó nuevamente a 12 Hz por 5 min.

3.15 Dispersión de la mezcla de emulsión y reacción de amplificación

Se añadieron 100 μL de la mezcla de emulsión en la placa de 96 pozos. La placa se colocó en el termociclador y se dio inicio a la amplificación con la tapa calentada bajo las siguientes condiciones de temperatura 94°C por 4 min, 94°C por 30 s, 58°C por 5 min, 68°C por 30 s durante 6 h.

3.16 Rotura de emulsión asistida por vacío

Se utilizó un kit de ruptura GS FLX Titanium emPCR, LV /MV. Se conectó la pipeta repetidora al tubo cónico de 50 mL y al matraz de desechos conectado con la bomba de vacío. Se tomó la placa de emulsión y se aspiró la mezcla, se realizaron cuatro lavados a las placas con 100 μL de isopropanol.

Lavado y recuperación de perlas enriquecidas de ADN

Los tubos que contenían la recuperación de las emulsiones se les agregó isopropanol a un volumen final de 40 mL. Las perlas se centrifugaron a 930 g durante 5 min en una centrifuga Bekman allegria rotor sx4750 y se retiró el sobrenadante. Se agregaron 20 mL de Enhancing Fluid XT, se agitó en vortex, se centrifugó y se desechó el sobrenadante. Se añadieron 35 mL de isopropanol, se agitó en vortex, se centrifugó y se desechó el sobrenadante. Se añadieron nuevamente 35 mL de isopropanol, se agito en vortex, se centrifugó y se desechó el sobrenadante. Se

agregaron 20 mL de Enhancing Fluid XT, se agitó en vortex, se centrifugó y se desechó el sobrenadante dejando aproximadamente 2 mL de Enhancing Fluid XT. Se transfirió la suspensión de perlas de ADN a un tubo de recolección de 1.7 mL se centrifugó y se desechó el sobrenadante. A dos frascos de recolección de 50 mL se agregaron 600 µL buffer de alineamiento XT, posteriormente al frasco de 1.7 mL que contenía el pellet de las perlas se centrifugó y se desechó el sobrenadante.

3.17 Enriquecimiento de perlas de la genoteca de ADN

Se preparó una solución fundida mezclando 125 µL de NaOH (10 N) en 9 mL de H₂O grado molecular. Se giraron los frascos de las perlas y se desechó el sobrenadante. Se agregó 1 µL de solución fundida (Melt) por tubo de perlas, se agitó en vortex, se incubó durante dos minutos a temperatura ambiente, se centrifugó y se desechó el sobrenadante. Se agregó 1 µL de buffer de alineación XT por tubo de perlas se agitó en vortex, se centrifugó y se desechó el sobrenadante. Se agregaron 30 µL de buffer de alineación XT por frasco y se agitó en vortex. Los frascos se colocaron en un termoblok a 65°C durante 5 min y se colocaron el hielo. Se agregaron 500 µL de buffer de alineamiento XT por frasco, se agitó en vortex, se centrifugó y se desechó el sobrenadante. Finalmente se agregaron 800 µL de buffer de alineamiento XT, se agitó en vortex y se dejaron a temperatura ambiente.

3.18 Preparación de perlas de enriquecimiento de ADN

Se tomaron 80 µL de perlas para cada frasco de perlas recuperadas, se colocaron en un frasco nuevo y se colocaron en el concentrador magnético de partículas (MPC). Se desechó el sobrenadante conservando la perla de enriquecimiento. Se agregó 1 mL de buffer de alineamiento XT y se mezcló. Los frascos se colocaron el concentrador magnético de partículas, se descartó el sobrenadante conservando la perla de enriquecimiento. Se agregaron 80 µL de buffer de alineamiento XT por cada frasco y se agitaron en vortex.

3.19 Enriquecimiento de perlas de captura de ADN

Se agregaron 80 µL de perlas de enriquecimiento en cada frasco de perlas de ADN amplificadas y se agitaron en vortex. Se colocaron en el concentrador magnético de partículas, se esperó por un tiempo de 5 min para sedimentar las perlas de enriquecimiento. Se desechó el sobrenadante de cada frasco. Se lavaron las perlas con buffer de alineamiento XT. Se añadió 1 mL de buffer de alineamiento XT. Se colocaron los frascos nuevamente en el MPC para concentrar las perlas en la pared del frasco. Se desechó el sobrenadante de cada tubo. Se añadieron 200 µL de buffer de alineamiento XT y se mezcló en un vortex.

3.20 Preparación de ADN Bead Incubación Mix (DBIM)

En un tubo de 15 mL se colocaron 1570 μ L de buffer de perlas (BB2), 150 μ L de polimerasa cofactor y 300 μ L de ADN polimerasa, se mezclaron por inversión. El enriquecimiento obtenido con perlas recuperadas se le dio un spin durante 1 min, se eliminó el exceso de buffer de alineamiento, se adicionaron 20 μ L de control ADN Beads para un volumen de 50 μ L. Se adicionaron 950 μ L de DBIM.

3.21 Descarga de la muestra

Después de los 15 min en el rotador, a la muestra se le añadieron 265 μ L de Packing Beads (perlas de embalaje) y 435 μ L de buffer de perlas (BB2). Se agitó en vortex y se colocó en el rotador durante 5 min. Se tomaron 1700 μ L de muestra, 1860 μ L de buffer tampo y perlas de enzima, 1860 μ L, 1860 μ L de la mezcla de buffer de perlas y peptidil propil isomerasa y se descargaron en la placa de secuenciación.

3.22 Preparación de reactivos de secuenciación

Se añadieron 13 mL de Titanium Supplement CB y 2 mL de DTT. Se agitó por inversión. Se tomaron 5 μ L de PPIase y se colocaron en un tubo de 1.7 mL, se agregaron 45 μ L de Inhibitor TW y se agitó en vortex. Se tomaron 32 μ L de la dilución de PPIase. 5 μ L de PPIase por 45 μ L de Inhibitor TW, se añadieron al tubo contenido de inhibitor TW. Se añadieron 675 μ L de Apyrase al contenido de Apyrase Reagent Buffer. Se colocaron en el equipo. Posteriormente se abrió la cámara del secuenciador, se limpió el cartucho con solución Twen 20. La placa contenida con la muestra se colocó en el cartucho y se procedió a la secuenciación.

4 RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Estudios de campo

4.2 incidencia y severidad

El daño al cafetal ocasionado por la roya varía entre las localidades de estudio situadas en diferentes niveles altitudinales. En Sajonia ubicado a 740 m la incidencia, es decir, la presencia de la roya fue de 4%, su valor máximo de 15.6%. En Progreso fue de 13%, su valor máximo de 20.6% y en Altamira fue de 20%, su valor máximo de 24.3%. Registrando una disminución en presencia y daño por roya en enero, coincidiendo con la finalización de la cosecha. Evento que conlleva a la defoliación por efectos de la recolección de frutos (Cuadro 1 y 2).

Cuadro 1. Porcentaje de incidencia de roya del café en tres localidades de la región Frailesca, Chiapas, México.

Mes	Sajonia (740 m) incidencia	Progreso (920 m) incidencia	Altamira (1100 m) incidencia
Septiembre	4	13	20
Octubre	9	16	25
Noviembre	15.3	20	24
Diciembre	15.6	20.6	24.3
Enero	15	20	24
promedio	11.78	17.92	23.46

Con respecto al daño ocasionado en el área foliar del cafeto, es decir, la severidad al inicio del muestreo en Sajonia fue de 0%, en Progreso 10%, y en Altamira 30% registrando la mayor afectación a partir de noviembre para el caso de Sajonia y a partir de septiembre para el caso de Progreso y Altamira (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentaje de severidad de roya del café en tres localidades de la región Frailesca, Chiapas, México.

Mes	Sajonia (740 m)	Progreso (920 m)	Altamira (1100 m)
Septiembre	0	10	30
Octubre	3	10	30
Noviembre	10	30	60
Diciembre	10	60	60
Enero	30	60	30
promedio	10.6	34.0	42.0

La roya se desarrolló en una etapa de crecimiento acelerado, dado que el incremento en los niveles de incidencia y severidad de un mes a otro fue muy marcado (Figura 6). En promedio en las tres localidades se presentaron valores de incidencia y severidad superior al umbral de daño económico (5%) (CENICAFÉ, 2009).

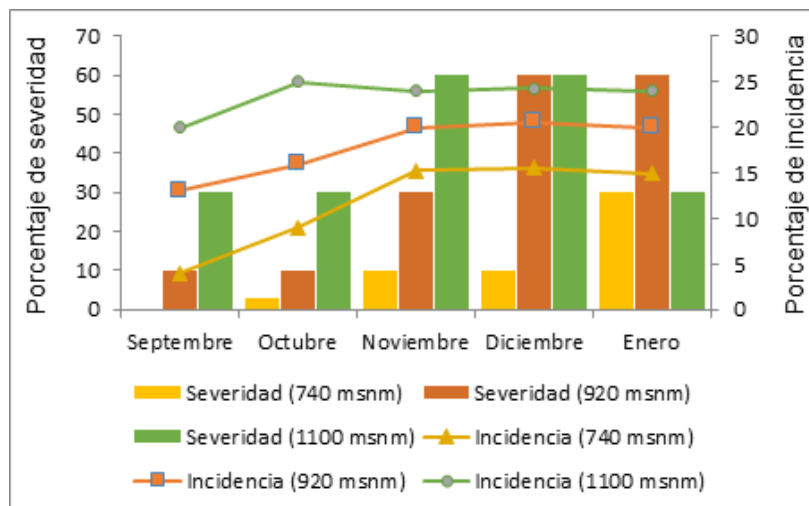


Figura 6. Comportamiento de la roya del café, basado en el nivel de incidencia y severidad en tres altitudes en la región Fraileca, Chiapas.

4.3 Análisis estadístico

Se obtuvo diferencia estadísticamente significativa de la incidencia de roya $p_{\text{valor}} < 0.05$; severidad $p_{\text{valor}} < 0.05$; presentando menor incidencia y severidad en Sajonia y mayor en Altamira (Cuadro 3 y 4).

Cuadro 3. Comparación múltiple de la incidencia en tres localidades de la región Frailesca, Chiapas, México.

Localidad	m.s.n.m	Rango promedio	
Sajonia	740	3.6	a
Progreso	920	7.8	a b
Altamira	1100	12.6	b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Cuadro 4. Comparación múltiple de la severidad en tres localidades de la región Frailesca, Chiapas, Mexico.

Localidad	m.s.n.m	Rango promedio		
Sajonia	740	4.2	a	
Progreso	920	9.0	a	b
Altamira	1100	10.8		b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

La incidencia de roya incrementó a partir de noviembre coincidiendo con el inicio de la cosecha en la cual se genera el tráfico de recolectores entre parcelas siendo éste un factor que pudiera intensificar la diseminación de esporas del hongo. Estos resultados guardan relación con lo observado por Méndez *et al.* (1985). Donde no coincide es el nivel de daño con respecto a la altitud ya que en este estudio a 740 m.s.n.m la incidencia y severidad fue menor. Al respecto, Santacreo *et al.* (1983) mencionan que en altitudes de 700 m, el periodo de latencia es más corta, mientras que a 1000 m es más prolongada. Sin embargo, los resultados obtenidos permiten sugerir que el periodo de latencia del hongo es menos prolongado en altitudes por arriba de los 1000 m dado que el mayor nivel de infección por roya se registró a 1100 m seguido de 920 m y en menor índice a 740 m.

En México el nivel de infección máxima por roya a 1100 m de altitud ha sido del 16% y a 700 m 24% donde el control de la enfermedad es menos necesario en zonas altas (Avelino *et al.* 1991). No obstante, en este estudio el nivel máximo de infección a 1100 m fue de 25% y 15.6% a 740 m respectivamente. Ante esto, el factor cambio climático ha tenido efectos importantes en el comportamiento de la roya del café (Gamarra *et al.*, 2016).

Se ha apreciado el efecto de las variaciones climáticas en los últimos años como la temperatura que ha provocado aumentos o disminución en el periodo de latencia de la roya (Rivillas *et al.*, 2011). Lo anterior puede explicar los diferentes resultados de los autores antes citados y los obtenidos en este estudio, ya que la presencia de la roya del café se registraba como límite hasta los 800 m sobre el nivel del mar, actualmente se observa por arriba de los 1500 m de altitud, fenómeno que se ha atribuido a la variación climática (Páramo y Medina, 2019).

Las condiciones climáticas consideradas en este estudio registraron variaciones durante el periodo de muestreo. Si embargo, fueron favorables para el desarrollo de la roya, en efecto se tomó la cantidad total de lluvia por mes, la media mensual de la temperatura, radiación solar y humedad relativa (Cuadro 5).

Cuadro 5. Datos climáticos tomados del Servicio Meteorológico Nacional. Estación Cuxtepeques en <https://smn.conagua.gob.mx>.

Mes	Precipitación (mm)	Temperatura (°C)	Radiación solar (W/m ²)	Humedad relativa (%)
Septiembre	107.0	23	201.4	83
Octubre	73.9	21.2	170.1	79
Noviembre	35.7	20.5	144.0	78
Diciembre	21.6	17.1	134.6	73
Enero	14.5	19.0	133.8	80

Cuando la temperatura registró un decremento de 17.1°C en diciembre, la incidencia de roya incrementó de 15.3% en noviembre a 15.6% en diciembre en Sajonia, en Progreso de 20% en noviembre a 20.6% en diciembre y en Altamira de 24% en noviembre a 24.3% en diciembre. Cuando la radiación solar disminuyó de igual manera la incidencia registró incrementos (Figura 7). El desarrollo de la roya se da con temperaturas entre 16 y 18°C y condiciones de baja intensidad luminosa (Kushalapa y Eskes, 1989). 18 y 24°C (Barquero, 2013). La precipitación actúa como un agente dispersante y germinador de las esporas, la radiación solar como un inhibidor de la germinación y la humedad relativa no es determinante para el desarrollo de la enfermedad, se necesita agua libre sobre las hojas para la germinación del hongo (Nutman *et al.*, 1960 y Barquero, 2013).

4.4 Correlación del comportamiento de la roya con factores climáticos

Los factores climáticos considerados influyen significativamente en el desarrollo y comportamiento de la roya (Cuadro 6).

Cuadro 6. Correlación del comportamiento de roya con factores climáticos

Incidencia (%)	Precipitación (mm)	Temperatura (°C)	Radiación solar (W/m ²)	Humedad relativa (%)
740 msnm	-0.98	-0.85	-0.99	0.72
920 msnm	-0.98	-0.88	-0.99	0.74
1100 msnm	-0.68	-0.64	-0.75	0.65

En la medida que los factores climáticos tienden a incrementar la incidencia de roya tiende a disminuir (cuadro 7). Estos resultados guardan relación con lo reportado por Vásquez (1992) y Loaisiga (1993) quienes obtuvieron una correlación significativa del comportamiento de roya con factores climáticos. Becker (1979) afirma que lluvias fuertes y prolongadas eliminan parte del inóculo, esto permite deducir que los

coeficientes negativos obtenidos con respecto a la precipitación puede ser por el efecto que tienen las lluvias al lavar parte del inóculo.

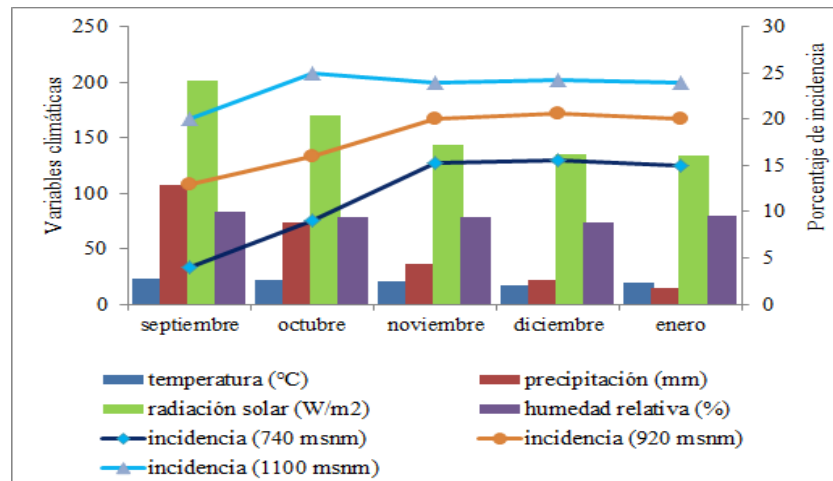


Figura 7. Comportamiento de la roya con relación a factores climáticos.

Las parcelas ubicadas a 920 m y 1100 m de altitud presentaron al inicio del muestreo incidencia superior al 5% del umbral de daño económico (CENICAFÉ, 2009) en estas condiciones es recomendable el control de la enfermedad a base de un fungicida sistémico; en contraste con la parcela ubicada a 740 m que al inicio del muestreo presentó incidencia inferior al 5%, en ésta es recomendable el control preventivo con el fin de detener el avance de la enfermedad (Barquero, 2013). Sin embargo, el desconocimiento por parte del productor sobre el manejo y control de la roya es escaso siendo este uno de los factores que contribuye al desarrollo desmedido de la enfermedad. Ante esto, la implementación y/o intensificación del uso de métodos para determinar incidencia y severidad, ayudaría a los productores a la toma de decisiones adecuadas y en consecuencia a mantener los mínimos índices de incidencia y severidad de la roya del café en las parcelas.

4.5 Estudios moleculares

Del aislado de roya colectado en la localidad de Sajonia la cual presentó menor incidencia y severidad, se obtuvo una concentración de 400 ng/μL de ADN cantidad que fue suficiente para llevar a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

4.6 Visualización de amplicones en gel de agarosa

Se obtuvieron amplicones aproximados de 200 y 250 pb. El aislado colectado en Sajonia presentó una marcada diferencia con respecto al aislado colectado en

Progreso y en Altamira (Figura 8). Este resultado permite predecir posible diversidad genética intraespecie.

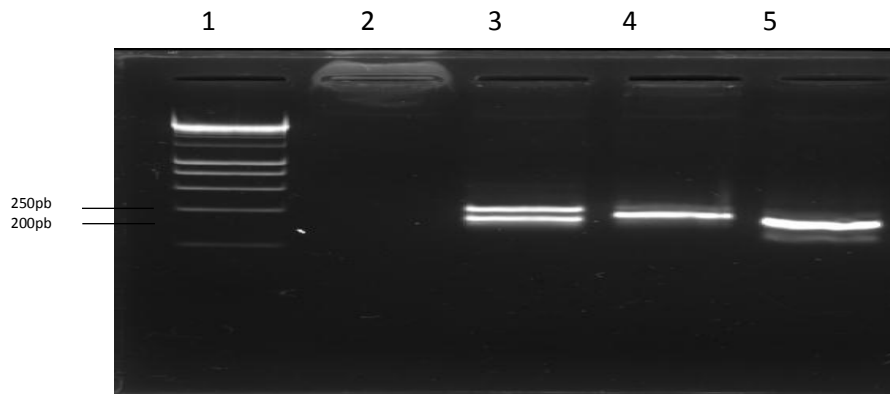


Figura 8. Amplicones en gel de agarosa. 1) Marcador de referencia, 2) control negativo, 3)aislado en Sajonia, 4) aislado en Progreso, 5) aislado en Altamira.

4.7 Preparación de la genoteca

Del proceso de fragmentación por nebulización y la cuantificación del ADN por fluorometría se obtuvo una concentración de 55.7 ng/ μ L. La fragmentación se analizó en un chip de ADN. Se obtuvieron fragmentos entre 70 y 90 pares de bases de ADN fragmentado.

4.8 Secuenciación del aislado de roya colectado en Sajonia

La secuenciación se llevó a cabo mediante la plataforma 454 Roche, tuvo una duración aproximado de 9 h en emitir las lecturas. El ensamble de la secuencia se realizó a través de software Galaxy bioinformatics versión 3.1.0

4.9 Alineamiento de secuencia

La secuencia fue alineada y comparada con información disponible en la base de datos del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) mediante la técnica del Blastn (Zheng *et al.*, 2000) (Figura 9).

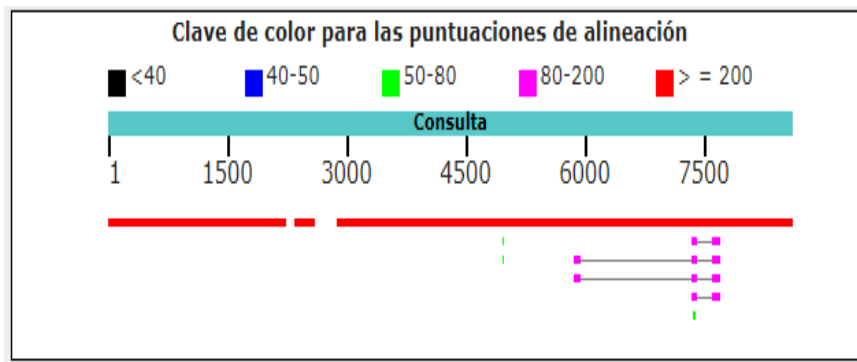


Figura 9. Alineamiento de secuencia aislado de roya colectado en Sajonia ubicado a 740 m.s.n.m.

El resultado del alineamiento de secuencia mostró una similitud del 99% con *H. vastatrix* (JF288626.1), reafirmando de esta manera que el microorganismo en estudio corresponde al patógeno roya del café y su persistencia en la región Frailesca Chiapas (Figura 10). Así mismo una similitud con roya amarilla del trigo *Puccinia striiformis f.sp.Tritici* (NC_0396), (MH89148). Roya de la soya *Phakopsora meibomiaae* (GQ338834.1), (GQ332420.1).

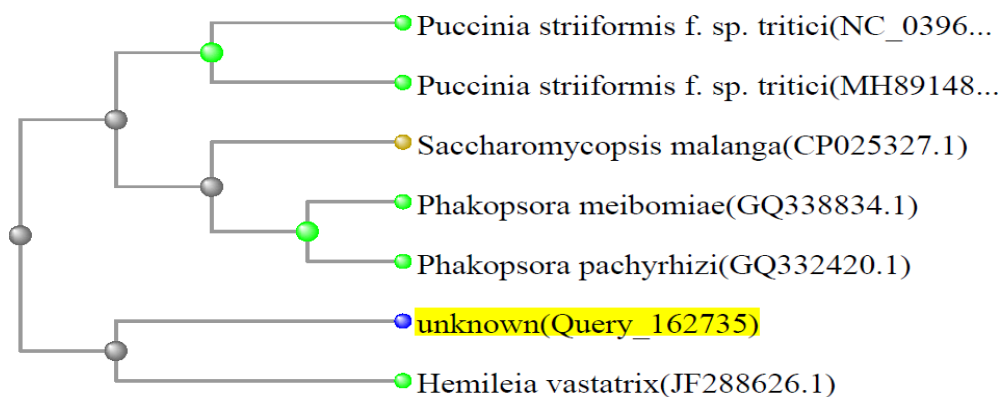


Figura 10. Similitud del aislado de roya colectado en Sajonia, ubicado a 740 m.s.n.m.

4.10 Anotación del genoma

Utilizando SnapGene v 4.3.8.1 se obtuvo la representación gráfica del genoma del aislado de roya colectado en Sajonia, a partir de los *contigs* ensamblados. Secuencias codificantes en sentido *forward* puntos en color naranja y secuencias codificantes en sentido *revers* en color verde, aminoácidos y cofactores que se indican entre paréntesis presentes en cada *contig* del genoma (Figura 11).

En el intento de aportar al conocimiento sobre el genoma de la roya del café con el uso de la tecnología 454 de Roche se obtuvieron 48623 pb, relación de GC de 33% lo que significa que el 67% corresponde a AT. El 33% de los *contigs* albergan secuencias relacionadas con la retrotranscripción de elementos repetidos. Este resultado es similar con lo reportado por Cristancho *et al.* (2014) utilizando plataforma Illumina 454.

Los microorganismos royas poseen genomas muy grandes lo que se convierte en reto para su secuenciación (Duplessis *et al.*, 2014; Prado 2017) lo que implica el uso de tecnologías de secuenciación de próxima generación. Sin embargo utilizando la tecnología 454 de segunda generación se obtuvo información que oporta al conocimiento del genoma del patógeno roya del café y su posible mecanismo efector.

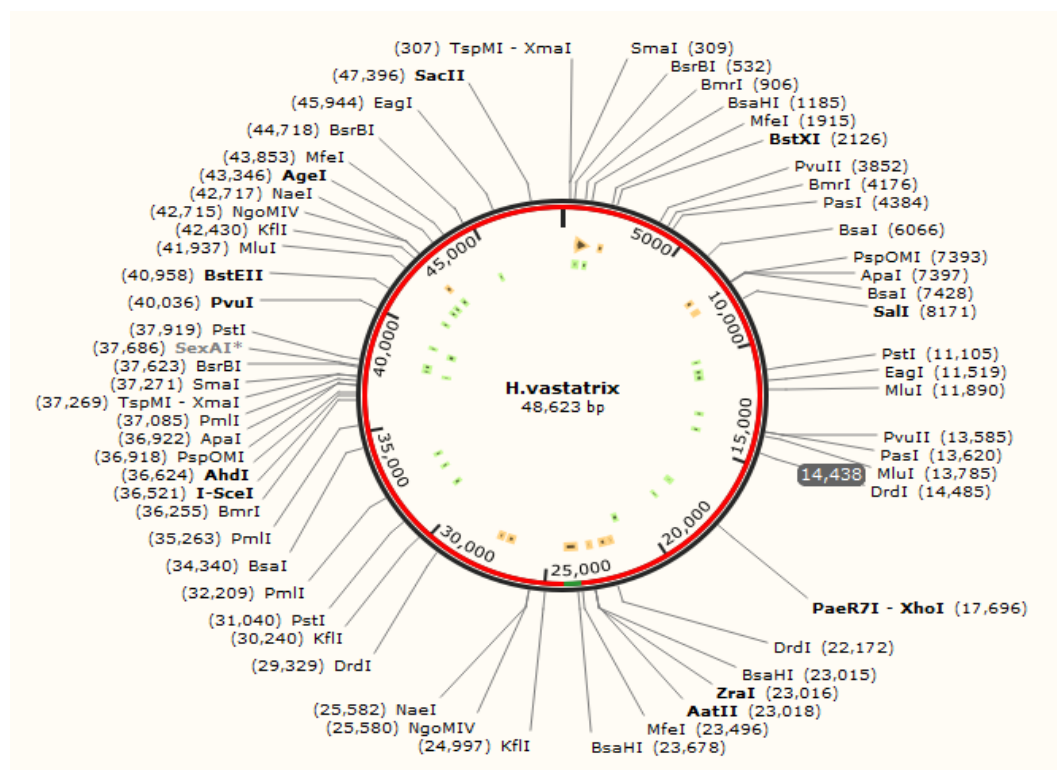


Figura 11. Representación esquemática del genoma a partir de los *contigs* ensamblados. Aislado de la roya del café colectado en Sajonia ubicado a 740 m.s.n.m.

4.11 Anotación de secuencias

El análisis de biosecuencias utilizando perfiles ocultos de Marcov del servidor HMMER v. 3.2.1 se identificaron secuencias homólogas del aislado de roya del café colectado en Sajonia de la región Frailesca Chiapas. 102 secuencias codificantes de

la cual la anotación indicó que el 33% está relacionado con secuencias que codifican para la retrotranscripción de elementos repetidos, 10% por secuencias que pueden estar relacionadas con la patogenicidad, 12% con infectividad/virulencia, 10% por secuencias relacionadas con mecanismos de defensa, 4% por secuencias relacionadas con transducción de señales, 8% por secuencias de función desconocida no caracterizada. No obstante, dos tienen homología con *Bacillaceae* (bacterias gram positivas y gram negativas) productoras de endosporas y 23% por secuencias de proteínas de dominios conservados (Figura 12).

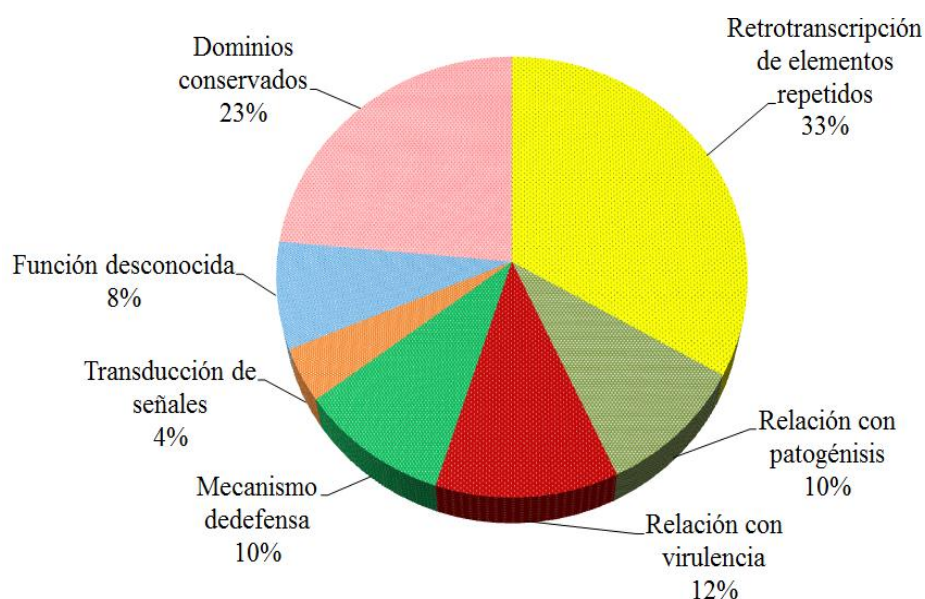


Figura 12. Proporción de secuencias en cada *contigs* del genoma, aislado de la roya el café colectado en Sajonia ubicado a 740 m.s.n.m.

El dominio RT (proteína inversa), está representado por dos perfiles separados RVT_1 y RVT_2 (Figura 7) estas secuencias se albergan en diez *contigs*, así como el *retrotran_gag_2* que se alberga en siete *contigs* del genoma de la roya; ambos se describen como presentes en una variedad de elementos móviles asociados con la retrotranscripción de elementos repetidos. En efecto, en el proceso de retrotranscripción viral es posible que ocurran mutaciones como resultado de numerosos eventos de multiplicación, y por lo tanto mayor número de eventos de mutación y como consecuencia resistencia y variabilidad genética (Fernández, 2011).

Cuadro 7. Anotación de secuencias del aislado de roya del café colectado en Sajonia ubicado a 740 m.s.n.m

	Contig de localizacion	Identificador	Descripción
Retrotranscripción elementos repetidos	<i>Contig00404.g99</i>	Retrotran_gag_2	gag-polipéptido de tipo copia LTR
	<i>Contig 00013</i>	RVT_1	Transcriptasa inversa
	<i>Contig 00021</i>	RVT_2	Transcriptasa inversa
Posible patogenicidad	<i>Contig00226.g78</i>	Hidrolasa_6	Halo ácido deshalogenasa hidrolasa
	<i>Contig00664.g123</i>	Peptidasa_M3	Peptidasa de la familia M3
	<i>Contig03754.g253</i>	Peptidasa_S37	PS-10 peptidasa S37
	<i>Contig06031.g311</i>	Hidrolasa_4	Serina aminopeptidasa, S33
	<i>Contig11348.g404</i>	Peptidasa_M64	IgA peptidasa M64
Relacionado con procesos infectivos	<i>Contig00066.g26</i>	Géminis_AL2	Proteína de Geminivirus AL2
	<i>Contig00456.g104</i>	Ac81	Baculoviridae AC81
	<i>Contig00190.g68</i>	PIF	Infectividad <i>per os</i>
	<i>Contig11617.g410</i>	Tox-HDC	Toxina con firma H, D / N y C
	<i>Contig00458.g105</i>	PRIa4_ORF3	Plásmido pRIa4b proteína similar
Relacionado con mecanismo de defensa	<i>Contig00232.g82</i>	ABC_tran	Transportador ABC
	<i>Contig03144.g233</i>	Cas_TM1802	Proteína asociada a CRISPR (cas_TM1802)
	<i>Contig06872.g327</i>	Streptin-Immun	Proteína de inmunidad estreptina antibiótica
	<i>Contig09874.g385</i>	ABM	Biosíntesis de monooxigenasa
	<i>Contig00578.g115</i>	Sod_Fe_N	Superóxido dismutasas de hierro / manganeso, dominio alfa-horquilla
Transducción de señal	<i>Contig18604.g459</i>	Jnk-SapK_ap_N	Proteína-1 asociada a JNK_SAPK
	<i>Contig11233.g403</i>	Jnk-SapK_ap_N	Proteína-1 asociada a JNK_SAPK
Sin función conocida	<i>Contig08989.g371</i>	UPF0203	Familia de proteínas no caracterizadas (UPF0203)
	<i>Contig07497.g344</i>	DUF2521	Proteína de función desconocida (DUF2521)
	<i>Contig05021.g279</i>	DUF1465	Proteína de función desconocida (DUF1465)
	<i>Contig05160.g287</i>	DUF5385	Familia de función desconocida (DUF5385)

Las secuencias que corresponden al 10% en las que se destacan (peptidasas, hidrolasas, serina aminopeptidasas) se describen como degradadoras de proteínas estructurales de la pared celular (Pekkarinen, 2003). Al respecto, Bonants *et al.* (1995) purificaron mediante cromatografía una proteína (serina proteasa) similar a (serina aminopeptidasa), ésta tuvo la capacidad de degradar la capa vitelínica de huevos inmaduros del nematodo *Meloidogyne hapla*, las serinas proteasas y/o serina aminopeptidasas juegan un papel importante en la penetración del hongo en el hospedante. Cardona *et al.*, (2007) reportaron las peptidasas en el hongo Hyphomycete, factor de virulencia en *Metharizium anisopliae* (Téllez *et al.*, 2009).

Los plásmidos son únicos generalmente se han reportado en bacterias y arqueas Loeza *et al.* (2004) y Hernández (2019), Sin embargo, se identificó la secuencia que codifica para esta proteína en el *contig* número 00458 del aislado de la roya del café. Esta secuencia que codifica para una proteína relacionada con un plásmido ofrece un área de oportunidad como auxiliar en el control de la enfermedad a través de la manipulación e introducción de genes de interés con el fin de disminuir los efectos causados en este caso por la roya del café.

Los geminivirus han sido reportados en insectos del orden homoptera (Zúñiga y Ramírez, 2002). Durante su replicación se producen múltiples copias del mismo genoma viral para lograr infectar sistémicamente a la planta hospedera susceptible (Stange, 2006). *Baculoviridae* del género *Spodoptera Frugiperda* y *Trichoplusia ni* (Miller, 1997) es un virus de categoría dos por su virulencia al albergar proteínas fosforilasas y metal proteasas e infectan a insectos y otros artrópodos (Varela-Mejía 2018). Las designadas con el nombre de *per os*, se describen como un grupo de proteínas infectivas (Kikhno *et al.*, 2002). Las toxinas de tipo H, D/N y C, que se describen como una triada compuesta por una histidina (H), aspartato/ asparagina (N) y residuos de cisteína (C) comprenden el sitio activo de una peptidasa (Moayeri *et al.*, 2015). Han sido reportada en *Clostridium perfringens* produce toxina necrotizante letal en humanos y animales (Morris y Fernández, 2009).

Las proteínas transportadores ABC juegan un papel importante en la protección de microorganismos, confiriendo protección al hongo frente a antibióticos, compuestos de plantas y fungicidas (Álvarez y Pulido 2008; Jones y George, 2004). A los transportadores ABC recientemente se les ha designado como factores de patogenicidad de hongos de importancia agronómica como *Magnaporthe grisea*, *Botrytis cinerea*, *Gibberella pulicaris*, *Fusarium culmorum* y *Mycosphaerella graminicola* (Cough, 2010). Aun no se cuenta con información suficiente de cómo los transportadores ABC adquieren la función de patogenicidad lo que se convierte en una limitante para conocer mejor la importancia de las secuencias relacionadas con los transportadores ABC. Sin embargo, se convierte en una área de oportunidad que

pudiera conducir al desarrollo de productos fungicos tóxicos como alternativa para el control de la enfermedad.

Los CRISPR/Cas, se constituyen como secuencias con un sistema inmune que responde a elementos de ADN invasores plasmidico (Chávez, 2018), propios en bacterias y arqueas (Lammoglia *et al.*, 2016). Al respecto, (Hernández, 2018) adicionaron o eliminaron diferentes espaciadores a cepas de *Streptococcus thermophilus* lo que modificó su fenotipo de resistencia a fagos. Se identificó la secuencia en el *contig* 03144 del genoma del hongo roya del café. Este sistema CRISPR/cas, es clave en el proceso de mutación (Webber y Piddock 2003). El complejo CRISPR/cas tiene aplicaciones en ingeniería genética, permite manipular el ADN con la que se logra introducir genes de interes específicos en la molécula de ADN y de esta manera lograr cambios específicos en el genoma de microorganismos (Hernández 2018). Asi mismo, se identificó la secuencia relacionada con la proteína de inmunidad a estreptina antibiótica en el *contig* 06872, este antibiótico ha sido reportado en *Streptomyces griseus*.

La proteina relacionada con la biosíntesis monooxigenasa juega un papel importante en la defensa, transformación, oxidación de productos quimicos (fungicidas, plaguicidas organofosforados, productos tóxicos) (Rodríguez y Rodeiro 2014). La secuencia relacionada con ésta proteina se localizó en el *contig* 09874. La proteína superóxido dismutasa con un cofactor hierro/manganeso representa un arma defensiva frente al ataque de sustancias nocivas (Castillo y Riverón, 2014) contribuyendo asi al potencial virulento de microorganismos patógenos en su interacción con el hospedante. La secuencia relacionada con la superoxido dismutasa ha mantenido un alto grado de conservación durante la evolución (Castillo, 2014). En el grupo de trasducción de señales se identificó la secuencia de la Jun N-Terminal Kinase en el *contig* 18604 y 11233, pertenece a la familia de proteínas kinasa activadas por mitógenos relacionada con el estímulo y muerte celular programada (Muñoz y Caelles, 1997).

Los microorganismos han sufrido cambios evolutivos en tiempo y espacio y han dado lugar a otras variantes, acumulando diferencias genéticas (Cuevas 2012). No obstante, el patógeno roya del café, ha mantenido parte de su información genética conservada, esto a pesar de la especiación. Es decir, que evolutivamente estas secuencias no han sufrido cambios. Se identificaron secuencias en las que se destacan deshidrogenasas, endonucleasas y oxido reductasas (Cuadro 8), relacionadas con elementos de inserción retroviral llevado a cabo por enzimas virales transcriptasa reversa, proteasa e integrasa (Gualtero *et al.*, 2018) relacionadas con la virulencia de patógenos dado que una deshidrogenasa, peptidasas y oxido

reductasa fueron reportadas como responsables de la virulencia del hongo *Botrytis cinerea* (Fernández *et al.*, 2009).

Cuadro 8. Dominios de secuencias conservadas en el genoma de la roya del café. Colectado en Sajonia ubicado a 740 m.s.n.m

Dominio	Accesión	Descripción
RNase_Ty1	cd09272	Familia Ty1 Copia de RNase en retroelementos repetidos
RVT_2superfamilia	cl06662	Transcriptasa inversa (ARN polimerasa. Gen transcriptasa
rve	pfam00665	Integrasa del dominio central, copia de ADN
Retrotran_gag	cl26047	gag-polipéptido de tipo copia LTR
gag_pre-integrasa	pfam13976	Dominio GAG-pre-integrasa
ND5	cl33344	Subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa
GIY-YIG_SF	cl15257	nucleasa GIY-YIG; dominio de nucleasa
NADHdh	pfam00146	NADH deshidrogenasa
LAGLIDADG_1	pfam00961	Endonucleasa LAGLIDADG
Oxidored_q2	cl00492	NADH-ubiquinona plastoquinona oxidoreductasa
LAGLIDADG_2	cl03916	Endonucleasas de ADN LAGLIDADG

El hallazgo de secuencias en el genoma de la roya el café provee evidencias y podrían indicar los mecanismos de acción del patógeno para infectar a su hospedante.

Las interacciones entre los hongos y sus plantas hospederas son enormemente sofisticadas y complejas por lo que estudios adicionales ayudarán a comprender mejor la función de las secuencias identificadas en los mecanismos del patógeno; su relación en la modulación, variabilidad genética y resistencia del agente causal de la enfermedad de la roya del café.

5 CONCLUSIONES

La investigación realizada determina que el comportamiento de la roya del café difiere en relación a la altitud (m.s.n.m) entre las localidades de Sajonia, progreso y Altamira.

Con base en los datos de estadística presentada, es posible concluir que existe diferencia estadísticamente significativa de la incidencia y severidad de la roya del café en tres localidades, situadas en tres gradientes altitudinales de la región Frailesca, Chiapas.

Existe una relación entre el comportamiento del patógeno y los factores ambientales como temperatura, precipitación, humedad relativa y radiación solar debido a que cuando una de las variables independiente tiende a aumentar la variable dependiente tiende a disminuir.

Los métodos utilizados en campo y el uso de la tecnología 454, permitieron conocer la dinámica y características moleculares del patógeno que pudieran estar relacionadas con el mecanismo de patogenicidad, virulencia e infectividad, de defensa, proceso de retrotranscripción de elementos repetidos, trasducción de señales, de dominios conservados y de función desconocida.

Lo anterior, no obvia el hecho de que existan otros factores relacionados con el desarrollo y comportamiento de la roya del café y de componentes moleculares que podrían ser estudiados a fin de profundizar en el conocimiento de la dinámica del patógeno roya del café.

6 LITERATURA CITADA

- C. Cabral , P. G., Zambolim, E. M., T. P. , L., Capucho, A. S., & Caixeta, E. T. (2009). Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 4, 129,130. Obtenido de <https://core.ac.uk/download/pdf/45490144.pdf>
- Castillo Casaña, Y., & Riverón Forment, G. (2014). Cytosolic superoxide dismutase and genetic diseases. *Rev Cubana Genet Comunit*, 8(1), 15-11. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenl.cgi?IDREVISTA=321&IDARTICULO=53929&IDPUBLICACION=5468>
- Castillo Casaña, Y., & Riverón Forment, G. (2014). Superóxido dismutasa citosólica y enfermedades genéticas. *Rev Cubana Genet Comunit*, 8(1), 5-11.
- Fernández-Medina, R. D., Struchiner , C. J., & Ribeiro , J. M. (2011). Nuevos elementos transponibles de *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics*. Obtenido de https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/2561/1/ENSP_Tese_Fern%C3%A1ndes_Medina_Rita_Daniela.pdf
- Hernández Ramírez, K. C. (s.f). *Plásmidos bacterianos*. Recuperado el 01 de noviembre de 2019, de <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/283-numero-33/510-plasmidos-bacterianos.html>
- Lammoglia-Cobo, M. F., Lozano-Reyes, R., García-Sandoval, C., Avilez-Bahena, C., Trejo-Reveles, V., Muñoz-Soto, R., & López-Camacho, C. (2016). La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas. *Investigacion en discapacidad*, 5(2), 116-128. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=65496>
- Muñoz, A., & Caelles, C. (1997). Potencial farmacológico de inhibidores de la Jun N-Terminal Kinase (JNK). *Genes & Development*, 11, 351- 364.
- National Academy of Sciences. (1980). Desarrollo y Control de las Enfermedades de las plantas. *control de plagas en plantas y animales*, 1, 223.
- Páramo, O., & Medina, F. (2019). *Cambio climatico, roya y politica afectan al café de Chiapas*. Obtenido de <http://www.unamglobal.unam.mx/?p=48384>
- Pekkarinen, A. (2003). *Las serinas proteinasas de Fusarium.cultivado en proteínas de cereales y en Grano de cebada y su inhibición por proteínas de cebada*. Obtenido de <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/bio/bioja/vk/pekkarinen/theserin.pdf>

- Quiroz-Castañeda, R. E., & Folch-Mallol, J. L. (2001). Proteínas que remodelan y degradan la pared celular vegetal: perspectivas actuales. *Biotecnología Aplicada*, 28(4).
- Rodríguez González, J., & Rodeiro Guerra, I. (2014). El sistema citocromo P450 y el metabolismo de xenobióticos. *Rev Cubana Farm*, 48(3), 495-507. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152014000300015
- Sacristán, S., & García Arenal, F. (2008). The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Molecular Plant Pathology*, 9(3), 369-384. doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00460.x
- Stange, C. (2006). Interacción planta-virus durante el proceso infeccioso. *Revista latinoamericana de ciencias de la agricultura*, , 33(1), 3-21. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1986222>
- Téllez Jurado, A., Cruz Ramírez, M. G., Mercado Flores, Y., Asaff Torres, A., & Arana Cuenca, A. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Rev. Mex. Mic*, 30.
- Varela-Mejías, A. (2018). Incidencia detectada del Baculovirus penaei en muestras de post larvas importadas en Costa Rica. *Repertorio Científico*, 21(1), 14-21. doi:10.22458/rc.v21i1.2387
- Zhang, J., Chiodin, R., Badra, A., & Zhang, G. (2011). The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of Genetics and Genomics*, 38(3), 95-109. doi:10.1016/j.jgg.2011.02.003
- Zúñiga-Vega, C., & Ramírez, P. (2002). Los geminivirus, patógenos de importancia mundial. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*(64), 25-33. Obtenido de <http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/6510/A2040e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Aguilar-Bultet, L., & Falquet, L. (2015). Secuenciación y ensamblaje de novo de genomas bacterianos: una alternativa para el estudio de nuevos patógenos. *Rev. Salud Anim.*, 37(2), 125-132. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-570X2015000200008&script=sci_abstract
- Aime, M. (2006). Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). *Mycoscience*, 3(47), 112-122. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/227329395_Toward_resolving_family-level_relationships_in_rust_fungi_Uredinales
- Álvarez de Felipe, A. I., & Pulido Duarte, M. M. (2008). Transportadores de tipo ABC: con secuencias de su interacción con flavonoides. *Boletín Latinoamericano y*

- del Banco de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7(6), 296-311. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85611255003>
- Andrade, A. C., Del Sorbo, G., Van Nistelrooy, J., G. M., & Waard, M. , A. D. (2000). The ABC transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds. *Microbiology*, 146(8), 1987-1997. Obtenido de <https://edepot.wur.nl/43785>
- Arneson, P. A. (2000). *Roya del Café*. doi:10.1094/PHI-I-2000-0718-02
- Avelino, , J., Muller, R., A., Cilas, , C., & Velasco Pascual, P. 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. Obtenido de <https://eurekamag.com/research/015/754/015754980.php>
- Barquero, M. (2013). *Recomendaciones para el Combate de la Roya del cafeto* (3ra. edicion ed.). San Jose, Costa Rica: ICAFE. Recuperado el 30 de octubre de 2019, de https://www.researchgate.net/publication/281625030_Recomendaciones_para_el_combate_de_la_roya_del_cafeto
- Barrera, J. B. (s.f). *Principales plagas y enfermedades del cafe en mexico*. Recuperado el 06 de Noviembre de 2019, de https://issuu.com/revistaelcafetalero/docs/principales_plagas_cafe
- Bonants, P. J., P.F.L. , P., H. Thijs, de E., B. C., Waalwijk, & J.W.D.M. , H. (1995). A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne* hapla eggs. *Microbiology*, 141, 775-784.
- CABI. (2016). *Crop Protection Compendium*. CAB International, Walling- ford, UK. Recuperado el 21 de Julio de 2019, de <http://www.cabi.org/compendia/cpc/>
- Canet, G., Soto, C., Ocampo, P., Rivera, J., Navarro, A., Guatemala, G., & Villanueva, S. (2016). *La Situación y tendencias de la producción de café en América Latina y el Caribe*. San Jose Costa Rica: ICA/CIATEJ. Recuperado el 20 de Agosto de 2019, de https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5a43b896c22f1.pdf
- Cardona Bustos¹, N. L., Betancur Pérez², J. F., Rivera Serna³, L. F., & Bustamante Gaitán, A. (2007). Identificación de genes candidatos de patogenicidad en la interacción de la cepa CENICAFE 9501 con el nematodo del nudo radical *Meloidogyne* spp. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*, 61(2), 4527-4541. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v61n2/a07v61n2.pdf>
- Carvalho,, C. R., Fernandez , C. R., Carvalho, G. M., Barreto, R. W., & Evans, H. C. (2011). Cryptosexuality and the genetic diversity paradox in coffee rust, *Hemileia vastatrix*. *PloS one*, 6(11). doi:doi:10.1371/journal.pone.0026387

- Castillo, O. V. (1992). Epidemiología de la roya del café (*Hemileia vastatrix* B. y Br.) en las zonas norte y pacífico de Nicaragua. (*tesis ingeniería*). Universidad Nacional Agraria Facultad de agronomía, Managua, Nicaragua. Obtenido de <http://repositorio.una.edu.ni/1892/>
- CEDRSSA. (Noviembre de 2014). *Producción y mercado de café en el mundo y en México*. Recuperado el 06 de Noviembre de 2019, de http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/39Reporte_Producci%C3%B3n_y_mercado_de_caf%C3%A9_-_Cedrssa_2014.pdf
- CENICAFÉ. (2009). Control de la Roya del cafeto con base en los niveles de infección. *Cenicafé*, 3.
- Centro de Comercio Internacional. (s.f). *La guía del café*. Recuperado el 06 de Noviembre de 2019, de Robusta- la especie: <http://www.laguiadelcafe.org/guia-del-cafe/calidad-del-cafe/Robusta-la-especie/>
- Chávez Jacobo, V. M. (2018). El sistema de edición genética CRISPR/Cas y su uso como antimicrobiano específico. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21(2), 116-123.
- Concepción Hernández, M. (2018). CRISPR/Cas: aplicaciones y perspectivas para el mejoramiento genético de plantas. *Biotecnología Vegetal*, 18(3), 135-149.
- Couoh Uicab, Y. L., Canto Canché, B. B., & Islas Flores, I. (2010). Review of characteristics of ABC transporters involved in fungal pathogenesis. *Tecnociencia*, 4(2), 87-96.
- Cristancho A., M. A., Rozo, Y., Escobar, C., Rivillas, O., & Gaitan B, A. L. (2012). Razas de Roya, epidemia 2008-2011. *Cenicafé*. Recuperado el 30 de octubre de 2019, de <https://www.cenicafe.org/es/publications/avt04251.pdf>
- Cristancho, M. A., Boreto Rozo, D. O., Gildardo, W., Tabima, J., Riaño Piachon, D. M., Escobar, C., . . . Gaitan, A. L. (2014). La anotación de un genoma parcial híbrido de la roya del café (*Hemileia*). *Front Plant Sci*. doi:10.3389/fpls.2014.00594
- Cristancho-Ardila, M. A., Escobar-Ochoa, C., & Ocampo-Muñoz, J. D. (2007). Evolucion de razas de *Hemileia vastatrix* en Colombia. *CENICAFE*, 58(4). Obtenido de <https://www.cenicafe.org/es/publications/arc058%2804%29340-359.pdf>
- Cuevas García, E. (2013). Mecanismos de especiación ecológica en plantas y animales. *Biológicas*, 14(2), 7-13. Obtenido de <https://www.biologicas.umich.mx/index.php?journal=biologicas&page=article&op=view&path%5B%5D=130>

- Cummins, & Hiratsuka. (2003). Illustrated genera of rust fungi, 3rd edn., St. Paul, MN. *American Phytopathological Society*. Obtenido de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20033110681>
- Duplessis , S., Bakkeren , G., & Hamelin , R. (2014). Avanzando en el conocimiento de la biología de los hongos de la roya a través de la genómica. *Adv. Larva del moscardón. Res*, 173-209.
- Fernandez Acero, F. J., Colby, T., & Hanzen , A. (2009). Proteomic analysis of th phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* cellulose degradation. *Proteomics*, 892-902. doi: 10.1002/pmic.200800540
- Fernández Ortuño, D., Torres, J. A., & Perez Garcia, A. (2008). Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *Sociedad Española de Microbiología*. doi:10.2436/im.v11i1.9642
- Gamarra Gamarra, D., Torres Suarez, G., Casas Samaniego, J., & Riveros Izarra, H. (2016). Caracterización y manejo integrado de la roya amarilla del café en la selva central del Perú. *Convicciones*, 2(15). Obtenido de <http://revistas.uncp.edu.pe/index.php/convicciones/article/view/189>
- Gil V., L., & Ocampo M., J. (1988). Identificación de razas XXII (V5,6) de *Hemileia vastatrix* Berk Y Br. en Colombia. *CENICAFE*, 49(3), 340-344. Recuperado el 30 de Octubre de 2019, de <https://www.cenicafe.org/es/publications/arc049%2804%29340-344.pdf>
- Goodwin, Sara, McPherson, John D., McCombie, & Richard W. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333-351. Obtenido de <https://www.nature.com/articles/nrg.2016.49>
- Gualtero, S., Valderrama, S., Quiroga, C., Garzon, J., Lowenstein, E., Tamara, R., . . . León Méndez, M. L. (2018). Inhibidores de Transferencia de la Cadena de Integrasa. *INFECTIO*, 23(S1), 98-120. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v23s1/0123-9392-inf-23-s1-00106.pdf>
- Hernández Martínez, G., & Velázquez Premio, T. (2016). Análisis integral sobre la roya del café y su control. *Rinderesu*, 1(1), 92-99. doi:ISSN 24485527
- Hernández, M. C. (2018). CRISPR/Cas: applications and perspectives for plant genetic improvement. *Biotecnología Vegetal*, 18(3), 135-149. Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/585/html>
- Hoyos Carbajal, L. M., Gil Vallejo, L. F., & Valencia, A. (2003). Estudio de las interacciones de *Hemileia vastatrix* -*coffea* spp. proteínas tempranas. *Cenicafe*, 54(4), 278-285. Obtenido de <https://www.cenicafe.org/es/publications/arc054%2804%29278-285.pdf>

- Jacques , A., & Galileo Rivas. (2013). La roya anaranjada del cafeto. *HAL Id*. Recuperado el 30 de octubre de 2019, de https://www.researchgate.net/publication/260789530_La_roya_anaranjada_del_cafeto
- Jones , P. M., & George, A. M. (2004). The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(6), 682-699. doi:10.1007/s00018-003-3336-9 .
- Kikhno, I., Gutierrez, S., Croizier, L., Croizier, G., & López-Ferber, M. (2002). Characterization of pif, a gene required for the per os infectivity of Spodoptera littoralis nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*, 83(12), 3013-3022. doi:10.1099/0022-1317-83-12-3013
- Kushalapa, A. C., & Eskes, A. R. (1989). Advances in coffee rust research. *Annual Review of Phytopathology*., 503-531. Obtenido de <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.py.27.090189.002443>
- Lafuente-Rincón, D. F., Barboza-Corona , J. E., Salcedo-Hernández , R., Abraham-Juárez , R., Valadez-Lira , J. A., Quistián-Martínez , D., & De la Fuente-Salcido , N. M. (2016). Identificación Molecular de hongos fitopatógenos de fresa por PCR (ITS Y EF-1 α) y susceptibilidad a bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis*. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 417-422. Obtenido de <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/1/3/72.pdf>
- Leguizamón, C., Castillo Z., J., & Orozco C., F. (1984). Identificación de la raza II de *Hemileia vastatrix* Berk y Br. en Colombia. *CENICAFE*, 35(1), 26-28.
- Loasiga Gutierrez , H. (1993). Estudio epidemiológico de la roya del café y su efecto sobre la producción en la zona norte de Nicaragua. (tesis ingeniería). Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua. Obtenido de <http://repositorio.una.edu.ni/1627/1/tnh201795e.pdf>
- Loeza Lara, P. D., Valdéz Alarcón, J. J., Baizabal Aguirre, V. M., & López Meza, J. E. (2004). Mecanismo de replicación de los Plásmidos Bacterianos. *Rev*, 23(2), 71-78. Obtenido de http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2004/06/71-78_PEDRO_D.pdf
- MA Webber, M. A., & Piddock, L. J. (2003). La importancia de las bombas de eflujo en la resistencia a los antibióticos bacterianos. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 15(1), 9-11.
- Manzo-Sánchez,, G., Ortiz Vázquez, E., & Simpson Williamson,, J. (2007). Desarrollo de Mapas Genéticos y Físicos de Hongos y perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(1). Obtenido de https://www.academia.edu/20836796/Desarrollo_de_mapas_gen%C3%A9tico

s_y_f%C3%ADsicos_de_hongos_fitopat%C3%B3genos_Aplicaciones_y_perspectivas

- Maxam , A., & Gilbert, A. (1997). new method for sequencing DNA. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 74(2), 560-564. Obtenido de <http://www.ask-force.org/web/Genomics/Maxam-Gilbert-New-Method-Sequencing-DNA-1977.pdf>
- McCook, S. (2006). Global rust belt: *Hemileia vastatrix* and the ecological integration of world coffee production since 1850. *Journal of Global History*, 1(02), 177-195. doi: 10.1017/S174002280600012X
- McCook, S. (2009). La Roya del café en Costa Rica: Epidemias, innovación y medio ambiente, 1950-1995. *Revista de Historia*, 59-60. Obtenido de <https://www.revistas.una.ac.cr/index.php/historia/article/view/3471>
- Méndez López, I., Castillo Ponce, G., & Holguin Melendez, F. (1985). Desarrollo y comportamiento de la roya del cafeto en la region costa de Chiapas, Mexico. (*Memoria. taller regional del PROMECAFE sobre epidemiologia de la roya del cafeto*). Asociacion Nacional del Café, Guatemala C.A, Guatemala. Obtenido de https://books.google.com.mx/books?id=rtwOAQAIAAJ&pg=PA53&lpg=PA53&dq=Desarrollo+y+comportamiento+de+la+roya+del+cafeto+en+la+region+costa+de+Chiapas,+Mexico&source=bl&ots=tdE7Zc9Uw1&sig=ACfU3U03qMgOaVlo9i-_nijDNwtnMAJhdQ&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjBylv22snIA
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*(11), 31-46. Obtenido de <https://www.nature.com/articles/nrg2626>
- Miguel, B. M. (2013). Recomendaciones para el comabate de la roya del cafeto.
- Miller, L. (1997). *Introduction to the Baculoviruses*. Obtenido de https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4899-1834-5_1
- Moayeri, M., Leppla, S. H., Vrentas , C., Pomerantser , A. P., & Liu , S. (2015). Anthax pathogenesis. *Rev Microbiol*, 69, 185-208. doi:10.1146/annurev-micro-091014-104523
- Morris, W. E., & Fernández Miyakawa, M. E. (2009). Toxinas de *Clostridium perfringens*. *Microbiología*, 41(4), 251-260.
- Neelabh, & Karuna Singh. (2018). ABC and MFS Transporters: A reason for Antifungal drug resistance. *Archives of Biotechnology and Biomedicine*, 2, 001-007. Obtenido de <https://www.heighpubs.org/hjb/pdf/abb-aid1009.pdf>
- Nemri , A., Saunders , D. G., Anderson , C., Upadhyaya , N. M., & Lawrence, G. J. (2014). La secuencia del genoma y el complemento efector del agente patógeno del óxido de lino *Melampsora lini*. *Plant Sci*.

- Nutman, F. J., F.M, R., & Bock, k. r. (1960). Methods of uredospore dispersal of the coffee leaf rust fungus, *Hemileia vastatrix*. *Transactions of the British Mycological Society.*, 43(3), 509-515. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007153660800332>
- OIC. (2019). *International Coffee Organization*. Recuperado el 19 de mayo de 2019, de Historia del café: http://www.ico.org/ES/coffee_storyc.asp
- OIC. (s.f.). *International Coffee Organization*. Recuperado el 19 de Mayo de 2019, de Historia del café: http://www.ico.org/ES/coffee_storyc.asp
- Orozco Miranda, E. F. (2015). *Roya del Cafeto, manejo integrado y perspectivas de la caficultura en Guatemala. (Memorias del seminario científico internacional, manejo agroecológico de la roya del café)*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Panamá . Recuperado el 06 de Noviembre de 2019, de <http://www.fao.org/3/a-i5137s.pdf>
- Oseguera , S. H. (1991). Epidemiología de la roya del cafeto *Hemileia vastatrix* Berk en dos zonas cafetaleras de Honduras, C.A. Tegocilapa Hond; IICA. 59.
- Quispe-Apaza, C. S., Mancilla Samaniego, R. C., Lopez Bonilla , C. F., Espejo Joya, R., Villanueva Casada, J., & Monzon, C. (2017). Diversidad genética de *Hemileia vastatrix* de dos zonas productoras de café en el Perú. *fitopatol*, 35(3). Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092017000300418
- Rajendren, R. (1967). new type of nuclear life cycle in *Hemileia vastatrix*. *Mycologia*, 59(2), 279-. doi:10.2307/3756801
- Rivillas, O. C., Cristancho, A. M., & Gaitán, B. A. (2011). La Roya del cafeto en Colombia impacto, manejo y costos de control , resultados de investigación. *Cenicafe*, 35. Obtenido de <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/594/1/036.pdf>
- Rocha, R. L. (2017). *Characterization of LTR-Rettotransposons on Hemileia vastatrix genome*. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Recuperado el 01 de Noviembre de 2019, de <https://pdfs.semanticscholar.org/1c8c/86baa7ee0afd97f5ffe70ed323d91906e901.pdf>
- Roche . (2015). *Diagnostics Corporation*. Obtenido de <<http://454.com/products/gs-flx-system/>>
- Rodriguez Guzmán , M. P. (2001). Biodiversidad de los hongos fitopatógenos de suelos en México. *Acta Zool. Mex*(1), 53-78. Obtenido de <http://www.acuedi.org/ddata/2222.pdf>

- Rodríguez-Tovar, A., Xoconostle-Cásarez, B., & Valdés, M. (2004). ECOLOGÍA MOLECULAR DE LOS HONGOS ECTOMICORRÍZICOS. *Rev. Fitotec. Mex.*, 27(3), 267-278. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61027307>
- Sanger, F., & Coulson, R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, 94, 441-448. doi:10.1016/0022-2836(75)90213-2
- Santacreo, R., Reyes, E., & Osegueda, S. (1983). Estudio del desarrollo de la roya del cafeto *Hemileia vastatrix* Berk & Br. Y su relación con factores biológicos y climáticos en condiciones de campo en dos zonas cafetaleras de Honduras, C.A. *Simposio Latinoamericano sobre Caficultura, Panamá, Panamá, 24-25 noviembre, 1993. Costa Rica, IICA.*, 199 - 213. Obtenido de <http://repiica.iica.int/docs/b3981e/b3981e.pdf>
- Sciences, A. N. (1980). *Desarrollo y Control de las Enfermedades de las Plantas*. Mexico: Limusa.
- SENASICA. (2013). *Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria*. Obtenido de Manual técnico para el manejo preventivo de la roya del café: http://www.royacafe.lanref.org.mx/Documentos/GS_DS_Manualroyadelcafe.pdf
- SIAP. (2019). *Avance de Siembras y Cosechas. Resumen por cultivo*. Obtenido de http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenDelegacion.do
- White, J. T., Bruns, S. L., & J. W. Taylor. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Academic Press, Inc*, 315-322. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/223397588_White_T_J_T_D_Bruns_S_B_Lee_and_J_W_Taylor_Amplification_and_direct_sequencing_of_fungal_ribosomal_RNA_Genes_for_phylogenetics
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). Un algoritmo codicioso para alinear secuencias de ADN. *J Comput Biol* 2000, 7((1-2)), 203-14.