

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**“Prospección, Incidencia e Identificación de la roya del café
(*Hemileia vastratrix* Berk. & Broome) Kimbiri-La Convención-
Cusco – 2019”**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGRONOMO**

PRESENTADO POR:

Michel Robinson Curiñaupa Quispe

Ayacucho – Perú

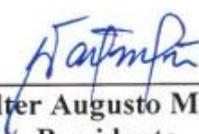
2022

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMIA

TESIS

“Prospección, Incidencia e Identificación de la roya del café (*Hemileia vastratrix* Berk. & Broome) Kimbiri - La Convención - Cusco – 2019”

Expedito : 25 de mayo del 2022.
Sustentado : 03 de junio del 2022
Calificación : muy bueno
Jurados :


M.Sc. Walter Augusto Mateu Mateo
Presidente


M.Sc. Alejandro Camasca Vargas
Miembro


M.Sc. Angela Requis Quintanilla
Miembro


Ing. Guillermo Carrasco Aquino
Asesor

A Dios, por darme la vida y permitirme haber llegado a esta etapa tan importante de mi formación profesional.

A mis padres Sr. Tiberio Curiñaupa Álvaro y Sra. Elena Quispe Vicente por estar siempre ahí cuando los he necesitado con ese amor y apoyo incondicional.

A mis hermanos Alina, George y Hideo; por creer, sentirse orgullosos, y confiar en mí.

A mis amigos y compañeros, con mucho cariño para ustedes por sus consejos y apoyo moral para tener éxito en la vida.

AGRADECIMIENTO

A La Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, alma mater de mi formación profesional, a todos los docentes quienes fueron parte de mi formación académica y profesional.

Con gratitud a mi asesor el Ing. Carrasco Aquino, Guillermo, por ser un gran docente y por su apoyo en la realización y culminación del presente trabajo.

A los pequeños caficultores del Distrito de Kimbiri, por facilitarme el material biológico para poder realizar mi investigación.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA

¡Error! Marcador no definido.

AGRADECIMIENTO	ii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO I	4
MARCO TEÓRICO	4
1.1. Cultivo de café (Coffea arábica L.)	4
1.1.1. Centro de origen y distribución.	5
1.1.2. Clasificación taxonómica	5
1.1.3. Variabilidad genética	6
1.1.4. Descripción botánica	6
1.1.5. Condiciones climáticas	9
1.1.6. Variedades más importantes	10
1.1.7. Fenología y propagación	12
1.1.8. Plagas y enfermedades del café	15
1.2. Generalidades de la roya del café	16
1.2.1. La roya del café	16
1.2.2. Origen y distribución de la enfermedad	18
1.2.3. Clasificación taxonómica del agente causal de la roya	18
1.2.4. Razas	19
1.2.5. Ciclo Biológico de Hemileia vastratrix	20
1.2.6. Sintomatología de la enfermedad	20
1.2.7. Epidemiología de la roya del cafeto	21
1.3. Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	22
1.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
1.3.2. Organización del ADN nuclear ribosomal (ADNr)	22

1.3.3. Utilidad de las regiones del ADNr.	23
1.3.4. Gen β -tubulina	23
CAPÍTULO II	
METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN	25
2.1. Características del área de estudio	25
2.1.1. Ubicación:	25
2.1.2. Topografía	26
2.1.3. Clima	26
2.2. Materiales, equipos	27
2.2.1. Materiales	27
2.2.2. Equipos	27
2.3. Instalación y conducción del experimento	27
2.3.1. Fase I: Trabajo de campo	27
2.3.2. Fase II: trabajos de laboratorio	33
CAPÍTULO III	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
3.1. Incidencia y sintomatología café en distrito de Kimbiri	37
3.1.1. Incidencia de plantas con lesiones amarillas	37
3.2. Caracterización de la estructura del patógeno del café en Kimbiri	40
3.2.1. Observaciones macroscópico de las lesiones amarillas del café	40
3.2.2. Observación microscópica de las lesiones amarillas	43
3.2.3. Análisis de la Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	46
CAPITULO IV	49
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	49
4.1. Conclusiones	49
4.2. Recomendaciones	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	62

INDICE DE TABLAS

Tabla 01. Zonas de evaluación de incidencia de la roya del café.	28
Tabla 02. Número de parcelas y plantas para evaluar el porcentaje de incidencia de lesiones amarillas en cafetos en el distrito de Kimbiri.	32
Tabla 03. Comparación de plantas con lesiones amarillas en cuatro pisos altitudinales en el Distrito de Kimbiri.	38
Tabla 04. Determinación de factor de calibración de un microscopio.	44
Tabla 05. Determinación del factor de calibración según a microscopio óptico del laboratorio de laboratorio de Fitopatología	44
Tabla 06. Medición del Tamaño de ancho de la urediniosporas del patógeno.	44
Tabla 07. Medición del Tamaño de altura de la urediniosporas del patógeno .	44
Tabla 08. Resultados de ID molecular de la muestra A/H.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01. Mapa de ubicación del Distrito de Kimbiri.	26
Figura 02. Mapa satelital del Distrito de Kimbiri y las zonas evaluadas (Google Earth).	29
Figura 03. Recolección de muestras de hojas con lesiones amarillas en el café.	30
Figura 04. Evaluación de síntomas de lesiones amarillas de las hojas del cafeto en el campo	31
Figura 05. Croquis de muestreo de las parcelas evaluadas para incidencia de las plantas con lesiones amarillas del café	32
Figura 06. Evaluación de plantas de café con o sin lesiones amarillas.	33
Figura 07. Evaluación macroscópica de las lesiones amarillentas con el estereoscopio.	34
Figura 08. Evaluación microscópica de las lesiones amarillentas del café en el laboratorio de fitopatología de la UNSCH.	35
Figura 09. Porcentaje de incidencia de plantas con lesiones amarillas en café en el distrito de Kimbiri.	37
Figura 10. Curva de progreso de la roya del café en tres pisos altitudinales	39
Figura 11. Variación de la roya del café en tres pisos altitudinales	40
Figura 12. Evaluación de síntomas de roya en el envés de hoja en el laboratorio.	41
Figura 13. Evaluación de síntomas de roya en el haz de la hoja en el laboratorio.	41
Figura 14. Esporas de la roya <i>Hemileia vastatrix</i> en café en el envés de la hoja.	42
Figura 15. Comparación en el haz de la hoja con roya macroscópicamente.	42
Figura 16. Esporas de Urediniosporas de la roya (<i>Hemileia vastatrix</i>) del café.	45
Figura 17. Medición de las estructuras de Urediniosporas a lo ancho.	45

Figura 18. Medición de las estructuras de Urediniosporas a lo largo.	45
--	----

INDICE DE ANEXOS

Anexo 01. Mapa del Distrito de Kimbiri y localización de las comunidades evaluadas.	63
---	----

Anexo 02. Panel fotografico	64
-----------------------------	----

Anexo 03. Resultado de la PCR realizado en el laboratorio de Biología Molecular de Fitopatología - UNALM	70
---	----

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el departamento de Cusco, provincia La Convención, distrito de Kimbiri, en las localidades de Villa El Salvador, Kimbiri Alto, Capirushiato y Maserine y el laboratorio de Fitopatología de la facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, en el cual se tiene como objetivos, reconocer y caracterizar los agentes que ocasionan la defoliación de plantas cafeteras. La identificación del patógeno se realizó mediante la Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Como resultado El porcentaje de plantas de café con síntomas de lesiones amarilla diagnosticada en las hojas fueron de, 36% en Villa El salvador, 58% en Kimbiri Alto, 18% en Capirushiato y 10% Maserine, El mayor porcentaje de Incidencia de las lesiones amarillas del café se observó en las zonas de menor altitud y mayor altitud menor incidencia, La observación macroscópica y microscópica muestra tener características de la roya del café (*Hemileia* sp) y la identificación molecular del hongo de la roya del café, cuyo resultado indicó que la muestra evaluada es 100% idéntica a la especie del hongo de roya del café (*Hemileia vastratrix*).

Palabras clave: *Reacción en cadena polimerasa, defoliación, macroscópica, microscópica.*

INTRODUCCIÓN

El café es uno de los productos agrícolas principales de exportación en el Perú, contribuye con el 25% de las divisas agraria, genera al año más de 50 millones de jornales en la productividad y comercialización de este producto. Fuera de la importancia económica, la producción de café es trascendentalmente social y ambiental para nuestro Perú.

Junta Nacional del Café (2014) señala que, el café peruano proviene de variedades 95% Arábica las cuales se caracterizan por una alta calidad de tueste, pero son altamente susceptibles a la roya amarilla causada por el hongo biotrófico *Hemileia vastratrix* Berk. & Bloom.

Esta enfermedad es considerada una de las principales amenazas para el desarrollo de este cultivo a nivel mundial, provocando severas defoliaciones e importantes pérdidas productivas (Silva, 2000). H. primer informe *Vastratrix* Perú se realizó en la región Junín en 1979 (Scheiber y Zentmyer, 1984), pero su mayor incidencia se presentó en 2013, provocando una pérdida de producción del 27% (INEI, 2014).

Las prospecciones que fueron efectuados por diferentes centros de investigación informaron que uno de las importantes enfermedades del café es las severas defoliaciones de las plantas.

Por lo tanto, en el presente trabajo de investigación se pretende evidenciar al agente causal de las severas defoliaciones en el café en las zonas de Villa el Salvador, Kimbiri Alto, Capirushiato y Maserine – Kimbiri, con la finalidad de tener evidencia científica que el agente causal de la defoliación de la planta qué es la roya *Hemileia vastratrix* y así poder determinar el nivel de incidencia de este agente causal en las diversas zonas. Asimismo, la roya no puede eliminarse y su control es muy difícil, por ello el propósito del trabajo es analizar las urediniosporas de la roya y lograr su caracterización macroscópica, microscópica y molecular esto generará conocimiento sobre el estudio de la etiología y características del patógeno que ocasiona este daño; se da con el fin de poder determinar la sintomatología presente en la planta que ayude a identificar la enfermedad.

Por los cuales se decidió realizar el presente trabajo de investigación con los siguientes objetivos:

Objetivo general

Reconocer y caracterizar al agente causal de la defoliación de plantas de café en el distrito de Kimbiri.

Objetivos específicos

- 1.- Reconocer y caracterizar al agente causal de la defoliación de plantas de café en el Distrito de Kimbiri.
- 2.- Determinar la etiología del agente causal de la defoliación de plantas de café en el Distrito de Kimbiri.
- 3.- Identificar la especie del agente causal de la defoliación de plantas de café en el Distrito de Kimbiri mediante pruebas moleculares (PCR).

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Cultivo de café (*Coffea arábica* L.)

El cultivo del café es uno de los más importantes en la actividad agrícola legal en los valles amazónicos del país (la mayor producción se encuentra en los departamentos de Amazonas, San Martín y Cajamarca), donde el café se posiciona como el principal cultivo alternativo al árbol, principalmente para uso doméstico. El proceso de elaboración del café se realiza en condiciones agroecológicas ideales. Estas plantaciones están ubicadas en las montañas tropicales de los Andes, a una altura de 600 a 2700 metros sobre el nivel del mar.

Importancia económica

- El café peruano es una de las exportaciones agrícolas más importantes y representa aproximadamente el 30 por ciento de los ingresos de divisas del sector agrícola. El 95% del café que se produce en el país se vende en mercados extranjeros (Márquez, 2014).
- El café se cultiva en la selva de los altos valles de los Andes, donde domina la variedad Arábica (70% Typica, 20% Caturra y 10% otras variedades como Borbón y Pache). El 90% de los cafetos se cultivan a la sombra, el 75% de los cultivos se concentra por encima de los 1200 msnm, con un rendimiento promedio de 14 qq/ha (Márquez, 2014).
- Su producción genera 43 millones en salarios directos al año, además de 5 millones en salarios provenientes del comercio, la industria y los servicios de transporte que intervienen en la cadena productiva del café. (JNC, 2013)
- Las exportaciones de café alcanzaron un nivel récord en 2011: USD 1500 millones. Sin embargo, hubo una disminución en 2012 por el impacto de la roya (*Hemileia vastratix*), que continuó hasta 2014; sin embargo, en 2015 se lograron avances positivos, aunque tímidos. Según Gino Bartra, director general de Operaciones Agropecuarias del

MINAGRI, la producción de café aumentará del 5% al 10% y alcanzará las 226.000 toneladas anuales. (El Comercio, 2015).

1.1.1. Centro de origen y distribución.

La palabra café, derivada del árabe “kahwah” (cauá), nos llegó a través del vocablo turco “kahwah” (cavé), que tiene diferentes significados según el idioma, pero conserva su raíz (Duran, 2011). El café se origina en Etiopía en el este de África, precisamente en el área llamada “Kaffa”, de donde el café toma su nombre.

El café es originario de África tropical. A menudo se citan países como Mozambique, Sudán, Etiopía, Guinea o Kenia como centros de origen, Etiopía es el más aceptado. (Arvy, 2007).

En Java se inició a cultivarse en el año 1690 (Indonesia), y desde entonces su cultivo comenzó a extenderse rápidamente por América, llegando más tarde a la India y Sri Lanka. (Small, 2009; Arvy, 2007).

Lashermes (1999) señalan El origen de *Coffea arabica* se da través de la formación de dos especies diploides estrechamente relacionadas (*C. eugenioides* y *C. canephora*). La baja variabilidad se refleja en la susceptibilidad a la mayoría de las enfermedades.

Según la JNC (2014), “Fuentes históricas documentan un cafetal en 1760 desde la ciudad de Guayaquil hasta “Lima” cuando esta era parte del Virreinato del Perú, pero se entendió que en Huánuco existían algunas plantas, no existe lugar de procedencia, fecha exacta, y no se sabe quién lo plantó por primera vez. Hallazgos recientes muestran que el Dpto. de Chinchao de la Prov. de Huánuco fue donde se inició el cultivo del café entre los años 1740 y 1760.

1.1.2. Clasificación taxonómica

El café es un arbusto perteneciente a la familia Rubiaceae del género *Coffea* (Temis-Pérez, 2011).

Davis (2006) menciona que, existen 126 cepas y que dos especies son económica y comercialmente importantes en el mundo: *Coffea canephora* P y *Coffea arabica* L., que representan aproximadamente el 90 de café en el mundo (Berthaud y Charrier, 1998; Herrera, 2002; Fernández, 2010).

Clasificación taxonómica de los cafetos, según Cronquist (1991) es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dilleniidae

Orden: Gentianales

Familia: Rubiácea

Género: *Coffea*

Especie: *Coffea arábica* L.

Nombres Comunes: “cafeto”, “café”

1.1.3. Variabilidad genética

El género *Coffea* cuenta con aproximadamente 100 diferentes especies (Charrier y Berthaud 1985; Anthony 1999; Davis 2006). Sin embargo, de estas especies, solo dos son económicamente importantes a nivel global: *Coffea arabica*, quien representa alrededor del 63 %, mientras que *C. canephora*, (café robusta) representa el 37 % de la producción el 2009/2010. rendimientos anuales (SCAA 2011). Según el número de cromosomas, *Coffea arabica* pertenece al grupo tetraploide ($2n=4x=44$ cromosomas), lo que sugiere que su origen podría ser un cruce natural entre *Coffea arabica* y *Coffea canephora* y *C. eugenoides* (Lashermes, 1999). *C. canephora* y otras especies como *C. racemosa*, *C. stenophyla* y *C. liberica*, pertenece al grupo diploide ($2n=22$ cromosomas) (Regalado 2006), son autoincompatibles, por lo que crean poblaciones con mayor diversidad.

1.1.4. Descripción botánica

a. Raíces o sistema radicular

Los cafetos tienen varios tipos de raíces: rotativas, axiales o arriostantes, laterales y finas. La raíz primaria se puede considerar una raíz céntrica, y la mayor longitud para una planta adulta es de 50-60 cm. Las raíces laterales y las raíces de soporte surgen de la raíz pivotante;

las raíces finas generalmente se desarrollan a partir de ramas laterales, una proporción significativa (80–90%) de las cuales se hallan en los primeros 30 cm del suelo dentro de los 2 a 2,5 m de la base del tronco. Las raíces finas son de gran importancia ya que son las que absorben nutrientes y agua del suelo (Alvarado y Rojas, 2007). Las raíces axiales son a menudo indistinguibles de las raíces laterales; el primero también puede tener muchas raíces alimentadoras a mayor profundidad. En las raíces viejas, el xilema secundario tiene la mayor masa, la corteza forma el floema secundario con tubos de malla y células adheridas, y las fibras pericíclicas aparecen en cordones aislados y les dan fuerza. También hay una capa de armadura que forma constantemente tejido nuevo para reemplazar el tejido exterior que se desprende. (León, 2000).

b. Tallo

Es leñosa, escarpada y varía según el tipo de suelo y el clima. El café en sus diferentes variedades de mayor comercialización varía la altura entre 2,0 a 5,0 m. En una planta mas longeva, desarrolla la parte inferior cilíndrica, mientras que la parte superior (ápice) es cuadrada y verde con esquinas redondeadas y salida. Muestra la especificidad de tres tipos de formación de brotes de diversas partes de la planta: tallos, hojas y bandoleras . (Alvarado y Rojas, 2007).

c. Ramas o bandolas

Conocidas también como ramas colaterales, son alternas, opuestas y producen ramas secundarias; a su vez, también puede producir palmillas o ramas terciarias. Los brotes laterales tienen punto de crecimiento apical donde se desarrollan gradualmente nuevas entrenudos y hojas. La cantidad varía de un año a otro, por lo que la formación de axilas foliares aumenta el número de flores y el número de frutos (Alvarado y Rojas, 2007).

El dimorfismo de la rama es evidente en todas las especies de Coffea. Los ejes verticales u ortotrópicos tienen brotes vegetativos en nudos, de los cuales se forman brotes laterales, que rara vez desarrollan inflorescencias. Por otro lado, los ejes horizontales u oblicuos llevan botones florales en las axilas de las hojas. (León, 2000).

d. Hojas

Surgen en ramas oblicuas en el mismo plano y en posiciones opuestas, rodeadas de pecíolos puntiagudos. Las hojas miden de 12 a 24 cm de largo y de 5 a 12 cm de ancho y varían en forma de ovaladas a lanceoladas (León, 2000).

En la parte inferior, en los cuernos formados por la nervadura central y los costados, existen orificios de forma irregular que conducen a pequeñas cavidades llamadas "domacias", cuya función es incierta; sin embargo, suelen albergar ácaros muy pequeños (Alvarado y Rojas, 2007).

Los domatia superiores son pequeños brotes redondos en los que perforan las venas laterales. Suelen tener pelos finos y forman los pliegues internos de la cutícula (León, 2000). El tamaño de la hoja varía no solo según la especie y el cultivo, sino también según las condiciones de sombra o exposición de luz del sol.

e. Flores

De la axila de la hoja surgen botones florales de 1 a 3 pétalos, divididos en 2 ó 6 ramas cortas de 2 a 4 mm de largo, cada una coronada con una flor compuesta por cáliz, pétalos, estambres y semillas. Cáliz atrofiado, en la base de la flor. La corola es larga, tubular con base cilíndrica y termina en cinco pétalos, de 6 a 12 mm de diámetro.

Los cogollos son verdes cuando no están abiertos y blancos cuando están abiertos. 5 estambres, insertos en el tubo de la corola, alternados con pétalos. Son filiformes y soportan largos estambres que se abren longitudinalmente en la madurez para liberar el tallo. La flor tiene un ovario superior con dos óvulos formando un pistilo.

Las flores de café duran pocos días. Muchos factores contribuyen a este fenómeno: el desarrollo de las yemas en las cabezas de flores es causado por días cortos, en ausencia de lluvia, las yemas permanecen latentes, pero si la planta recibe humedad, las yemas se desarrollan rápidamente. El número de floraciones varía con la cantidad de lluvia en un área determinada (León, 2000).

Cuando las flores que abren primero son las que están más cerca de las ramas (León, 2000), los estambres ya han liberado gran cantidad de polen, por lo que existe un alto grado de autopolinización. Una vez que el polen llega al óvulo, la fertilización ocurrirá dentro de cuatro a seis días. (Alvarado y Rojas, 2007).

f. Fruto

El ovulo fertilizado permanece inactivo durante cuatro semanas, después de lo cual comienza a crecer rápidamente, de modo que el fruto alcanza su tamaño máximo entre 80 y 100

días después de la fertilización. Luego de la fecundación, el ovario se convierte en fruto y sus óvulos se convierten en semillas. El fruto maduro es una drupa ovalada y ligeramente aplanada, con tres ejes principales de 12–18 mm de largo, 8–14 mm de ancho y 7–10 mm de espesor. En la parte superior se encuentra un disco con una depresión central que corresponde a la base del estilo (León, 2000). Los frutos son lisos, brillantes, de carne fina. Consta de tres partes diferenciadas: exocarpo o epidermis, mesocarpo o pulpa y endospermo o semilla. Dependiendo de la variedad, puede ser rojo o amarillo cuando está maduro (Alvarado y Rojas, 2007).

El pericarpo consta de tres partes con diferentes propiedades. Las dos capas externas, el exocarpo y el mesocarpo, se denominan comúnmente pulpa, mientras que la capa interna, el endocarpo, llamada pergamino, se separa a medida que madura y cubre la semilla. El exocarpo consta de una sola capa de células parenquimatosas con muchas estomas. El mesocarpo está formado por parénquima, el contenido en azúcares, taninos y colorantes son altos. Cuando madura, la capa que conecta el mesocarpo y el endocarpo se llena de mucílago y se rompe, separándolos, en otras palabras, "pulpa" no es lo mismo que "pergamino"(León, 2000).

1.1.5. Condiciones climáticas

Varese y Rojas (2012) detalla la condición agroecológica para desarrollo del cultivo de Café.

a. Temperatura

El rango de temperatura óptima es de 18 a 22 °C, la temperatura extrema es de 16 a 24 °C (la temperatura máxima diaria es de 32 °C y la mínima de 7 °C). Las altas temperaturas y temperaturas prolongadas durante el día pueden aumentar el contenido de azúcar del café. El café Highland Arabica se cultiva a temperaturas más bajas que el café Robusta y madura lentamente, lo que contribuye a la calidad de cata. Los cambios repentinos de temperatura, como las heladas, pueden hacer que los granos se congelen o se quemem hasta que las plantas se sequen. (Varese y Rojas, 2012).

b. Precipitación

Requieren entre 1.500 - 2.100 mm por año, distribuidos para satisfacer las necesidades de agua durante las fases de floración, llenado y cosecha. La lluvia después de un temporada seca, un descenso de la t° o una densa niebla al final de este temporada favorece a la formación

y desarrollo de las flores. Las lluvias excesivas durante la temporada de polinización pueden reducir significativamente la producción de frutos. La estación seca no debe sobrepasar los 3 a 4 meses y debe confluir con la cosecha. (Varese y Rojas, 2012).

c. Humedad Relativa.

La HR ideal para el cultivo del café se encuentra entre el 70% y el 95%, dependiendo de los cambios de t° y de las precipitaciones: días que no llueve, la humedad oscila entre el 40% y el 60%; y de noche oscila entre 90% - 100% (Varese y Rojas, 2012).

d. Luz y sombra.

El café necesita de 1600 a 2000 horas de luz solar al año. A mayor altitud, aumenta la cantidad de nubes, lo que conlleva menor calidad de luz. A altitudes más bajas menos nubes y más luz. La neblina y la nubosidad brindan un equilibrio entre las horas de luz y de sombra. Los árboles de sombra en las plantaciones de café protegen a los cafetos de la luz solar directa y del viento. (Varese y Rojas, 2012).

e. Altitud

La topografía y accidentes geográficos de la zona cafetalera son muy singulares, con pendientes que van desde el 30% hasta más del 80%, formando un accidentado paisaje montañoso de los 500 hasta 2.600 msnm. El café se cultiva a una altitud de 300 a 2400 metros sobre el nivel del mar. El mejor café se cultiva entre los 1.200 y 1.800 metros sobre el nivel del mar (zona de altura media), dependiendo de la región (tropical o subtropical). Cuanto mayor sea la altitud, menor será la temperatura y el brillo, y mejor será la calidad lograda. (Varese y Rojas, 2012).

f. Suelo

Se prefiere el suelo oscuro y oscuro de ceniza de volcán. en pH de 4,5 y 6,5, las raíces se desarrollarán con normalidad siempre que la estructura y textura sean las adecuadas. (Varese y Rojas, 2012).

1.1.6. Variedades más importantes

a. Catimor

Es cruce artificial de la raza Caturra y la raza híbrido Timor. El Timor le proporcione resistencia a la roya. Las características son similares a la variedad Limaní. de tronco grueso y

duro. Sus ramas laterales se forman a lo largo del tallo en entrenudos cortos, son más largas y abundantemente ramificadas. De hojas gruesas, anchas y de color verde oscuro, y las hojas jóvenes pueden ser de color verde bronce. Los frutos son de talla mediano y se vuelven rojos cuando maduran. Esta variedad tiene mayor resistencia a la roya del café y tiene una excelente calidad para beber. (Blas, 2011).

b. Caturra

Blas (2011), Señalan que se trata de razas cortas que pueden haber surgido como una mutación natural o dos en los bourbon rojos altos. El color amarillo puede haber surgido con una mutación de la Caturra roja. Tiene entrenudos muy cortos en las ramas y tallos, lo que la convierte en una gran productora. de hojas grandes, de bordes ondulados, amplias y redondas, anchas y de color verde oscuro. Las nuevas hojas son de color verde claro. arbusto de aspecto fuerte y compacto. Las ramas laterales forman un buen ángulo cerrado con el tronco. El pequeño tamaño de la planta permite una alta densidad de plantación, lo que se refleja en un importante aumento del rendimiento, mientras se adapta a plantaciones en pleno sol con abundante fertilización. La caturra precoz y productiva en comparación con la Typicas y Bourbon (Castañeda, 2000).

c. Typica

Es el café con más significativo cultural del mundo. Tiene una susceptibilidad muy alta a la oxidación y se adapta a condiciones frías. Plantas altas con copas de buena calidad y frutos grandes. La primera cosecha se da en el cuarto año y los requisitos nutricionales son moderados (WCR 2018). Es una planta con entrenudos distantes, hojas ovaladas y oblongas (Orozco 1986). Su producción es ineficiente, acentuada por sus hábitos bienales de producción, y tiene una posición especial en el mercado gracias a la excelente calidad de sus tazas (Anacafé 2014). En las zonas de cultivo de café tecnificado, esta variedad tiende a desaparecer debido a los bajos rendimientos y alta susceptibilidad a ciertas plagas (López 2006).

d. Bourbon

Originario de la isla de Bourbon ubicada al sur del África, tiene un buen crecimiento, los espacios son menos separados en las ramas laterales las ramas donde produce los frutos, en comparación con la variedad Typica..

Esta raza suele ser que la fruta, aún más temprana y más productiva. En general, es considerada la variedad que se adapta mejor a las áreas bajas que las variedades típicas y responde mejor cuando se cultiva a plena luz solar o a suelos moderadamente fértiles. (Blas, 2011).

e. Pache

Nativa de Guatemala. Una mutación de la raza típica. De porte baja (1,80m). Las ramas tienden a formar ángulos de 60 grados respecto al eje principal. De entrenudos cortos. Las hojas terminales de color marrón claro. alto rendimiento. Alta resistencia al viento y se adapta bien a suelos arcillosos. Es propensa a la roya. (Pavan, 1996).

1.1.7. Fenología y propagación

a. Fenología

los cafetos son plantas arbustivas perennes que pueden alcanzar los 20 metros de altura si se dejan crecer libremente. Los cafetos tienen una vida útil de entre 20 - 30 años, pero, su ciclo de vida está relacionado con las condiciones del clima y del suelo en el cual crece, a lo que condiciones adversas pueden aminorar su vida útil. Además, el tiempo que dura de cada fase fenológica depende de las condiciones del ambiente en las que se produce cada fase y de las especies utilizadas. (Alarcó, 2011)

Dependiendo de la zona difiere en el manejo del cultivo y de las condiciones edafoclimáticas, los estados fenológicos se puede categorizar en diferentes en grupos (Arcilla, 2007 citados por Alarcó, 2011).

- **Estado principal 0.** La Germinación y propagación vegetativa: puede durar aproximadamente 75 días en esta fase y se da después de la siembra, hasta su emergencia con el primer par de cotiledones.
- **Estado principal 1.** Formación de las hojas: comienza cuando el primer par de cotiledones se expande por completo hasta formarse 9 pares de hojas. Al final de este proceso, se puede hacer un último trasplante de suelo. El tiempo después del trasplante y antes de la floración no está completamente determinado, ya que las condiciones climáticas y del suelo, así como los métodos de cultivo, determinarán la tasa de desarrollo..

- **Estado principal 2.** Ramificación: Una vez que se alcanza esta condición, el cafeto se ha establecido en el suelo final. En esta etapa, el cafeto crece desde las primeras ramas visibles hasta las 90.
- **Estado principal 3.** Elongación de las ramas: Durante este período se forman nudos en las ramas: el rendimiento del cafeto depende de la calidad de los nudos de las ramas laterales producidos el año anterior, ya que son el origen de las inflorescencias.
- **Estado principal 4.** Desarrollo de la inflorescencia: Esta etapa va desde la observación de las yemas de la inflorescencia hasta la observación de flores con pétalos alargados pero aún cerrados.
- **Estado principal 5.** Floración: cuando comienza la etapa de floral, hasta cuando el 50% de emergencia de las flores.
- **Estado principal 6.** Desarrollo del fruto y de la semilla: La emergencia de la fruta comienza con frutos insignificantes, que luego comienzan a aumentar de tamaño, pero no de peso, con granos casi completamente desarrollados a partir de la semana 16 después de la floración.

b. Propagación

b.1. Propagación por semilla

La madurez fisiológica se da entre 200 y 220 días luego del anthesis (Franco y Alvarega, 1981, citado por Arcila 2007). El ovulo fecundado y maduro pierde su latencia, debido a que las semillas húmedas llegan a un porcentaje de germinación del 90% además tiene características específicas que afectan la germinación, tales como: presencia de un endocarpio (pergamino) y el hecho de que el embrión está casi en la superficie de la semilla. (Arcila, 2007).

La reproducción sexual tiene ventajas y son: mayor diversidad de plantas alogénicas, rápida propagación de material autosustentable e introducción de rasgos deseables (Echeverría, 2011).

A condiciones de campo, Los brotes de las semillas de cafeto está influenciados por condiciones de cosecha y postcosecha, así también como por factores ambientales (Arcila, 2007).

Según Castillo (1970) citado por Arcila (2007), es conveniente utilizar semillas de mayor tamaño para fines de propagación ya que, si bien la proporción del café no afecta la germinación, este puede afectar el buen desarrollo de formación de la planta. La fisionomía de la semilla, como caracol o triangular, no afectó la germinación. La propagación por semilla puede preservar las características de esta especie endogámica.

b.2. Propagación por injerto

El injerto es un método de propagación vegetativa que fusiona dos partes de plantas de diferentes individuos (Kumar, 2011). La parte superior se denomina punta o scion, y la parte inferior, scion o scion (Hartmann y Kesler, 1976). Esta técnica proporciona a los agricultores varias ventajas comerciales derivadas de una buena selección de espigas y portainjertos. Por ejemplo, la elección correcta del portainjerto puede proporcionar una mejor adaptación a suelo y clima adversos para la planta, proporciona calidad de frutos y temporadas de producción más uniformes, plantas más pequeñas y una cosecha más rápida que las plantas no injertadas, así como resistencia a enfermedades fúngicas, enfermedades por nematodos o Tolerancia. (Villachica y Enciso, 1993).

La injertación de café para reducir las enfermedades por nematodos es una práctica generalizada en América Latina. En Guatemala, los injertos hipodérmicos se han utilizado durante más de 30 años. Debido al severo ataque de nematodos de las raíces en Brasil, Da Costa (1991) observó rendimientos de Robusta de tres a cuatro veces mayores en plantas inoculadas en comparación con plantas no inoculadas (Bertrand y Etienne, 2001). Haarer (1984), citado por Duitzela (2003), menciona que debido a la buena compatibilidad de patrón e injerto, el cafeto crecerá sano y dará buenos rendimientos como si tuviera sus propias raíces y mayor potencial de productividad. Se pueden obtener portainjertos resistentes a los nematodos y portainjertos de alto rendimiento mediante injertos de hipocotilo, lo que da como resultado sistemas de raíces fuertes y plantas de alto rendimiento (Duitzela, 2003).

1.1.8. Plagas y enfermedades del café

- **La roya del café (*Hemileia vastratrix* Berk & Broome)**

La roya del cafeto (*Hemileia vastratrix* Berk. & Broome) Está clasificada como una de las siete plagas de plantas más importantes de los últimos 100 años (Agrios, 1997) y la enfermedad de cultivos más devastadora y económicamente importante a nivel mundial, causando del 10% al 40% de la pérdida de producción (Silva, 2006).

- **Ojo de gallo (*Mycena citricolor*)**

El hongo *Mycena citricolor* (ojo de gallo) fue descubierto por Michelsen (Ernst, 1880) en Colombia en 1880. Cook lo clasificó más tarde como *Stilbum flavidum*. Maublanc y Rangel describieron a *Omphalia flavida* como un pequeño hongo amarillo pálido con forma de paraguas en 1914 y lo clasificaron como un basidiomiceto (*Omphalia flavida*) (Wang y Avelino, 1999). Usando exámenes de laboratorio, Ashby (1925) demostró que *S. flavidum* (Cooke) y *O. flavida* (Maublanc y Rangel) son el mismo hongo. Muchos años después, se pudo demostrar que *Agaricus* era el mismo hongo y que también pertenecía al género micénico, y sugirió el nombre *Lemony Mycenae* con el que ahora se conoce.

Este hongo foliar provoca defoliación en cafetales y muchos otros hospedantes (Wang y Avelino, 1999). Se mencionó que las plantaciones con una incidencia inicial del 20% y que promueven el desarrollo de enfermedades pueden sufrir pérdidas de producción de hasta un 60% sin un manejo adecuado. (Barquero, 2011).

- **Mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*)**

Se desconoce la fecha de aparición de este patógeno en el Perú. Se observó por primera vez en Colombia en 1876, y en 1880 el investigador Ernst envió una muestra con esta patología, desde Venezuela a Cook, quien lo estudió por primera vez (Buhler, 1934). La enfermedad es causada por hongos del género *Deuteromyces*, cuya fase asexual pertenece a la especie *Cercospora cafe* y cuya fase sexual pertenece a *Micosphaerella coffeicola*. (Castaño, 1956). Las esporas de *C. coffeicola* requieren una temperatura de 20 °C a 30 °C, una humedad relativa superior al 80 % y una fina capa de agua para el desarrollo de la enfermedad y la germinación (Blandon y Ruiz, 2003). También se menciona que la exposición al sol, la humedad excesiva en el suelo y los suelos con fertilidad baja tienen un efecto benéfico sobre este patógeno (Lombardi, 2002).

El síntoma patológico puede causar la defoliación de hasta el noventa por ciento de las plantas de seis meses, reduciendo su vigorocidad e incluso provocando muerte de la planta. Por su parte, Fernández (1985) mencionó que el ataque a los cerezos puede reducir la calidad del café con pérdidas de rendimiento de hasta un 30%. (Guzmán y Rivillas, 2005)

- **Nematodos parásitos de plantas**

Los nematodos son micro-organismos similares a gusanos que se hallan en todos los hábitats de la Tierra y se consideran el grupo más común, con hasta 2000 individuos por persona. metros cuadrados de terreno (Rivera, 2007). Needham informó sobre los primeros nematodos parásitos de plantas en 1743 cuando los encontró en las agallas de trigo (cereales). Posteriormente, en 1850, se contemplaron otros nematodos agalladores y nematodos propiciadores de quistes (Agrios, 1997).

Otra característica importante de los nematodos parásitos de plantas es el estilete en la parte delantera del cuerpo, que puede extenderse hacia afuera. Además de ser huecos como una aguja hipodérmica, los nematodos pueden entrar en las raíces para perforar las células de las plantas y extraer sus nutrientes (Rivera, 2007).

Se estima que los nematodos fitoparásitos causan casi el 11 % de las pérdidas de rendimiento en la producción agrícola mundial cada año, con pérdidas económicas anuales estimadas en aproximadamente US\$80 000 millones en términos absolutos (Andrés, 2003). En el café, las pérdidas de producción del nematodo de la remolacha oscilan entre el 10% y el 24% por operación (Sasser, 1970). Se han reportado efectos de varias especies en el cultivo del café, incluyendo: *Pratylenchus coffeae*, *P. brachyurus*, *P. loosi*, *P. pratensis*, *Meloidogyne acrita*, *M. africana*, *M. coffeicola*, *M. lille*, *M. incógnita*, *M. decalineata*, *M. hapla*, *M. javanica*, *M. konaensis*, *M. paranaensis*, *M. megadora*, *Radopholus arabocoffeae*, *R. similis*, *Helicotylenchus dihystera*, *H. erythrinae* y *H. pseudorobustus* (Dias 和 Crozzoli, 1995).

1.2. Generalidades de la roya del café

1.2.1. La roya del café

Siendo considerada una de las siete enfermedades más peligrosas que afectan a las plantaciones de la zona tropical a nivel mundial, la roya es sin duda la enfermedad del café más devastadora. El daño es paulatino, localizado en las hojas, y si no se toman las medidas de

control adecuadas, el rendimiento de la plantación se verá reducido significativamente en pocos años. La regulación química de las patologías de las plantas juega un papel importante en la reducción de pérdidas de los cultivos y ayudando a mantener la calidad y cantidad de los alimentos en producción. (Subero, 2005).

Es producido por el hongo *Hemileia vastratrix*, que forma esporas en los tallos de las flores utilizando haces de estomas fusionados. El hongo es un parásito obligado, por lo que solo puede vivir en el tejido vegetal. Cada mancha o lesión puede contener alrededor de 150.000 esporas y, por lo tanto, se considera una excelente fuente de inóculo. Las condiciones favorables como la humedad, la temperatura, las precipitaciones y la susceptibilidad de las plantas son factores importantes en el desarrollo de epidemias de enfermedades.. (Rivillass, 2011).

Importancia de la roya

La aparición de la roya del café, que ha tenido un impacto histórico en el mundo, es considerada una de las cinco enfermedades vegetales más importantes. La destrucción de las plantaciones de café obligó a los principales países productores del Este a abandonar el cultivo, lo que permitió a Estados Unidos (Colombia, Brasil y otros) desarrollar la supremacía manufacturera que disfruta hasta el día de hoy. Sin embargo, este dominio está amenazado por la roya, ya que, según Wellman, todas las variedades de café comercial en las Américas son susceptibles a la raza II de *H. vastratrix*. En Perú, fue inaugurado en febrero de 1979 en el Valle de Satipo-Chanchamayo. Fue descubierto en Tingo María en diciembre de ese año. Actualmente se está extendiendo por todas las regiones cafetaleras del país. (Castillo, 2013).

Un informe de Perú indicó que la plaga *hemileia vastratrix* afectó a más del 50% de la región cafetera peruana. Los lugares más afectados son las regiones de Puno, San Martín, Amazonas, Pasco, Junin, Cayamarca y VRAEM. A raíz de la plaga, el Consejo Nacional del Café (JNC) señaló que en 2012-2013 1.800.000 quintales de café, o alrededor de S/. 414 millones (basado en un precio de finca de S/.5/kg), no se cosecharon durante la campaña agrícola de 2018. Además, la caída de los precios internacionales del café significó una pérdida de s/. 975.000, monto que se estima se duplicó debido a la pérdida de cultivos. En general, las cifras de JNC muestran que la campaña perdió S/. 2.079 mil millones. (Tirabanti, 2014).

1.2.2. Origen y distribución de la enfermedad

La roya naranja en los cafetos se informó oficialmente a principios de 1869 en una cafetal de la isla asiática de Ceilán (ahora Sri Lanka). Este año, el micólogo británico Berkeley pudo describir y nombró al hongo que causaba la enfermedad: *Hemileia vastratrix*. La inesperada aparición de este patógeno y su rápida propagación en un área hasta ahora alejada del centro de origen y diversidad del café, África Oriental y central (Leppik, 1970 mencionado por Avelino, 2014).

En 1970 se descubrió esta terrible enfermedad en el estado de Bahía (Brasil), luego en 1978 en Bolivia y en 1979 en cafetales de la provincia de Satipo en la región Junín de Perú. (Scheiber, 1984).

Por ejemplo, la roya de los cultivos en Perú causó pérdidas significativas a los productores en 2012-2013. durante la temporada de crecimiento de 2018, que el Ministerio de Agricultura y Riego estimó en 250 millones de dólares estadounidenses. (Flores, 2014).

1.2.3. Clasificación taxonómica del agente causal de la roya

Hemileia vastratrix pertenece al género *Hemileia*, *Basidiomycota*, Uredinales, la principal forma de reproducción es la uredinospora, que es reniforme, en forma de herradura, con superficies superior y ventral lisas, dando el nombre del género, que significa mitad. (Aime, 2006; Fernández, 2009).

El género *Hemileia* pertenece a la familia Mikronegeriaceae, no a la familia Pucciniaceae previamente clasificada; esta clasificación basada en caracteres morfológicos fue confirmada por estudios moleculares. especie *H vastratrix* se ha incluido en solo unos pocos estudios filogenéticos del hongo conocido como roya (Avelino y Rivas, 2013).

El género *Hemileia* contiene alrededor de 42 especies, de las cuales solo dos afectan al café, *H. vastratrix* y *H. café*. Este último causa una enfermedad llamada roya del café en polvo y solo se encuentra en África. La roya causada por *H. vastratrix* se llama roya naranja para distinguirla del oídio. La forma reproductiva primaria de *H. vastratrix* es la uredinospora, que también produce teliosporas y basidiosporas.. (Talhinhas, 2017).

A continuación, se presenta la taxonomía del hongo de la roya

Phylum: *Basidiomycota*

Clase: *Pucciniomycetes*

Orden: Pucciniales

Familia: *Mikronegeriaceae*

Género: *Hemileia*

Especie: *vastratrix*

1.2.4. Razas

En America, en el año 1970 en Brasil apareció por primera vez la roya naranja. De 1970 a 1980 viajó a otros países de América y el Caribe. De los cuales se han registrado 45 razas de hongos, los cuales representan una seria amenaza. La raza II se identificó como la primera en saltar a las Américas, pero la raza XV apareció en 1972, la raza III apareció en Brasil en 1973 y la raza I en 1974, lo que complicó los problemas de control en Brasil. Inmediatamente se extendió a otros países, cada uno siguiendo su propia estrategia de gestión (Castillo, 2013).

Se estableció el Centro de Investigación de la Roya del Café (CIFC en portugués), el año de 1955, especializado en la investigación de la roya de café y la creación de especies resistentes. CIFC identificó más de cincuenta enfermedades por roya en 3500 muestras obtenidas de varios países productores de café (Barquero Miranda 2013, Várzea 2013). Las razas más diversas se encuentran en los países asiáticos (principalmente India), en EE. UU. prepondera la raza tipo II (Várzea 2013)

En el año 2000, en Brasil se reconocieron 15 razas fisiológicas de roya amarilla decafé: I, II, III, VII, X, XIII, XV, XVI, XVII, XXI, XXIII, XXIV, XXV, XXXI y XXXVII, pero la raza II es la que está más propagada (Zambolim, 2005; Cabral, 2009). En el 2007, Capucho (2012) Recolectaron 64 muestras de roya del café de diferentes regiones cafetaleras de Brasil y detectaron la presencia de roya amarilla del café especies I, II, III, XV, XXII y XXXIII; sin embargo, la raza II estuvo presente en el 68,7% de las muestras, mientras que las razas I, III, XV y XXII estuvieron presentes en 6, 4, 1 y 2 muestras, respectivamente. Un estudio de 1983 en Colombia reportó que la raza II fue la responsable de los efectos de la variedad Caturra. Crisancho (2007) estimó que debe haber más de 10 razas aún no identificadas en las variedades derivadas de los híbridos de Timor, que no pudieron ser identificadas por la falta de plantas diferenciadas, y también mencionaron la existencia de las razas XXII, XXV, XXIII, XVII y xxx. . Los estudios de seguimiento para determinar si había nuevas razas de enfermedades

después de una epidemia severa (más del 30% de pérdida de rendimiento) de 2008 a 2011 mostraron que la raza II y sus derivados estaban muy extendidos en el país (Castro, 2013; Christian Jo, 2007).

Los exámenes realizados con *H. vastratrix* permite demostrar que el hongo evoluciona y desarrolla variantes genéticas (razas). Las razas de hongo atacan de formas distintas a las diferentes especies y variedades del cafeto, depende de los genes de resistencia de las plantas y de los genes de virulentos del hongo (Cristancho 2011).

1.2.5. Ciclo Biológico de *Hemileia vastratrix*

El proceso de infección de la roya de café inicia con la aparición de los síntomas en el envés, donde se observa manchas pálidas que aumentan con el transcurrir del tiempo y se fusionan para formar sus características manchas amarillentas o anaranjadas, aparece un polvo fino de color amarillo que es donde se producen esporas fúngicas Localización (Rivillas, 2011)

La germinación de esporas requiere la presencia de agua libre durante al menos 6 horas, una temperatura de 21-25 °C y la oscuridad también son favorables para la germinación de esporas. Se necesitan de 5,3 a 8,5 horas para formar células adheridas. La germinación se inhibe cuando la luz y el agua se evaporan de las hojas, ya que esto afecta el crecimiento del tubo germinativo. Sin embargo, después de la germinación, el hongo ingresa a las hojas a través de aberturas naturales (estomas) ubicadas en el envés de las hojas maduras (Rivillas, 2011).

Una vez en la hoja, este hongo va formando haustorios, que en contacto con las células vegetales les succionan los nutrientes promoviendo su crecimiento. Después de 30 días de colonización, los hongos están lo suficientemente maduros para diferenciarse en esporas, que se encargaron de producir nuevas urediniosporas. El proceso desde la infección hasta la producción de esporas es llamado período de incubación. El período de incubación puede variar de 34 a 37 días al sol y de 31 a 35 días a la sombra (Rivillas, 2011).

1.2.6. Sintomatología de la enfermedad

Fernández, (2009) demostraron que las teliosporas y basidiosporas de la roya anaranjada son morfológica y genéticamente inestables, lo que sugiere que no tiene función alguna. Se pronostica que *Hemileia vastatrix* haya evolucionado ultimamente cuando el café Arábica salió de los bosques de su ecosistema nativo, pasando a un ecosistema seco con estaciones climáticas

más diferenciadas. El parénquima de teliosporas no está adaptado para estas condiciones. *Hemileia vastatrix* desarrolla y mantiene solo una unidad reproductiva, una uredinospora de paredes gruesas, que es adecuada para la transmisión, infección, supervivencia y reproducción sexual. Se observó que la uredinospora podía sufrir el proceso de meiosis, fue reexaminado recientemente. Este tipo de reproducción sexual se llama criptosexualidad. (Carvalho, 2011).

1.2.7. Epidemiología de la roya del café

Los principales factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad dependen de la relación entre el huésped (café), el patógeno (roya del café) y el medio ambiente. (Barquero, 2013).

a. Predisposición del hospedero al ataque de roya

La predisposición se entiende como la etapa de máxima percepción. En el caso de la roya del café, la susceptibilidad está asociada a la abundancia de hojas tiernas, lo que conduce a desequilibrios nutricionales y por ende a la susceptibilidad (Cochachi, 1993). Los factores del huésped incluyen la susceptibilidad del cultivo, la densidad de plantas (más proximidad de las plantas para facilitar el proceso de infección entre las hojas), el valor nutricional de la planta y la susceptibilidad de alto rendimiento (Barquero, 2013).

b. Patógeno

La roya, enfermedad que puede arrasar los cafetos, dependiendo del desarrollo de varios ciclos reproductivos. varios estudios han demostrado que el periodo desde la germinación de las esporas y la penetración en los tejidos internos de la hoja hasta la aparición de manchas con esporulación puede tardar entre 20 a 40 días. Cuanto más favorables sean las condiciones de temperatura y la resistencia al agua de las hojas, menos tiempo se tarda en completar el ciclo. (Barquero, 2013).

c. Factores del ambiente

El número de horas que la superficie del papel permanece húmeda; por lluvia, rocío o condensación; y una mayor duración de la temperatura en el rango de 18 a 28 °C; son los factores climáticos más influyentes para el rápido desarrollo de la enfermedad (Barquero, 2013).

1.3. Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

PCR son las siglas por las que se conoce a la reacción en cadena de la polimerasa (en inglés *Polymerase Chain Reaction*) Gracias a esta tecnología se ha llevado a cabo investigación genética en todos los campos de la ciencia. Por ejemplo, se utiliza en biología para identificar secuencias de genes en plantas, animales o, especialmente, en microorganismos.

lo importante de desarrollar métodos moleculares de identificación de hongos, usaron marcadores microsátélites (SSR) para especies que están relacionados con *H. vastatrix* debido a la continua evolución de nuevas especies, pero validaron 25 marcadores SSR, de los cuales solo 4 estaban disponibles para la identificación genética. (Cristancho y Escobar, 2008)

1.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnica molecular desarrollada por KaryMullis en 1986, se ha convertido en una parte esencial del diagnóstico molecular de hongos, permite establecer relacion filogenéticas y una clasificación taxonómica correcta (Sutton, 1998, citado en Park y Min, 2005; Baldiwn, 1995, citado en Fernández, 2010). El método se basa en la amplificación exponencial de una zona o secuencia de ADN específica de interés in vitro utilizando un par de cebadores (Kolmodin y Birch, 2002; Atkins y Clark, 2004). Llorens (1997) señaló que esta técnica requiere el conocimiento de la región diana del genoma fúngico para poder amplificarla. En los hongos y otras eucariotas, el ADN reside en los genomas nuclear y mitocondrial; pero la región más utilizada en hongos es la que codifica el ADN del núcleo ribosómico (Zuluaga, 2008).

1.3.2. Organización del ADN nuclear ribosomal (ADNr)

Las zonas de ADN utilizadas para determinar la taxonomía fúngica y las relaciones filogenéticas son genes de ADN nuclear ribosómico (ADNr) porque permiten la amplificación y la secuenciación directa (White et al., 1990) porque estas unidades de genes son repeticiones en tándem. Se encuentran en miles de copias individuales o múltiples. en genomas fúngicos (Cullings y Vogler, 1998).

La organización de unidades de rDNA incluye tres genes codificantes: el primero para la subunidad pequeña (SSU) basada en el gen 18S, el segundo para el gen 5.8S y el tercero para la subunidad grande 28S. (LSU) (Atkins y Clark, 2004). Las zonas de codificación 28S y 18S están separadas por dos tipos de espaciadores, el espaciador externo (ETS) y el

espaciador interno no transcrito (NTS); sin embargo, los espaciadores se conocen comúnmente como espaciadores intergénicos (IGS). El gen 5.8S está integrado entre dos espaciadores transcritos internos, ITS-1 e ITS-2 (Edel, 1998; Hwang y Kim, 1999).

1.3.3. Utilidad de las regiones del ADNr.

Hillis y Dixon (1991) indicaron que la secuencia génica del ADN ribosómico en los hongos es una región muy conservada dentro de una especie, pero a la vez varía mucho en los distintos grupos de hongos y Donaldson, 1995; Hwang y Kim, 1999; Wu , 2003). Pero, Hirata y Takamatsu (1996) señalaron que la secuencia de genes en la región 5.8 es muy pequeña, por lo que no es útil para estudiar relaciones filogenéticas de de un mismo género; esto último fue reiterado por Hwang y Kim (1999) quienes señalaron que, aunque muy conservada, la secuencia es de solo 180 pb, por lo que no contiene suficiente información filogenética.

Según Edel (1998), las secuencias de las regiones ITS e IGS son más variables porque han evolucionado más rápidamente que las regiones codificantes del rDNA porque están bajo una presión menos selectiva y no son letales para el organismo. (Hwang y Kim, 1999; Zuluaga, 2008). Por esta razón, se han convertido en herramientas populares en los estudios filogenéticos para identificar y clasificar poblaciones, permitiendo la identificación de especies estrechamente relacionadas, así como la variación dentro de una sola especie, como las cepas (White, 1990; Hirata y Takamatsu, 1996; Edel, 1998; Paul, 2002, citado en Park y Min, 2005). Dada la disponibilidad de estas regiones, se han desarrollado varios cebadores universales específicos para amplificarlos para su uso en pruebas de PCR incluso en presencia de contaminantes como raíces, parásitos o saprófitos (LLorens, 1997; Wu, 2003, 2004; Atkins y Clark, 2004). Atkins y Clark (2004) señalaron que, si bien la región del ADN del núcleo ribosómico y el espaciador interno transcrito han sido los principales objetivos de los estudios taxonómicos y filogenéticos en hongos, también se han estudiado ampliamente otros genes, como el gen de la β -tubulina.

1.3.4. Gen β -tubulina

Este gen codifica una de las dos familias conservadas de tubulinas que son fundamentales para los procesos de las células eucariotas porque son los componentes principales de los microtúbulos y, junto con otras proteínas, forman el motor de la investigación de los microtúbulos. El cual está implicado en la segregación cromosómica durante la mitosis

(Einax y Voigt, 2003). Brun (1991) indicó que el gen de la β -tubulina está más conservado y su disposición de secuencia es más precisa que la del ADN nuclear ribosomal; Thon y Royse (1999) citados en Villa (2006) también indicaron que resultó útil para reconstruir relaciones filogenéticas entre diferentes especies de hongos. Iturralde (2005) señaló que una vez amplificados los fragmentos de ADN, los nucleótidos que forman parte del organismo pueden secuenciarse en diferentes laboratorios y así compararse in silico en diferentes bases de datos de nucleótidos utilizando herramientas bioinformáticas. Las principales bases de datos de nucleótidos son: NCBI (Centro Nacional de Biotecnología), E.M.B.L (Laboratorio Europeo de Biología Molecular) y D.D.B.J (Base de datos de ADN de Japón), incluido el uso de programas informáticos como Fasta y Blast (Herramienta básica de búsqueda de alineación local), secuencias de ADN o proteínas las búsquedas se pueden encontrar y comparar con otras entradas en la base de datos, identificando así el organismo relevante (Abd-Elsalam, 2003; Moskwa, 2005).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

2.1. Características del área de estudio

2.1.1. Ubicación:

El trabajo de investigación del proyecto “Prospección, Incidencia e Identificación de la roya del café (*Hemileia sp.*) Kimbiri-La Convención-Cusco – 2019”, se realizó en dos etapas. En primera etapa se realizó en el distrito de Kimbiri, la segunda etapa se realizó en el laboratorio de Fitopatología EPA-FCA-UNSCH.

a. Ubicación política

Distrito : Kimbiri
Provincia : La Convención
Región : Cusco

b. Ubicación geográfica

Zona : 18L
Latitud : 73°50’30” norte
Longitud : 12°29’18” sur
Altitud : 540 - 3000 msnm

Figura 01.

Mapa de ubicación del Distrito de Kimbiri.



2.1.2. Topografía

La topografía del distrito de Kimbiri es accidentado, ya que corresponden al alineamiento estructural de los flancos oriental y occidental de los andes, denominado cordillera frontera; la depresión tectónica de los ríos Apurímac y Kimbiri.

2.1.3. Clima

De acuerdo con la información hidrometeorológica disponible de la zona, la cantidad de precipitación alcanza de 1800 a 2200 mm/año; de diciembre a abril son más intensos, alcanzando un rango de 500 a 700 mm mensuales, con valores mínimos de junio a agosto; Las precipitaciones están influenciadas por los vientos del este, noreste y sur que traen nubes húmedas de la llanura amazónica. La temperatura promedio es de 25 °C (octubre a febrero) y la temperatura mínima es de 19 °C (mayo a julio).

El clima corresponde al llamado clima tropical, por estar ubicado en la zona de selva alta, donde hay mucha precipitación, humedad y temperaturas muy altas.

2.2. Materiales, equipos

2.2.1. Materiales

- Cuchilla
- Papel toalla
- Caja de tecnopor
- Bolas de plástico
- Cinta masking
- Tápers de plástico
- Tijera
- Marcador indeleble
- Regla
- Porta objetos
- Cubre objetos
- Cuaderno de campo
- Placa Petri
- Mechero
- Bisturí
- Pinzas
- Pipetas
- Lapiceros

2.2.2. Equipos

- Microscopio
- Estereoscopio
- GPS
- Cámara fotográfica

2.3. Instalación y conducción del experimento

2.3.1. Fase I: Trabajo de campo

2.3.1.1. Prospección del área de estudio

Según Agrios (1998) y French (1985), el trabajo de detección de enfermedades es el primer paso para investigar si hay un cambio en la cultura; se basa en información general sobre las condiciones de cultivo, las características del medio de cultivo y los métodos de producción utilizados. La investigación es un estudio, una comprensión preliminar del estado fitosanitario de un área o cultivo específico, una evaluación no detallada de las condiciones patológicas, un estudio preliminar o preliminar que permite un análisis detallado y matizado de los problemas

futuros más importantes. el estudio toma decisiones de cultivo para guiar el manejo de la sanidad vegetal en las regiones analizadas.

Fecha de evaluación: Fueron en los meses de octubre y noviembre del 2019 la visita y evaluación de las parcelas para posterior recolección de muestras.

Para facilitar la evaluación de los cultivos de plantas de café se determinaron lugares donde se va a realizar. Los lugares a evaluación fueron en cuatro zonas que previo a una visita se determinó como zonas de evaluación. La Fecha de recolección de muestras fue en el mes de noviembre con el ingreso de las primeras lluvias de la ceja de selva.

Tabla 01.

Zonas de evaluación de incidencia de la roya del café.

Zona	Lugar	Coordenadas	Altitud
1	Kimhiri Alto	Este: 0637965 Norte: 8607741	938 msnm
2	Villa El Salvador	Este: 0635199 Norte: 8610002	1192 msnm
3	Maserine	Este: 0652335 Norte: 8587613	1254 msnm.
4	Capirushiato	Este: 0643706 Norte: 8601237	1390 msnm

Figura 02.

Mapa satelital del Distrito de Kimbiri y las zonas evaluadas (Google Earth).



2.3.1.2. Recolección de las muestras

Se recolectaron muestras de hojas afectadas que muestran lesiones amarillas de plantación de café en las hojas como se puede ver en la fotografía A, las cuales se extrajeron con una cuchilla como se muestra en la fotografía B, posteriormente se dispusieron en bolsas de plástico y se guardaron por separadas el primero en tapers de plástico para luego ser trasladada a los laboratorios de fitopatología de la UNSCH para el análisis macroscópico y microscópico, y la segunda muestra en una caja de tecnopor para ser enviadas a la ciudad de Lima a los laboratorios de Biología Molecular de Fitopatología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) para su análisis de identificación molecular del hongo de la roya.

Figura 03

Recolección de muestras de hojas con lesiones amarillas en el café.



Figura 03.

Evaluación de síntomas de lesiones amarillas de las hojas del café en el campo



En la Figura 04, se puede observar el haz de la hoja lesiones amarillas y Necrosis producto del daño del patógeno en estudio en la imagen C, y en el envés de la hoja se puede ver las pústulas de color amarillo como se puede observar en la imagen D.

2.3.1.3. Evaluación de la incidencia de la roya

El porcentaje de incidencia se llevó a cabo en las cuatro zonas productoras de café del distrito Kimbiri, diferentes zonas de altitud en localidades de Villa El Salvador, Kimbiri Alto, Capirushiato y Masereni. Para el conteo de plantas con los síntomas de la enfermedad se realizó a través de un muestreo en todas las parcelas indicadas realizando un muestreo dirigido (figura 05), el número de plantas evaluadas por cada parcela fue de 50.

Figura 05.

Croquis de muestreo de las parcelas evaluadas para incidencia de las plantas con lesiones amarillas del café



Tabla 02.

Número de parcelas y plantas para evaluar el porcentaje de incidencia de lesiones amarillas en cafetos en el distrito de Kimbiri.

Zona	Localidad	Altitud (msnm)	N° de Parcelas	N° de Plantas por Parcela
1	Kimbiri Alto	938	1	50
2	Villa El Salvador	1192	1	50
3	Maserine	1254	1	50
4	Capirushiato	1390	1	50

Se contó el número de árboles sanos y árboles con síntomas de daño amarillo para determinar la incidencia en el área. (ver figura 06)

$$\% \text{ Incidencia} = \frac{\text{Total de plantas enfermas}}{\text{Total de plantas evaluadas}} * 100$$

Figura 04.

Evaluación de plantas de café con o sin lesiones amarillas.



2.3.2. Fase II: trabajos de laboratorio

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la Escuela Profesional de Agronomía de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

Preparación de cámara húmeda

Esta cámara húmeda consistió en una fuente de plástico hermético desinfectado, se colocó papel toalla húmeda en la base, con el fin de crear condiciones favorables de humedad para que esporule el hongo y se mantenga viva durante algunos días para su análisis macroscópica y microscópico que faciliten poder describir sus características de su estructura de propagación.

2.3.2.1. Caracterización de la estructura del patógeno.

La caracterización del patógeno identificado como agente causal de la clorosis y necrosis de la hoja de café se realizó macroscópica, microscópica y posteriormente mediante la prueba de Reacción de Cadena Polimerasa (PCR). El color, forma, textura de las pústulas de esporas, medición de las urediniosporas y obtención de la cadena

molecular es la caracterización de mayor importancia y suficientes para sugerir la clase, orden, familia y género al cual pertenece el determinado patógeno. Así mismo se realizó como se describe a continuación.

a. Observación macroscópica

Se realizó en el laboratorio de Patología vegetal de la escuela profesional de agronomía de la UNSCH se utilizó un estereoscopio, que es un instrumento que nos permite aumentar el tamaño de la muestra de 4 a 40 veces, nos permitió observar los síntomas de las muestras y posteriormente poder realizar disecciones de estructuras lesionadas que posean esporas ya que en el aparato se puede visualizar la muestra y poder obtener una muestra representativa que pueda ser observada por el microscopio para sus demás estudios.

Figura 05.

Evaluación macroscópica de las lesiones amarillentas con el estereoscopio.



A través de la evaluación macroscópica podemos describir los síntomas que produce las lesiones amarillas y coloración del patógeno a caracterizar, y a la vez extraer muestras precisas para poder realizar estudios microscópicos sin que esta se contamine por otras muestras.

b. Observación microscópica

La mayoría de las esporas de las lesiones amarillentas se identificaron y caracterizados por medio del estudio microscópico a través de un microscopio óptico. Las características para considerar serán:

- Coloración de la espora
- Tamaño de la espora
- Forma de espora

Montaje directo: todo lo aislado se examinaron mediante preparación microscópica realizada directamente a partir de hojas que presentan síntomas de lesiones de color amarillo que son extraídas con ayuda de un estereoscopio para mostrar mayor precisión del tejido dañado. Para ello, se recogió una porción de esporas, con ayuda de la aguja hipodérmica, y se deposita sobre un portaobjeto al que antes se le colocó una gota de líquido de montaje, para luego cubrirla con un cubre objeto y con laca de uñas para evitar desecación de la muestra.

Figura 06.

Evaluación microscópica de las lesiones amarillentas del café en el laboratorio de fitopatología de la UNSCH.

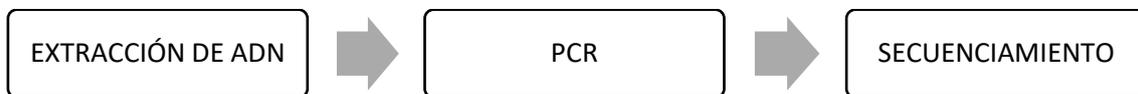


2.3.2.2. Identificación del patógeno

Se realizó mediante:

Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se realizó la recolección de muestras de hojas de café dañadas que presentan esporas de color amarillo de café previamente limpiadas y colocadas en una bolsa de plástico, luego se juntaron todas las muestras en una caja de tecnopor y enviadas a los laboratorios de Biología Molecular de Fitopatología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) en Lima.

Procedimiento general:



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Incidencia y sintomatología café en distrito de Kimbiri – La Convención – Cusco.

3.1.1. Incidencia de plantas con lesiones amarillas

El porcentaje de plantas de café con síntomas de lesiones amarilla diagnosticada en las hojas fueron de 36%, 58%, 18% y 10%, en las localidades de diferentes altitudes y zonas muy distantes en todo el distrito de Kimbiri; se evaluaron las zonas de Villa El salvador, Kimbiri Alto, Capirushiato y Maserine, como se aprecia detalladamente en la Figura 09.

Figura 07.

Porcentaje de incidencia de plantas con lesiones amarillas en café en el distrito de Kimbiri.

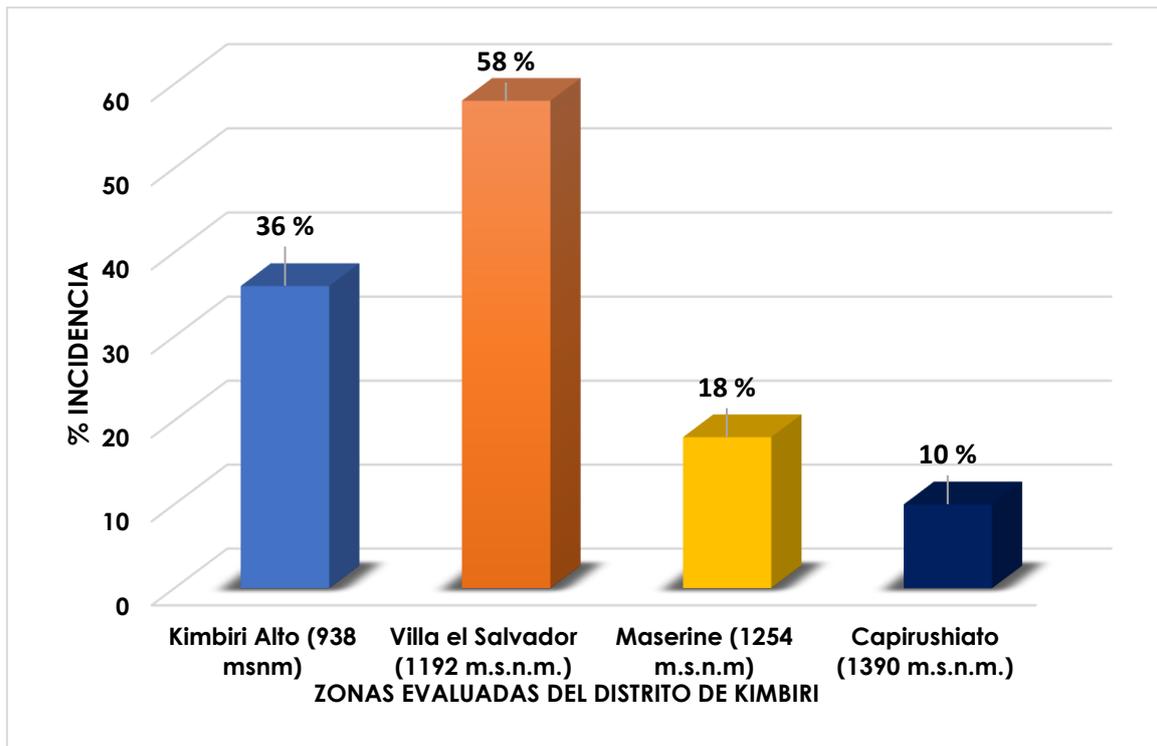


Tabla 03.

Comparación de plantas con lesiones amarillas en cuatro pisos altitudinales en el Distrito de Kimbiri.

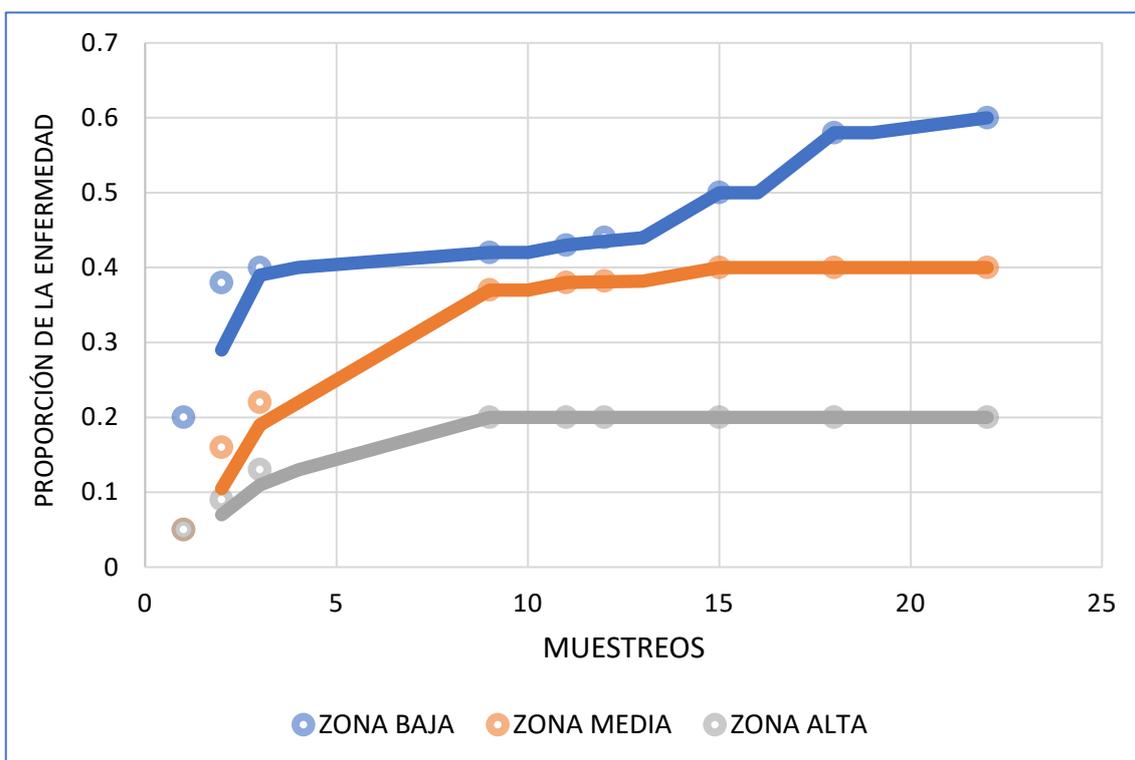
Zona	Lugar	Altitud (msnm)	N° de Plantas Observadas	N° de Plantas con Síntomas	% Incidencia
1	Kimbiri Alto	938	50	18	36.00
2	Villa El Salvador	1192	50	29	58.00
3	Maserine	1254	50	9	18.00
4	Capirushiato	1390	50	5	10.00

Los resultados indican que el patógeno presentó mayor incidencia en las localidades de las zonas bajas como Kimbiri Alto y Villa El Salvador que en las zonas altas como Maserine y Capirushiato. Así mismo, se observa que el porcentaje de incidencia de las plantas con lesiones amarillas obtenidos son altos en lugares de menor altitud, debido a que éstas ocasionan daños significativos de calidad en las hojas, altitud favorable para la producción está entre los 600 a 2700 msnm las zonas evaluadas están entre los rangos favorables para el cultivo de café, pero las zonas bajas son lugares más propensos a tener problemas con el patógeno causante las lesiones amarillas.

El estudio concuerda con los estudios realizados, en Tingo María se evaluó, pero roya en tres localidades, San Isidro (1600 msnm), La Vega (1100 msnm) y Tingo María (670 msnm). El ataque fue significativamente diferente entre la zona alta y baja, mas no entre la zona media y alta. El área foliar cubierta es mayor en la zona baja que en la zona alta, en esta última, el número de hojas por rama fue mayor; asimismo, las plantas tuvieron mayor vigor, mientras las de la zona baja mostraron fuerte defoliación (Rojas, 1982). Hernández (2003), en una publicación sobre epidemiología, presenta el área debajo de la curva de progreso de la roya, evaluada entre octubre 1983 y octubre 1984. Los mayores niveles de la enfermedad se encontraron en la zona baja (670 msnm), seguida de la media (1100 msnm) y alta (1600 msnm), tal como se muestra en la Figura 10.

Figura 8.

Curva de progreso de la roya del café en tres pisos altitudinales

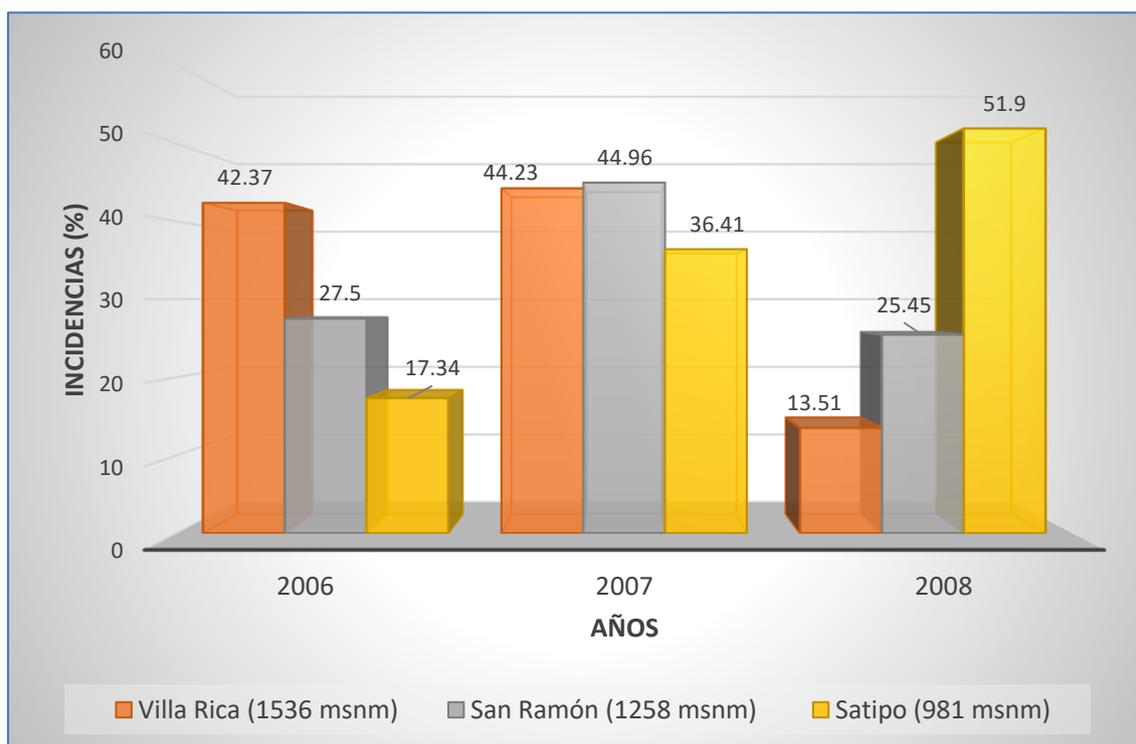


Nota. Adaptado de Hernández, 2003

La discrepancia entre dos zonas como la de Kimbiri Alto (938 msnm) tiene una incidencia 36% y Villa El Salvador (1192 msnm) presenta una incidencia 58% ya que presentan diferente altitud; dando a conocer que hay otros factores más que altitud que influyen en la proliferación del patógeno de la roya (*Hemileia sp.*) como da conocer los estudios realizados por Julca (2008), en un estudio realizado en café var. Caturra roja, encontraron que la incidencia de la roya del café en tres pisos altitudinales fue variable. Así tenemos que en el 2006 la mayor incidencia correspondió a la localidad de Villa Rica (1536 msnm), comparada con la de San Ramón (1258 msnm) y Satipo (981 msnm); al año siguiente prácticamente fue similar en Villa Rica y San Ramón y menor en Satipo; el 2008 fue mucho mayor en Satipo, seguido de San Ramón y Villa Rica (Figura 11). Los resultados mostraron que la ocurrencia de roya en un sitio está relacionada no solo con la altitud, sino también con otros factores como precipitación, temperatura, carga de frutos, época de cosecha e inóculo residual (López, 2010), así como el grado de sombra. en el área.

Figura 9.

Variación de la roya del café en tres pisos altitudinales



Nota. Tomado de, *Julca, 2009.*

3.2. Caracterización de la estructura del patógeno del café en distrito de Kimbiri – La Convención – Cusco.

3.2.1. Observaciones macroscópico de las lesiones amarillas del café

Sintomatología de las lesiones amarillas en café. Esta identificación se ha realizado con un estereoscopio de acuerdo a las muestras recolectados. Los síntomas descritos de las lesiones amarillas, observados en las plantas de café en las localidades de Villa el salvador, Kimbiri Alto, Capirushiato y Maserine; fueron Principalmente lesiones cloróticas, inicialmente decoloración de áreas foliares, especialmente en los márgenes donde tiende a acumularse más agua, y posteriormente urediniosporas con abundantes hongos, identificados como un polvo amarillo o anaranjado en la base de las hojas afectadas. (Figura 3.3) y en el haz de la hoja se observa síntomas de lesiones amarillas y de color café por la alta intensidad de daño (Figura 12). Los cultivos infestados sufren una rápida reducción del rendimiento debido al efecto sobre la economía energética de las hojas, que es responsable de tres importantes procesos (fotosíntesis, respiración y transpiración); cuando es atacado, reduce su función e incluso puede escapar del árbol.

Figura 10.

Evaluación de síntomas de roya en el envés de hoja en el laboratorio.



Figura 11.

Evaluación de síntomas de roya en el haz de la hoja en el laboratorio.



Figura 12.

Esporas de la roya Hemileia vastatrix en café en el envés de la hoja.

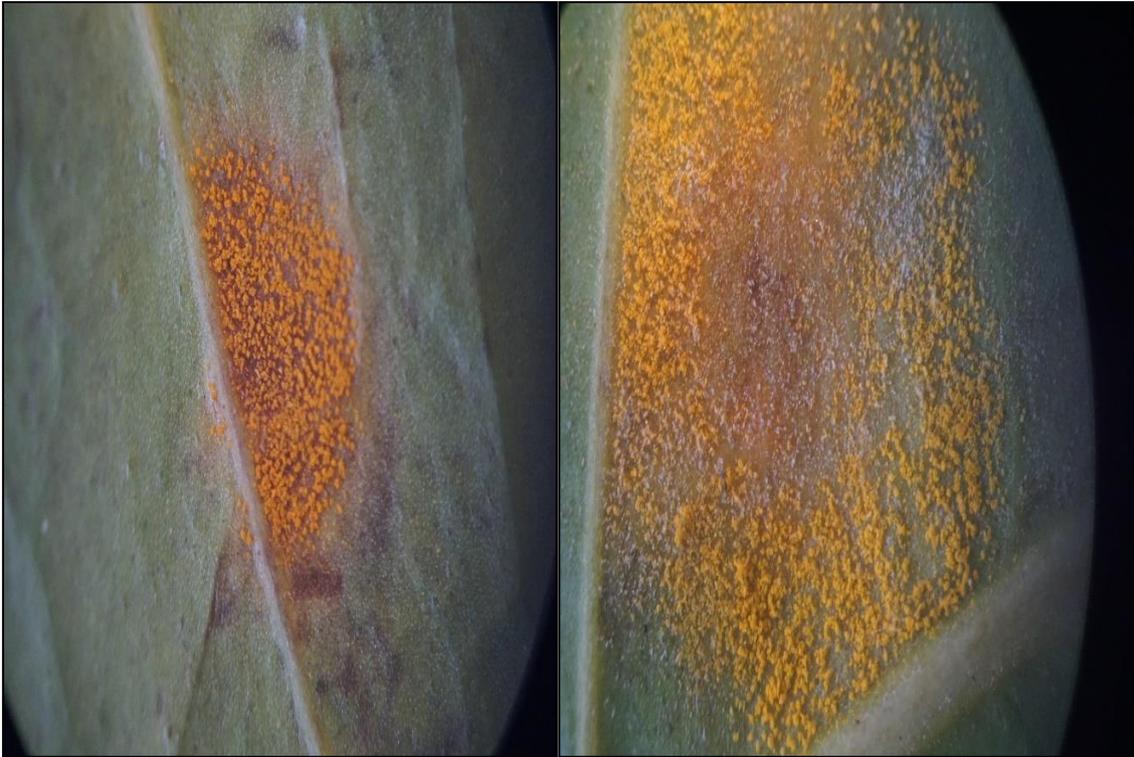


Figura 13.

Comparación en el haz de la hoja con roya macroscópicamente.



Estos resultados son similares a la roya del café que lo reportado por FONAIAP (1984) Se dice que los síntomas aparecen en la parte inferior de las hojas como manchas cubiertas de polvo amarillo, naranja o de color ladrillo. Inicialmente, una sola área infectada tiene unos 3 mm de diámetro, pero aumenta gradualmente a 2 cm o más. A medida que avanza la enfermedad, se observa negrura en el centro de las lesiones o manchas, lo que se asocia con la muerte del tejido foliar.

Estos resultados son similares a los informados por Castro (2009), quien indicó la aparición de los síntomas como pequeñas manchas translúcidas de color amarillo pálido de 1 a 3 mm. La lesión crece hasta que se forma una gran mancha con mucho polvo amarillo (esporas) en el envés de la hoja y es visible como una mancha amarilla en el reverso. Las lesiones antiguas son necróticas.

Estos resultados también concuerdan por lo reportado por Rivillass (2011), que indica que los síntomas se pronuncian en el envés de la hojas, donde se observa manchas pálidas que con el pasar del tiempo incrementa su tamaño formando manchas amarillas o naranjas, con presencia de polvillo amarillo, donde se producen las esporas del hongo.

3.2.2. Observación microscópica de las lesiones amarillas

Las esporas del patógeno de café en la observación microscópica realizado en el laboratorio de Fitopatología de la Escuela Profesional de Agronomía de la Facultad de la Ciencias Agrarias (UNSCH), se observan las esporas denominadas urediniosporas de color amarillo o anaranjado de forma redonda u ovalado, semejantes a un riñón, presentando espinas finas en todas su area como se observa en la figura 16.

Para la medición del tamaño de la espora se realizó considerando algunos detalles desde la calibración del microscopio según la información recolectada para su determinación y aproximación del tamaño adecuado según la tabla 5. Ya se tiene factor de calibración según el lente objetivo, pero son datos exactos para la investigación se realizó un reajuste de acuerdo con el microscopio óptico que se tiene en el laboratorio asemejándose al reporte de calibración que se tiene en la tabla 04.

Tabla 04.*Determinación de factor de calibración de un microscopio.*

Lente objetivo (a)	Lente ocular (b)	Magnificación (a * b)	Retículas del microscopio (subdivisión)	Micrómetro de platino (µm)	Factor de calibración (µm/subdivisión)
10X	10X	100X	100	1000 µm	10
20X	10X	200X	100	500 µm	5
40X	10X	400X	100	250 µm	2.5

Tabla 05.*Determinación del factor de calibración según a microscopio óptico del laboratorio de laboratorio de Fitopatología de la Escuela Profesional de Agronomía de FCA- UNSCH.*

Lente objetivo (a)	Lente ocular (b)	Magnificación (a * b)	Retículas del microscopio (subdivisión)	Micrómetro de platino (µm)	Factor de calibración (µm/subdivisión)
10X	10X	100X	77	870 µm	11.30
40X	10X	400X	40	110 µm	2.75

Tabla 06.*Medición del Tamaño de ancho de la urediniosporas del patógeno según la figura 14.*

Lente objetivo (a)	Lente ocular (b)	Magnificación (a * b)	Factor de calibración (µm/subdivisión)	Retículas del microscopio (subdivisión)	Tamaño del ancho de la urediniosporas
40X	10X	400X	2.75	8	22.00 µm
40X	10X	400X	2.75	9	24.75 µm

Tabla 07.*Medición del Tamaño de altura de la urediniosporas del patógeno según la figura 18.*

Lente objetivo (a)	Lente ocular (b)	Magnificación (a * b)	Factor de calibración (µm/subdivisión)	Retículas del microscopio (subdivisión)	Tamaño de altura de la urediniosporas
40X	10X	400X	2.75	13	35.75 µm
40X	10X	400X	2.75	12	33.00 µm

Figura 16.

Esporas de Urediniosporas de la roya (Hemileia vastatrix) del café.

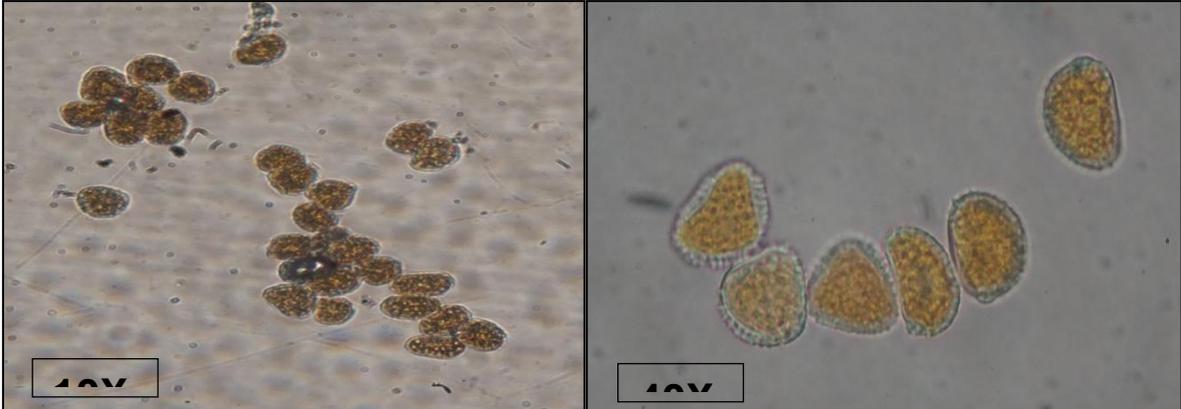


Figura 14.

Medición de las estructuras de Urediniosporas a lo ancho.

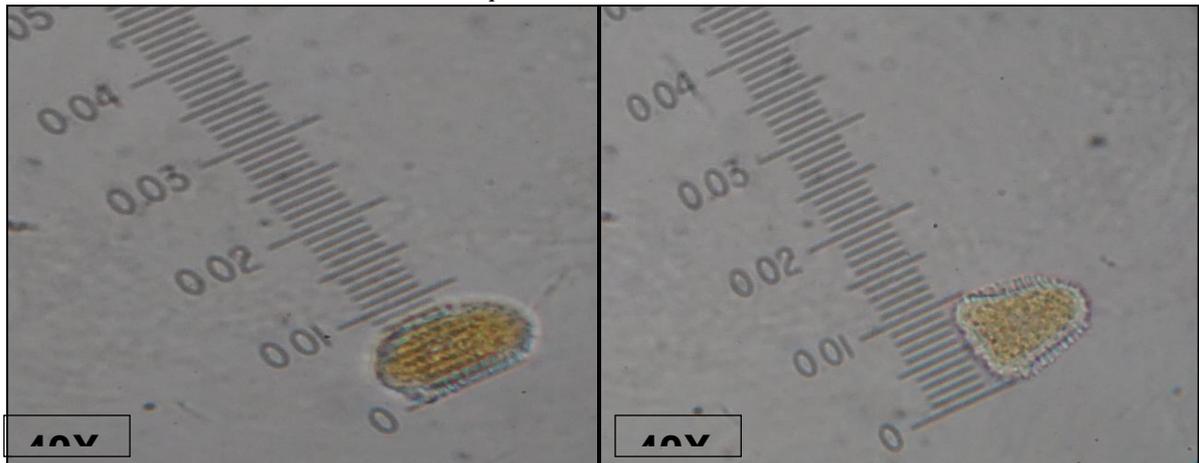
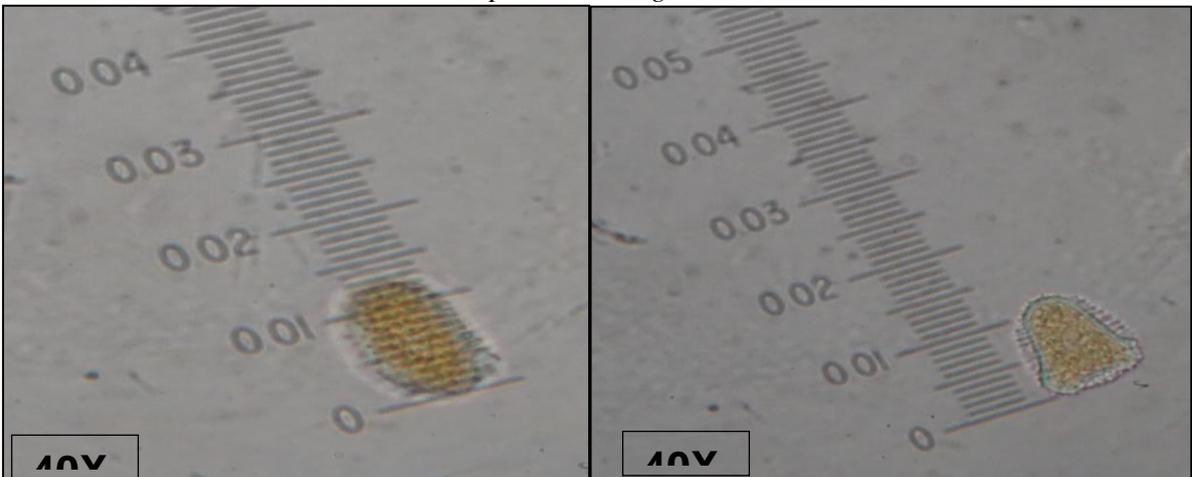


Figura 18.

Medición de las estructuras de Urediniosporas a lo largo.



El resultado obtenido de la medición microscópica de la espora urediniosporas según el factor ajuste calculado con el microscopio óptico del laboratorio es de ancho 22.00 μm y 24.75 μm , altura 35.75 μm y 33.00 μm los datos se aproximan a lo obtenido en descripción morfológica hecho por Castro (2009). Muestra que las esporas de la roya del café tienen forma de riñón (30 μm de largo x 20 μm de ancho) bajo el microscopio, lisas por dentro y ásperas por fuera, llamadas uredosporas, y se producen en grandes cantidades, correspondientes al color amarillo que se ve en la hoja de café o El fondo de polvo anaranjado es característico de esta enfermedad. La incidencia de teliosporas es muy baja, son redondas, 20-25 μm .

3.2.3. Análisis de la Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó en el laboratorio de la Universidad Nacional Agraria La Molina Laboratorio de Biología Molecular de Fitopatología, identificación molecular del hongo del patógeno causante de las lesiones amarillas en las hojas del café, obteniendo los siguientes datos.

El método empleado para la extracción de ADN es la compra de un kit comercial que se detalla el procedimiento en el anexo 8.

A continuación, se detalla los resultados obtenidos con 2 muestras.

- **Secuencia consenso final**

>A – [*Hemileia vastratrix*](#) – 1016pb

```
TCTCATTACATGCCCATGTTCAATTAAGAAACAAGAGCTTCTTACACATTT
AAAGTTTGAGAATAGGTTAAGGATGTTTCATCCCCAAGGCCTCTAATCATTC
GCTTTACCTCATAAAACTGATGTGAGTCTCTGCTATCCTGAGGGAAACTTCG
GCAGGAACCAGCTACTAGATGGTTCGATTAGTCTTTCGCCCTATAACCCAAA
TTTGACGATCGATTTGCACGTCAGAACCGCTACGAGCTTCCACCAGAGTTTC
CTCTGGCTTCACCCTATTCAGGCATAGTTCACCATCTTTCGGGTCCCAACAT
ACTTGCTCTTACTCAGTACCTTCATATAAATAATTAGGACTGGTCAATGGTG
CACCTCATTAATTTTGGATCCCATTTACATTCACCTTTCATTGCGCATGTGAG
```

TTTTACCACTCAAATACTTGCAAGCATGTTAGACTCCTTGGTCCGTGTTTCA
AGACGGGTCATTTAAAGCTATTGCACCAACATCCATAGTAAGAGTGTCAAC
CATTTTGGTGACCTACTGAAAATCTCTTTCCAGCTTACTGTGAATCTCCTCAA
TCTTGGGCATTATATATGAAATTCAGGACTATAACACAACCAAAGTTGCTAC
ATTTCCCAAACCCTTATCTAACACCCAAAATTGATGTTGGTCTGATAATGCA
CAGAATACACCCTAATAAAAAGGCTGAACTGACATTATCAAGTCTAACTTCA
AGTGTTTCCCTTTTAAACAATTTACATACTGTAACTCTCTTTCCAAAGTTCT
TTTCATCTTTCCCTCACGGTACTTGTGTTGCTATCGGTCTCTCACCAATATTTA
GCCTTAGATGGAATTTACCACCCATTTTGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGA
CTCTTAGAGACTGCTTCATAAAAAGCACTGGTAGTCCATATCATTAGACAGGA
TTCTCACCTTCAATGATGCTGTATTCCAACAGACTTATATATGGTCCAGCAC
AAGAAAGCACCTCTTCACTTTACAAC

>H- [Hemileia vastratrix](#) – 1016pb

TCTCATTACATGCCCATGTTCAATTAAGAAACAAGAGCTTCTTACACATTT
AAAGTTTGAGAATAGGTTAAGGATGTTTCATCCCCAAGGCCTCTAATCATTC
GCTTTACCTCATAAAAAGTATGTGAGTCTCTGCTATCCTGAGGGAAACTTCG
GCAGGAACCAGCTACTAGATGGTTCGATTAGTCTTTCGCCCTATACCCAAA
TTTGACGATCGATTTGCACGTCAGAACCGCTACGAGCTTCCACCAGAGTTTC
CTCTGGCTTCACCCTATTCAGGCATAGTTCACCATCTTTCGGGTCCCAACAT
ACTTGCTCTTACTCAGTACCTTCATATAAATAATTAGGACTGGTCAATGGTG
CACCTCATTAATTTTGGATCCCATTTACATTCACTTTTATTGCGCATGTGAG
TTTTACCACTCAAATACTTGCAAGCATGTTAGACTCCTTGGTCCGTGTTTCA
AGACGGGTCATTTAAAGCTATTGCACCAACATCCATAGTAAGAGTGTCAAC
CATTTTGGTGACCTACTGAAAATCTCTTTCCAGCTTACTGTGAATCTCCTCAA
TCTTGGGCATTATATATGAAATTCAGGACTATAACACAACCAAAGTTGCTAC
ATTTCCCAAACCCTTATCTAACACCCAAAATTGATGTTGGTCTGATAATGCA
CAGAATACACCCTAATAAAAAGGCTGAACTGACATTATCAAGTCTAACTTCA
AGTGTTTCCCTTTTAAACAATTTACATACTGTAACTCTCTTTCCAAAGTTCT
TTTCATCTTTCCCTCACGGTACTTGTGTTGCTATCGGTCTCTCACCAATATTTA
GCCTTAGATGGAATTTACCACCCATTTTGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGA
CTCTTAGAGACTGCTTCATAAAAAGCACTGGTAGTCCATATCATTAGACAGGA

TTCTCACCTTCAATGATGCTGTATTCCAACAGACTTATATATGGTCCAGCAC
 AAGAAAGCACCTCTTCACTTTACAAC

De acuerdo a los datos obtenidos en la Tabla 08, podemos observar que el patógeno estudiado tiene urediniósporas de *Hemileia vastratrix* de la roya del café, presenta un 100% de identificación dando a precisar que el patógeno caracterizado si pertenece a la roya *Hemileia vastratrix* del café poniendo a precisar que el patógeno descrito es el correcto.

Tabla 08.

Resultados de ID molecular de la muestra A/H.

MUESTRA	Especie	Max score	Query cover	% Identidad	ID NCBI (*)
	<u>Hemileia vastratrix voucher</u>				
A/H	<u>BRIP:61233 28S ribosomal</u>	1901	97%	100%	<u>KT199399.1</u>
	<u>RNA gene, partial sequence</u>				

Nota. El Código de identificación pertenece a la base de datos del NCBI.

Existen muchos métodos que emplean para la extracción de ADN y su posterior análisis de PCR para este trabajo en laboratorio se realizó la extracción con un kit comercial que permite obtener un ADN de muy buena calidad y utilidad para RCP (Cao, 2003; Khokhar, 2011; Turashvili, 2012), presenta como limitación el elevado costo de algunos de estos sistemas de purificación.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

Según los resultados obtenidos, bajo las condiciones en los que se realizó el presente trabajo de investigación, se concluye que:

1. El mayor porcentaje de Incidencia de las lesiones amarillas del café se observó en las zonas de menor altitud y mayor altitud menor incidencia dando entender que se trata de la roya del café (*Hemileia* sp).
2. La observación macroscópica y microscópica muestra tener características de la roya del café (*Hemileia* sp).
3. La identificación molecular del hongo de la roya del café, cuyo resultado indicó que la muestra evaluada es 100% idéntica a la especie del hongo de roya del café (*Hemileia vastratrix*).

4.2. Recomendaciones

- Realizar un diagnóstico de la situación actual de la problemática roya del café a nivel del VRAEM para poder verificar el daño producido por esta enfermedad y poder determinar qué porcentaje hemos avanzado ante el control de la enfermedad.
- Realizar estudios de control químico del agente causal (Roya del café) en diferentes altitudes para poder determinar el comportamiento de la enfermedad en condiciones controladas en el medio ambiente del distrito de Kimbiri o nivel del VRAEM.

- Realizar trabajos a nivel molecular para poder identificar la variabilidad genética de *Hemileia vastratrix* en diversas zonas de producción de café a nivel del VRAEM para poder trabajar a nivel de mejoramiento genético contra las diversas razas de roya identificadas.
- Caracterizar e identificar cafetos resistentes a la roya, empleando caracteres morfológicos, agronómicos y bioquímicos para mejorar la resistencia de las plantas de café ante la roya en diferentes altitudes así incrementar la producción.
- Realizar trabajos de caracterización y aislamiento de hongos endófitos del cafeto (*Coffea arabica* L.) como biocontrolador de roya amarilla (*Hemileia vastratrix*) y promover su propagación.
- Darle mayor importancia al café ya que es un producto comerciable tanto en el mercado local como internacional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABD-Elsalam, K. 2003. Web-based bioinformatic resources for protein and nucleic acids sequence alignment. *African Journal of Biotechnology* 2(12): 714-718.
2. Agrios, G.N. (1997). Control of Plant Diseases. In: *Plant Pathology*, 4th Edition, Academic Press. San Diego, 200-216.
3. Agrios, G.N. (1998). *Plant pathology*. Academic Press. 3rd. Ed. New York. 703p.
4. Aime C. (2006). Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). *Mycoscience* 47: 112–122. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1340354006704119>: [Accessed January 10, 2015].
5. Alarcó L. A. (2011). Modelo de gestión productiva para el cultivo de café (*Coffea arabica* L.) en el sur de Ecuador, Madrid, España. p. 11-12.
6. Alvarado, M.; Rojas, G. (2007). “El cultivo y beneficiado del Café” 2 reimpr. De la 1 ed., - San José, Costa Rica. EUNED 2007. 184 pp.
7. ANACAFE Variedades de café disponible en <https://www.anacafe.org/glifos/index.php?title>. Caficultura variedades del Cafeto. Recuperado el 3 de marzo de 2014.
8. Andrés, MF. (2003). Nematodos parásitos de plantas en suelos agrícolas. *La revista profesional de sanidad vegetal*. 149:33-42.
9. Anthony, F; Astorga, C; Berthaud, J. (1999). Los recursos genéticos: Las bases de una solución genética a los problemas de la caficultura latinoamericana. In Bertrand, B; Rapidel, B. eds. *Desafíos de la caficultura en Centroamérica*. San José. CR. IICA. p. 369-406.
10. Arcila, J., 2007. Capítulo 4: “Establecimiento del cafetal”. En: *Sistemas de producción de café en Colombia*. Chinchiná, Cenicafe. 309 p.
11. Arvy, M. P.; Gallouin, F.; Ubillos, M. Á. M. y Montalbán, J. M. (2007). *Espicias, aromatizantes y condimentos*. Mundi-Prensa. España.

12. Atkins, S. y Clark, I. (2004). Fungal molecular diagnostics: a mini review. *Journal of Applied Genetic* 45(1): 3-15.
13. Avelino, J. y Rivas, G. (2014). La roya anaranjada del cafeto. Hal. archives-ouvertes. 47pp.
14. Avelino, J., Rivas, G. (2013). La roya anaranjada del cafeto. IICA, San José, Costa Rica.
15. Barquero, M. (2011). Consideraciones sobre la relación beneficio/costo del control químico del Ojo de Gallo. *Revista Informativa I-2011*. ICAFE. Costa Rica. pp 1-4.
16. Barquero, M. (2013). Recomendaciones para el combate de la Roya del Cafeto. ICAFE. 3era ed. San José, Costa Rica. 63 p.
17. Berkeley, MJ. (1869). [Untitled]. *Gardener's Chronicle* 45: 1157.
18. Berthaud, J. y Charrier, A. (1998). Genetic resources of *Coffea*. *Elsevier Applied science*. 4: 1-42.
19. Bertrand, B., Etienne, H. (2001). "Growth, production and Bean quality of *Coffea arabica* as affected by interspecific grafting: consequences for rootstock breeding". *HortScience* 36(2):269-273.
20. Blandon, C y Ruiz, D. (2003). Estudio del comportamiento de plagas y enfermedades en el cultivo de café, mediante el uso de recuentos integrales. Masatepe, Masaya. Tesis Ing. Agro. UNA. Managua, Nicaragua. 41p.
21. Blas, S. R. et ál. (2011). Informe de caracterización del germoplasma peruano de café. UNALM-FDA- Café Perú- FINCyT. Lima. p: 28.
22. Buller, A. (1934). *Omphalia flavida*, a gemmiferous and luminous leaf-spot fungus. In *Researches on fungi*. Vol VI: 397-443, Longmans, Green & Co. Londres.
23. Cabral, P.G.C., Zambolim, E.M., Zambolim, L., Lelis, T.P., Capucho, A.S., y Caixeta, E.T., (2009). Identification of a new race of *Hemileia vastatrix* in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*. 4(1): 129-130.

24. Cao W., Hashibe M., Rao J.Y., Morgenstern H., y Zhang Z.F. (2003). Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues y buccal cells. *Cáncer Detection and Prevention*. 27 (5): 397-404.
25. Carvalho, A. (1988). Principles and practices of coffee plant breeding for productivity and quality factors: *Coffea Arabica*. In *Coffee*. Ed. Por R. J. Clarke y R. Macrae. Elsevier applied science. Vol.4. Agronomy, capítulo 4.
26. Carvalho, C.R., Fernandes, R.C., Carvalho, G.M., Barreto, R.W., Y Evans, H.C. (2011). Cryptosexuality and the Genetic Diversity Paradox in Coffee Rust, *Hemileia vastatrix*. *PLoS One*. 6(11): 26387.
27. Castañeda, E. (2000). El ABC del Café. Cultivando calidad. TECNATROP S.R.L. Lima - Perú. 172p.
28. Castaño, J. (1956). El arseniato de plomo (Du Pont Un Rexform) en el control de la gotera del cafeto. *Revista Cafetalera de Colombia* 13: 36-44.
29. CASTILLO, J. (1970). Seleccione la semilla grande de café para las siembras. *Revista Cafetera de Colombia*. Colombia. 19 (146): 60-68.
30. Castillo, P. G. (2013). La roya anaranjada del cafeto (*Hemileia vastratrix*, Berk. Br.) y su comportamiento en México. Propuestas para enfrentar un nuevo brote epidemiológico. Editorial Amecafé, México. 20 p.
31. Castro F, R, Charles E, H, and Barreto, RW. (2009). Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastratrix* in Brazil with observe on their mode of germination. *Tropical Plant Pathology*, 34 (2):108-113.
32. Castro, CBL; Cortina, GHA; Rouxl, J; Wingfield, MJ. (2013). New coffee (*Coffea arabica*) genotypes derived from *Coffea canephora* exhibiting high levels of resistance to leaf rust and *Ceratocystis* canker. *Tropical Plant Pathology*. 38(6): 485-494.
33. Charrier, A; Bertraud, J. (1985). Botanical classification of coffee. In Clifford, MN and Wilson, KC. Eds. *Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*. Croom Held, London. P. 13-47.

34. Cochachi, S. (1993). Efecto del fungicida S – 3308L en el control de la roya del café (*Hemileia vastratrix* Berk.) en Tingo María. Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo. 83 p. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María.
35. Cristancho, A; Escobar, C; Ocampo, J. (2007). Evolución de razas de *Hemileia vastratrix* en Colombia. *Cenicafé* 58(4): 340-359.
36. Cristancho, M. (2011). *Cenicafé, Ciencia, tecnología e innovación para la caficultura colombiana; foros*. <http://www.cenicafe.org/es/index.php/forums/viewthread/15/#34>
37. Cristancho, M; Escobar, C. (2008). Transferability of SSR markers from related *Uredinales* species to the coffee rust *Hemileia vrastatrix*. *Genet. Mol. Res.* 7(4):1186-1192.
38. Cronquist, A. (1991). *An integrated System of the Classification of Flowering Plants*, Columbia University Press.
39. Cullings, K. y Vogler, D. (1998). A 5.8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: applications to ecology and evolution. *Molecular Ecology* 7: 919- 923.
40. Davis, AP; Govaerts, R; Bridson, DM; Stoffelen, P. (2006). An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 152 (4): 465-512, Phylogenetic relationships in *Coffea* (Rubiaceae) inferred from sequence data. 21edition Colloque: Association Scientifique Internationale du Café. pp. 868 – 875.
41. Días, I. y Crozzoli R. (1995). Efecto del nemátodo agallador *Meloidogyne exigua* sobre el crecimiento de plantas de café en vivero. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Disponible en: http://brokert10.fcla.edu/DLData/SN/SN03919749/0023_002/vol23_2x.pdf. Consultado: 22 de setiembre 2018.
42. Duicela, L. (2003). Desarrollo de tecnologías para la producción de café arábigo orgánico. Consejo Cafetalero Nacional, 346 pp.
43. Duran, F. (2011). “Cultivo del Café” Editorial Latino Editores 512 pp.

44. Echeverría, F. (2011). “Reproducción sexual y asexual en café: uso en mejoramiento genético”. Revista informativa Unidad de Investigación, ICAFE, Costa Rica.
45. Edel, V. (1998). Polymerase Chain Reaction in Mycology: An Overview. In: Bridge, P.; Arora, D.; Reddy, C. y Elander, R. (eds). Applications of PCR in Mycology. UK, University Press. pp: 1-20.
46. El Comercio. (2015). “Café: producción histórica local se recuperará a partir de 2017”. El Comercio. Recuperado de: <http://elcomercio.pe/economia/peru>.
47. Ernst, A. (1880). Coffee disease in New Granada. Nature 22: 292.
48. Fernandes, R.D.C., Evans, H.C., y Barreto, R.W., (2009). Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastratrix* in Brazil with observations on their mode of germination. Tropical Plant Pathology. 34 (2): 108 - 113.
49. Fernandes, V.; Geraldo, V., Furlan, A. y Bacci, M. (2010). Plant or Fungal Sequences? An Alternative Optimized PCR Protocol to Avoid ITS (nrDNA) Misamplification. Brazilian Archives Biology and Technology 53(1): 141-152.
50. Fernández, B.; Cadena, G.; López, D.; Buitrago, J. y Arango, B. (1985). La mancha de hierro del cafeto *Cercospora coffeicola* Berk y Cooke, biología, epidemiología y control. In: Colloque Scientifique International Sur le Café. Salvador. Documents. París, ASIC.
51. Fernández, R; De Guglielmo, Z; Menéndez, A. (2010). Cultivo de tejidos y transformación genética de café. Revista de Investigación. 71: 57 – 84.
52. Figueiredo, M.B. y Passador, M.M., (2008). Morphology, function of sori and variations of the life cycle of rusts. Arquivos do Instituto Biológico. 75(1): 117-134.
53. Flores, H. (2014). Situación del café en el Perú. América Economía. [En Línea]: (<http://www.americaeconomia.com/node/105905>, documento, 29 de noviembre del 2013).
54. FONAIAP. (1984). Roya del cafeto (en línea). Venezuela. Consultado: 25 abr. 2012. Disponible en:

http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd14/texto/royadelca_feto.

55. Franco, C.I.; Alvarenga, G. Maturacao fisiológica da semente do cafeeiro (coffea arabica L. cv. Mundo Novo). *Ciencia e Patria* 5:48 – 54. 1981.
56. French, H. (1985). *Métodos de investigación en laboratorio*. Edit. Turrialba, San José, Costa Rica, 345p.
57. Glass, N. y Donaldson, G. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61(4): 1323-1330.
58. Guzmán, O. y Rivillas, C. (2005). Producción In vitro de conidios de *Cercospora coffeicola*. Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé). 2p
59. Hartmann, H. y Kester, D. (1976). “Propagación de plantas”. Editorial Continental S. A. México. 700 pp.
60. Hernández, T. (2003). *Epidemiología fundamentos de análisis y manejo sistémico de epidemias de cultivos tropicales*. Cali. Colombia. 68 pp.
61. Herrera, JC; Combes, MC; Anthony, F; Charrier, A; Lashermes, P. (2002). Introgression into the allotetraploid coffee (*Coffea arabica* L.): segregation and recombination of the *C. canephora*; genome in the tetraploid interspecific hybrid (*C. arabica* x *C.canephora*). *TAG Theoretical and Applied Genetics*. 104 (4): 661 - 668.
62. Hillis, D. y Dixon, M. (1991). Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* 66(4): 411-453.
63. Hirata, T. y Takamatsu, S. (1996). Nucleotide sequence diversity of rDNA internal transcribed spacers extracted from conidia and cleistothecia of several powdery mildew fungi. *Journal of Mycoscience* 37(3): 283-288.
64. Hwang, U. y Kim, W. (1999). General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean Journal of Parasitology* 37(4): 215-228.

65. INEI, Instituto Nacional de Estadística e Informática. (2014). Compendio estadístico del Perú. Disponible en: https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1173/cap12/cap12.pdf. Consultado: setiembre 2016.
66. Iturralde, D. (2005). Identificación genética de hongos. (On line). Sociedad Micológica de España. Disponible en: <http://www.socmicolmadrid.org/noti/noticias30.html>>. Consultado: 1 de may. 2011.
67. JNC, Junta Nacional del Café. (2014). Plan Nacional de Renovación de cafetales. Disponible en: <http://juntadelcafe.org.pe/publicaciones/documento-plan-nacional-de-renovacion-decafetales>. Consultado: octubre 2016.
68. Julca, A.; Guerrero, R. Meneses, L., B., Aduato, Bello, S., Santibañez, R., Borja, R. Y Crespo, R. (2008). Evaluación preliminar de la relación entre la roya (*Hemileia vastatrix*) con el nivel nutricional, rendimiento y calidad de café cv. Caturra en la Selva Central del Perú. Resúmenes del XX Congreso Peruano de Fitopatología. Arequipa. Art. 62.
69. Junta Nacional del Café. (2013) “Producción y exportación”. Portal web (<http://juntadelcafe.org.pe/historia>).
70. Khokhar S.K., Mitui M., Leos N.K., Rogers B.B., y Park J.Y. (2011). Evaluation of Maxwell (®) 16 for automated DNA extraction from whole blood and formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 50 (2): 267-272.
71. Kolmodin, L. y Birch, D. (2002). Polymerase Chain Reaction: Basic principles and routine practice. In: Chen, B. y Janes, H. (eds). PCR cloning protocols. New Jersey. Human Press. pp: 3-18.
72. Kumar, G., (2011). “Propagation of plants by grafting and budding”. A Pacific Northwest Extension Publication. Washington State University.
73. Lashermes, P; Combes, M; Trouslot, P; D'Honto, A; Anthony, F; Charrier, A. (1999). Molecular Characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular Genetics and Genomics*. 261(2):259-266.

74. León, J. (2000). Botánica de los cultivos tropicales. 3 ed. aumentada y revisada. San José, CR, IICA. p. 350-364.
75. Leppik, E.E., (1970). Genes centers of plants as sources of disease resistance. Annual Review of Phytopathology. 8(3514): 323-344.
76. Llorens, V.; Martín, M. y Hidalgo, E. (1997). PCR: Una nueva herramienta para el estudio de hongos ectomicorrícicos. Revista Catalana de Micología 20: 187-198.
77. Lombardi, A. (2002). Caracterización patogénica, morfológica, fisiológica, molecular y sensibilidad al fungicida de *Cercospora coffeicola*. Tesis de Maestría en Agronomía. Universidad Estadual Paulista —Julio De Mesquita Filho. Botucatu, Sao Paulo, Brasil.
78. López, D. (2010). Efecto de la carga fructífera sobre la roya (*Hemileia vastratrix*) del café, bajo condiciones micro climáticas del sol y sombra en Turrialba, Costa Rica. Tesis Mag. Sc. CATIE. Costa Rica. 99pp.
79. López, RJ. (2006). Caracterización de tres variedades de café (*Coffea arabica*) en tres zonas ecológicas del país. Tesis Lic. Universidad de San Carlos de Guatemala. 68 p.
80. Márquez, K., Arévalo, L., Gonzales, R. (2014). “Efecto del abonamiento nitrogenado sobre la roya amarilla (*Hemileia vastratrix* Berck et Br.) en dos variedades de *Coffea arabica* L”. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Folia Amazónica vol. 23. (1) 57-66
81. Moskwa, S. (2005). A Grid-enabled Bioinformatics Applications Framework (GEBAF). Tesis M. Sc. Computer Science. The University of Adelaide, School of Computer Science. pp: 3-5.
82. ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DEL CAFÉ (OIC), (2015). “Informe del mercado de café”. 1st ed. p.5. Available at: <http://www.ico.org/documents/cy2014-15/cmr-0315-c.pdf>.
83. Orozco, FJ. (1986). Descripción de especies y variedades de café (en línea). Boletín técnico N°11.CENICAFE. Consultado: 8 mayo 2018. Disponible en <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/597/1/011.pdf>

84. Park, Y. y Min, B. (2005). Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer of Ribosomal DNA in the Genus *Rhizopus*. *Mycobiology* 33(2): 109-112.
85. Pavan B.; Bigot, C.; SERA, T. Especies de cafetos; Caficultura etíope. Editorial INDIANAS; INDIA; (1996). pág.: 50-53.
86. Regalado, A. (2006). ¿Qué es la calidad en el café? Chapingo, ME. Universidad Autónoma Chapingo. 309 p.
87. Rivera, G. (2007). Conceptos Introdutores a la Fitopatología. San José Costa Rica. Disponible en: http://books.google.com.gt/books?id=xpTHXEWG_t8C&pg
88. Rivillass, O. C., Serna, G. C., Cristancho, A. M. y Gaitán, B. A. (2011). La Roya del Cafeto en Colombia (Impacto, manejos y costos del control, resultados de investigación). Centro Nacional de Investigación del Café (Cenicafé). Chinchiná, Caldas, Colombia. Pág.: 1-53
89. Rojas, R. (1982). Epidemiología de la Roya Amarilla del Café (*Hemileia vastratrix*) en tres zonas altitudinales de Tingo María. Tesis Ing. Agrónomo. UNAS. Tingo María.
90. Sasser, J. (1970). Economic importance of *Meloidogyne* in tropical countries. In: Lamberti, F. and C.E. Taylor (eds.): *Root Knot Nematodes*. London. Academic Press. pág. 360-374.
91. Schieber, E; Zentmyer, GA. (1984). Coffe rust in the Western Hemisphere. *Plant Disease* 68 (2): 89-93. Disponible en: https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1984Articles/PlantDisease68n02_89.pdf.
92. Silva, DG. (2000). Levantamento de raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* e resistência de clones de *Coffea canephora* var. Conilon à ferrugem. Dissertation, Federal University of Viçosa, Brazil.
93. Silva, MC do; Várzea, V.; Guerra G.; Gil, A.; Fernandez, D.; Petitot, AS.; Bertrand, B.; Lashermes, F.; Nicole, M. (2006). Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Braz. Journal Plant Physiol.* 18(1):119.147.

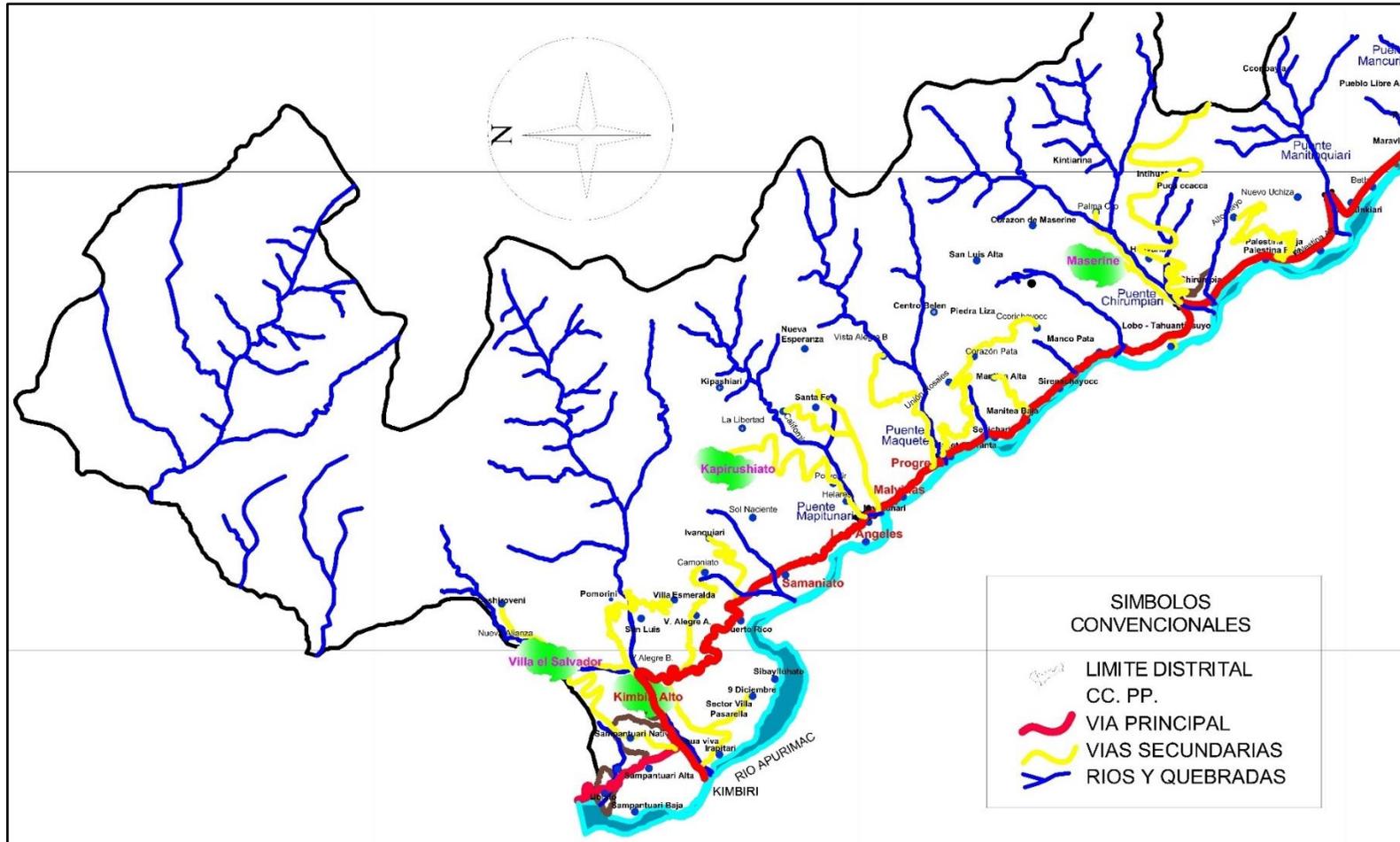
94. Small, E. (2009). Top 100 Food Plants. NRC Research Press, 187-197.
95. Subero, L. (2005). La roya del café (en línea). Consultado 13 abr. 2012. Disponible en: www.infocafes.com.
96. Talhinhos, P., Batista D., Diniz I., Viera A., Silva D., Loureiro A., Tavares S., Pereira A., Azinheira H., Guerra L., Varzêa V., Silva M. (2017). The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastratrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology*. 1749-016.
97. Temis-Pérez, A; López-Malo, A; Sosa-Morales, M. (2011). Producción de café (*Coffea arabica* L.): cultivo, beneficio, plagas y enfermedades. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 5 (2): 54 – 74.
98. Tirabant, et al (2014). Impacto económico de *Hemileia vastratrix* en 11 caseríos del ámbito de influencia del proyecto café, Distrito de Alonzo de Alvarado, Provincia de Lamas y Región San Martín.
99. Turashvili G., Yang W., McKinney S., Kalloger S., Gale N., Ng Y., Chow K., Bell L., Lorette J., Carrier M. (2012). Nucleic acid quantity and quality from paraffin blocks: defining optimal fixation, processing and DNA/RNA extraction techniques. *Experimental and Molecular Pathology*. 92 (1): 33-43
100. Varese, E., Rojas, J., (2012). “Caficultura Sustentable I” (Stichting Interkerkelijke Aktie Voor Latijns Amerika ‘Solidaridad’) 102 pp.
101. Várzea, V. (2013). Avances del conocimiento sobre las razas de roya del café, con énfasis en la caficultura de Latinoamérica. Turrialba, Costa Rica, CATIE. Presentación power point.
102. Villa, N.; Kageyama, K.; Asano, T. y Suga, H. (2006). Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and b-tubulin gene sequences. *Mycologia* 98(3): 410-422.
103. Villachica, H. y Enciso, R. (1993). “Comportamiento en vivero de cuatro portainjertos para naranja Valencia en Chanchamayo”. INIA. PICT. Informe Técnico Nro. 21. Lima. 13pp.

104. Wang A. y Avelino J. (1999). El ojo de gallo del cafeto (*Mycena citricolor*). In: Bertrand B., Rapidel, B. Desafíos de la caficultura en Centroamérica. San José, Costa Rica. 496 p.
105. WCR (World Coffee Research). (2018). Las variedades del café arábica (en línea). Consultado: 9 mayo 2018. Disponible en: https://worldcoffeeresearch.org/media/documents/las_variedades_del_cafe_arabica_v2_feb_2018.pdf
106. White, T.; Bruns, S. y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. In: Innis, M.; White, T. y Sninsky, J. (eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. EE.UU. Academic Press. pp: 315-322.
107. Wu, Z.; Tsumura. Y.; Blomquist, G. y Wang, X. (2003). 18S rRNA Gene variation among common airborne fungi, and development of specific oligonucleotide probes for the detection of fungal isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 69(9): 5389–5397.
108. ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E.M; VÁRZEA, V.M.P. Durable resistance to coffee leaf rust. Vicososa, Universidade Federal de Viçosa, 2005. 450 p.
109. Zuluaga, C.; Buriticá, P. y Martín-Montoya, M. (2008). Generalidades de los Uredinales (Fungi: Basidiomycota) y de sus relaciones filogenéticas. *Acta Biológica Colombiana (Colombia)* 14 (1): 41-56.

ANEXOS

Anexo 1.

Mapa del Distrito de Kimbiri y localización de las comunidades evaluadas.



Fuente: División de Catastro y Ordenamiento Territorial - Municipalidad Distrital de Kimbiri 2018.

Anexo 2. Panel fotografico

Foto 01. Evaluación de la zona I – Villa el Salvador.





Foto 02. Evaluación de la zona 2 – Kimbiri Alto.

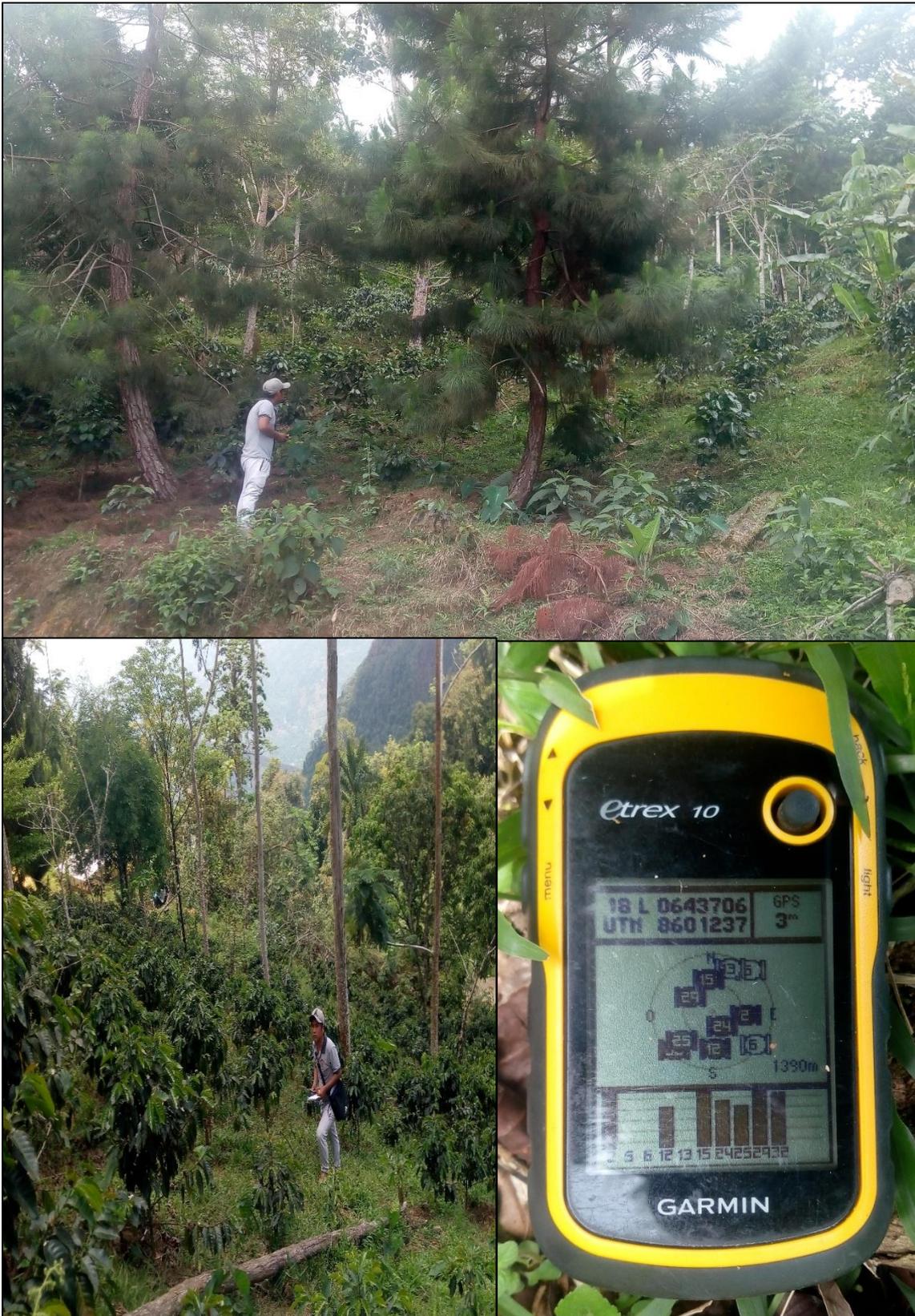


Foto 03. Evaluación de la zona 3 Capirushiato.



Foto 04. Evaluación de la zona 4 – Maserine.



Foto 05. Fotografía de síntomas de roya (*Hemileia vastatrix*) tomadas en el laboratorio de Fitopatología de la Escuela Profesional de Agronomía de la UNSCH.

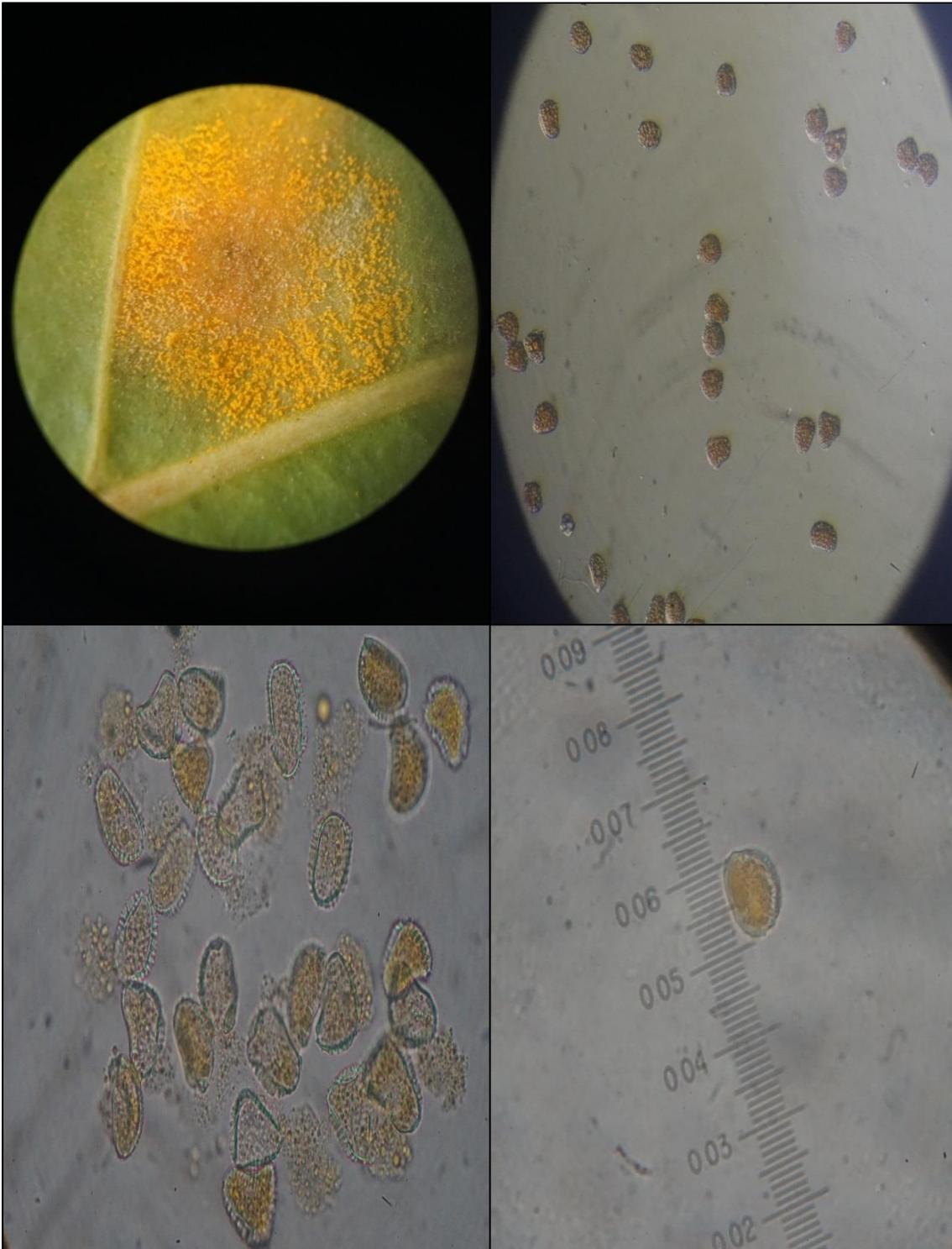


Foto 06. vista macroscópico y microscópico

Anexo 03

Resultado de la PCR realizado en el laboratorio de Biología Molecular de Fitopatología -
UNALM

	Universidad Nacional Agraria La Molina Laboratorio de Biología Molecular de Fitopatología	Versión: 01 Fecha de emisión: 11- DICIEMBRE- 2019
	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGO	Página 70 de 85

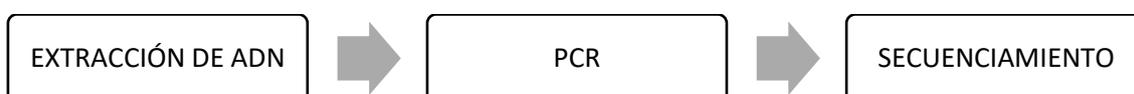
1. Datos Generales

CLIENTE: CARRAZCO

Cantidad de muestras: 2 (Muestra A-H)

Número de secuencias: 2 (1 FORWARD Y 1 REVERSE)

2. Procedimiento general:



- Extracción de ADN: Se realizó a partir de cultivo puro en placa. La concentración de la muestra fue de:

- Fecha: 27/11/19

A: 17.4 ng/μl con calidad de 1.76 en ratio 260/280.

H: 11.3 ng/μl con calidad de 1.84 en ratio 260/280.

- PCR: Se utilizaron cebadores para la amplificación de la región parcial del gen 5.8S ARN ribosomal, la secuencia completa del espacio transcrito interno 2 y la secuencia parcial de la sub

unidad mayor del ARN ribosomal. Secuenciamiento: Tipo SANGER enviado a Macrogen Korea posteriormente analizado utilizando softwares informáticos (MEGA 7.0, BLASTN) descritos por Aime (2006).

3. Imagen (foto de la corrida electroforética de producto amplificado)

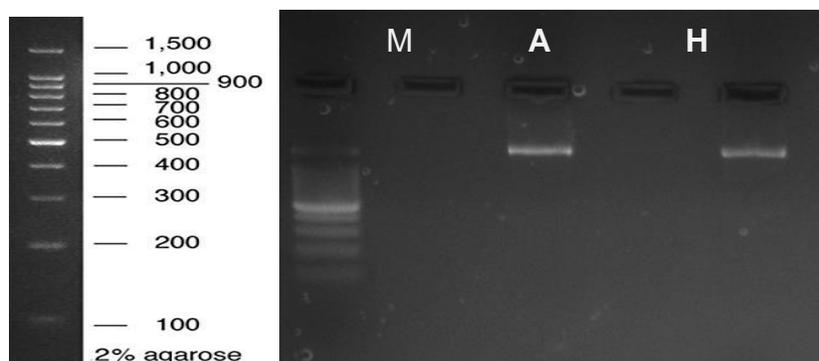


Figura 1. (M) Marcador de referencia, pertenece al marcador empleado de 100bp. (A, H) Muestras analizadas

4. SECUENCIA CONSENSO final

>A – [Hemileia vastatrix](#) – 1016pb

```
TTCATTACATGCCCATGTTCAATTAAGAAACAAGAGCTTCTTACACATTTAAAGT
TTGAGAATAGGTTAAGGATGTTTCATCCCCAAGGCCTCTAATCATTCGCTTTACCTC
ATAAACTGATGTGAGTCTCTGCTATCCTGAGGGAAACTTCGGCAGGAACCAGCTA
CTAGATGGTTCGATTAGTCTTTCGCCCCTATACCCAAATTTGACGATCGATTTGCAC
GTCAGAACCGCTACGAGCTTCCACCAGAGTTTCCTCTGGCTTCACCCTATTCAGGCA
TAGTTCACCATCTTTCGGGTCCCAACATACTTGCTCTTACTCAGTACCTTCATATAA
ATAATTAGGACTGGTCAATGGTGCACCTCATTAAATTTGGATCCCATTACATTCA
CTTTCATTGCGCATGTGAGTTTACCACTCAAATACTTGCAAGCATGTTAGACTCCT
TGGTCCGTGTTTCAAGACGGGTCATTTAAAGCTATTGCACCAACATCCATAGTAAG
AGTGTCAACCATTTTGGTGACCTACTGAAAATCTCTTTCAGCTTACTGTGAATCTC
CTCAATCTTGGGCATTATATATGAAATTCAGGACTATAACACAACCAAAGTTGCTA
CATTTCCCAAACCCTTATCTAACACCCAAAATTGATGTTGGTCTGATAATGCACAGA
ATACACCCTAATAAAAGGCTGAACTGACATTATCAAGTCTAACTTCAAGTGTTTCCC
TTTTAACAATTTACATACTGTTAACTCTCTTTCCAAAGTTCTTTTCATCTTCCCTC
ACGGTACTTGTGCTATCGGTCTCTACCAATATTTAGCCTTAGATGGAATTTACC
ACCCATTTGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTAGAGACTGCTTCATAAAAG
```

CACTGGTAGTCCATATCATTAGACAGGATTCTCACCTTCAATGATGCTGTATTCCAA
 CAGACTTATATATGGTCCAGCACAAGAAAGCACCTCTTCACTTTACAAC

>H- [Hemileia vastatrix](#) – 1016pb

TCTCATTACATGCCCATGTTCAATTAAGAAACAAGAGCTTCTTACACATTTAAAGT
 TTGAGAATAGGTTAAGGATGTTTCATCCCCAAGGCCTCTAATCATTTCGCTTTACCTC
 ATAAAACCTGATGTGAGTCTCTGCTATCCTGAGGGAAACTTCGGCAGGAACCAGCTA
 CTAGATGGTTCGATTAGTCTTTGCCCCCTATACCCAAATTTGACGATCGATTTGCAC
 GTCAGAACCCTACGAGCTTCCACCAGAGTTTCTCTGGCTTACCCTATTCAGGCA
 TAGTTCACCATCTTTGCGGTCCCAACATACTTGCTCTTACTCAGTACCTTCATATAA
 ATAATTAGGACTGGTCAATGGTGCACCTCATTAATTTTGGATCCATTTACATTCA
 CTTTCATTGCGCATGTGAGTTTTACCACTCAAATACTTGCAAGCATGTTAGACTCCT
 TGGTCCGTGTTTCAAGACGGGTCATTTAAAGCTATTGCACCAACATCCATAGTAAG
 AGTGTCAACCATTTTGGTGACCTACTGAAAATCTCTTTCCAGCTTACTGTGAATCTC
 CTCAATCTTGGGCATTATATATGAAATTCAGGACTATAACACAACCAAAGTTGCTA
 CATTTCCAAACCCTTATCTAACACCCAAAATTGATGTTGGTCTGATAATGCACAGA
 ATACACCCTAATAAAAGGCTGAACTGACATTATCAAGTCTAACTTCAAGTGTTTCCC
 TTTAACAATTTACATACTGTTAACTCTCTTTCCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCCTC
 ACGTACTTGTTTGCTATCGGTCTCTACCAATATTTAGCCTTAGATGGAATTTACC
 ACCCATTTTGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTAGAGACTGCTTCATAAAAG
 CACTGGTAGTCCATATCATTAGACAGGATTCTCACCTTCAATGATGCTGTATTCCAA
 CAGACTTATATATGGTCCAGCACAAGAAAGCACCTCTTCACTTTACAAC

5. RESULTADO OBSERVADO EN LA TABLA I.

Tabla 9. Resultados de ID molecular de la muestra A/H

MUESTRA	Especie	Max score	Query cover	% Identidad	ID NCBI (*)
A/H	<i>Hemileia vastatrix</i> voucher BRIP:61233 28S ribosomal RNA	1901	97%	100%	KT199399.1

	gene, partial sequence				
--	-------------------------------	--	--	--	--

* El Código de identificación pertenece a la base de datos del NCBI.

Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Manage Columns Show 100

select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Hemileia vastatrix voucher BRIP:61233 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1901	1901	97%	0.0	100.00%	KT199399.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Hemileia vastatrix 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1692	1692	86%	0.0	100.00%	DQ354566.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Maravalia cryptostegiae voucher BRIP:56898 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1483	1483	97%	0.0	93.11%	KT199401.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Achromidium ichnocarpi voucher BRIP:55634 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1478	1478	97%	0.0	93.01%	KT199393.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Hemileia aff. wrightiae BRIP:57470 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1465	1465	97%	0.0	92.36%	KT199400.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Blastospora smilacis gene for large subunit ribosomal RNA, partial sequence, isolate: US01	1395	1395	98%	0.0	91.20%	LC198776.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Hemileia colombiana strain R221 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1380	1380	98%	0.0	91.01%	EU851165.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Cystospora notelaeae voucher BRIP:58325 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1354	1354	97%	0.0	90.69%	KT199396.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Mikronegeria fuchsiae voucher PDD:97448 internal transcribed spacer 2 and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1336	1336	96%	0.0	90.79%	KX985773.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Mikronegeria fuchsiae voucher PDD:101516 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; i	1336	1336	96%	0.0	90.79%	KX985772.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Mikronegeria fuchsiae voucher PDD:94465 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; ai	1330	1330	96%	0.0	90.70%	KX985771.1

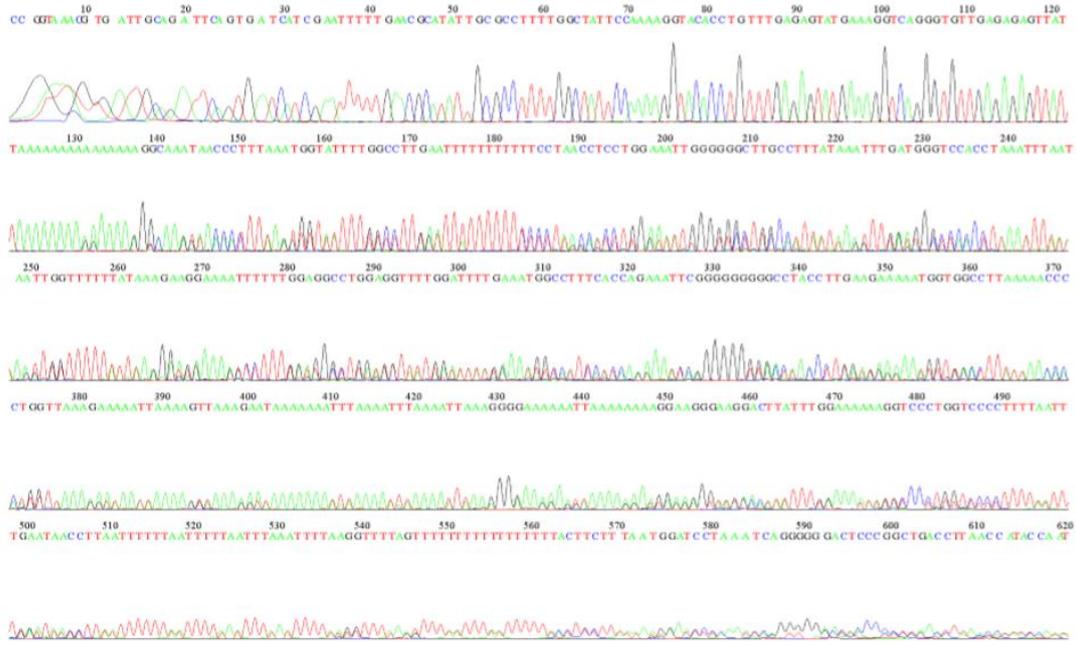
MEDALI HEIDI HUARHUA ZAQUINAULA

44325338

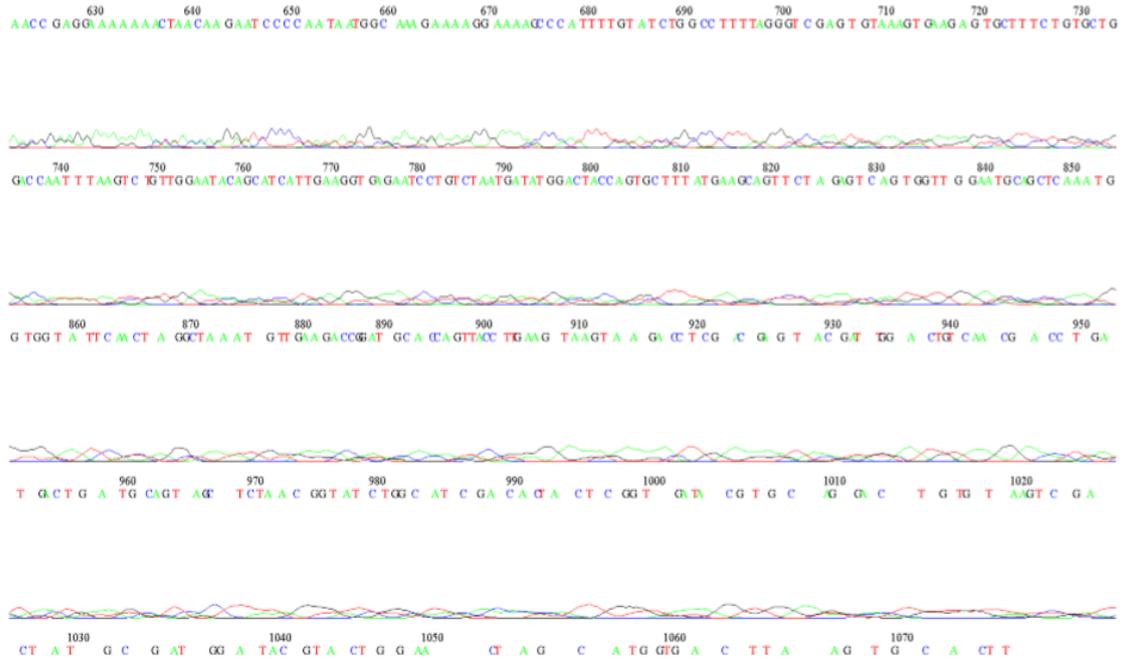
6. ELECTROFEROGRAMAS

Muestra A

File: A_F1.ab1 Run Ended: 2019/12/9 21:34:48 Signal G:2027 A:3183 C:2084 T:5040
Sample: A_F1 Lane: 54 Base spacing: 15.441826 1075 bases in 14872 scans Page 1 of 2



File: A_F1.ab1 Run Ended: 2019/12/9 21:34:48 Signal G:2027 A:3183 C:2084 T:5040
Sample: A_F1 Lane: 54 Base spacing: 15.441826 1075 bases in 14872 scans Page 2 of 2





G GTC ATG AG CTC TGA TT OCAT GCCATG TT CAAT TAA GAAACAAG AGCTTCTTACACATT TAAAGTTT GAGAAT AGGTTAAGG AT GTTTCATCCCAAGGECTCTAAT CATT CGCTTTACCT

CATAAAACTGATGTGAGTCTCTGCTATCCTGAGGGAAACTTCGCGCAGGAACCAAGCTACTAGATGGTTCGATTAGTCTTTGCECCCTATACCCAAATTTGACGATCGATTGCACTCAGAAACCG

CTACGAGCTTCCACAGATTTCTCTGCTTCCCTATTCAAGGATAGTTCACCATCTTTCGGGTCCCAACACTTGTCTTACTCAGTACCTTCAATATAAATAATTAGGACTGGTCAATGGTG

CACCTCATTAAATTTTGGATCCCATTTCATTCACCTTTTCATTGCGCATGTGAGTITTTACCACCTCAAACTACTTGCAGCATGTTAGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGTCAATTAAGGCTAT

TGCACCAACATCCATAGTAAGAGTGTCAACATTTTGGTGAACCTACTGAAAATCTCTTTCAGCTTACTGTGAATCTCCTCAATCTTGGGCATTATATGAAATTCAGGACTATAACACAAAC

AAAGTTGCTACATTTCCCAAAACCTTATCTAAACACCCAAATGATGTTGGTCTGATAATGCACAGAAATACACCCCTAATAAAAAGGCTGAACTGACATTATCAAGTCTAACTTCAAGTGTT

TCCCTTTTAAACAATTTCACTACTGTTAACTCTCTTTTCCAAAGTTCTTTTCACTTTTCCCTCACGGTACTGTTTGTCTGCTCTCACCAAATATTTAGCCCTTAGATGGAAATTTAC

CACCCATT TTTGAGCTGCACTTCCCAACAACCTCGACTCTTAGAGACTGCTTCAATAAAGCCTCAGGTAGTCCATATCATTAGACAAGATTCTCACCCTTCATGATGCTGATTCC

AACAGACTTATATAGGTCACAGCACAGAAACAACCTCTTTCACCTTACAACTCGGCCCTAAAAGGGCCAGATTACAAAAATGGGGCTTTTTCCTCTTCAATTCGCCATTACTAM

GGGGAATCCCTTGTAAATTTCCCTTTTCCCTCCTTATTGAAAGCCTTAAATTCAAAGCGGAAATCCCECCCGGTTTTGAAATCCCTTATAAAAAGAAAGAAAAAATAAAMAA



UNSCH

FACULTAD DE CIENCIAS
AGRARIAS

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

El presidente de la comisión de docentes instructores responsables de operativizar, verificar, garantizar y controlar la originalidad de los trabajos de tesis de la Facultad de Ciencias Agrarias, deja constancia que el trabajo de tesis titulado;

“Prospección, Incidencia e Identificación de la roya del café (*Hemileia vastratrix* Berk. & Broome) Kimbiri-La Convención-Cusco – 2019”

Autor : Robinson Michel Curiñaupa Quispe

Asesor : Guillermo Carrasco Aquino

Ha sido sometido al análisis del sistema antiplagio TURNITIN concluyendo que presenta un porcentaje de 20 % de similitud.

Por lo que, de acuerdo al porcentaje establecido en el Artículo 13 del Reglamento de originalidad de trabajos de investigación de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, es procedente otorgar la Constancia de Originalidad.

Ayacucho, 11 de febrero de 2023

Ing. WALTER AUGUSTO MATEU MATEO

Presidente de comisión

Prospección, Incidencia e Identificación de la roya del café (*Hemileia vastratrix* Berk. & Broome) Kimbiri-La Convención-Cusco – 2019

por Michel Robinson Curiñaupa Quispe

Fecha de entrega: 27-ene-2023 02:02p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2000697725

Nombre del archivo: tesis_curi_aupa.docx (51.6M)

Total de palabras: 15887

Total de caracteres: 88868

Prospección, Incidencia e Identificación de la roya del café (Hemileia vastratrix Berk. & Broome) Kimbiri-La Convención-Cusco – 2019

INFORME DE ORIGINALIDAD

20%

INDICE DE SIMILITUD

21%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

4%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	6%
2	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	4%
3	cybertesis.uach.cl Fuente de Internet	3%
4	repositorio.unas.edu.pe Fuente de Internet	2%
5	repositorio.unap.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr Fuente de Internet	1%
7	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	1%
8	ri.ues.edu.sv Fuente de Internet	1%

9	es.slideshare.net Fuente de Internet	<1 %
10	repositorio.uncp.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
11	biblio3.url.edu.gt Fuente de Internet	<1 %
12	oa.upm.es Fuente de Internet	<1 %
13	agritrop.cirad.fr Fuente de Internet	<1 %
14	www.doccity.com Fuente de Internet	<1 %
15	hal.archives-ouvertes.fr Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo