

**DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL
CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA**

**Área de Diagnóstico Fitosanitario
Laboratorio de Micología**

Protocolo de Diagnóstico:

Hemileia vastatrix
(Roya del cafeto)

Tecámac, Estado de México, Julio 2018

SENASICA nos protege a todos

SAGARPA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD
AGROALIMENTARIA

Aviso

El presente protocolo de diagnóstico fitosanitario fue desarrollado en las instalaciones de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), con el objetivo de diagnosticar específicamente la presencia o ausencia de *Hemileia vastatrix*. La metodología descrita, tiene un sustento científico que respalda los resultados obtenidos al aplicarlo. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada en este documento de referencia pueden derivar en resultados no esperados, por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el protocolo de forma correcta.

La presente versión podrá ser mejorada y/o actualizada quedando el registro en el historial de cambios.

I. ÍNDICE

| | |
|---|----------|
| 1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO..... | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2.1 Información sobre la plaga..... | 1 |
| 2.2 Información taxonómica | 2 |
| 2.3 Flujo de trabajo | 3 |
| 3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN..... | 4 |
| 3.1 Identificación morfológica..... | 4 |
| 3.1.1 Observación directa | 4 |
| 3.1.1.1 Raspado de pústulas..... | 4 |
| 3.1.1.2 Cortes de tejido vegetal con lesiones | 4 |
| 3.2 Descripción morfológica | 5 |
| 3.3 Identificación del hongo | 6 |
| 4. REGISTROS | 6 |
| 5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL..... | 7 |
| 6. RECONOCIMIENTO | 7 |
| 7. REFERENCIAS | 7 |
| 8. ANEXOS | 9 |
| 8.1 Ciclo de vida | 9 |
| 8.2 Signos y síntomas | 10 |
| 8.3 Elaboración de montajes | 10 |
| 8.3.1 Preparaciones temporales con cubreobjetos..... | 10 |
| 8.3.2 Preparaciones temporales con cinta adhesiva | 10 |
| 8.3.3 Preparaciones permanentes | 11 |
| 8.4 Medios de montaje..... | 11 |
| 8.5 Prensado de tejido vegetal | 12 |

II. ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Uredosporas <i>Hemileia vastatrix</i> tomadas en un microscopio óptico..... | 5 |
| Figura 2. Uredosporas de <i>Hemileia vastatrix</i> en un microscopio electrónico de barrido. | 6 |
| Figura 3. Ciclo biológico de <i>Hemileia vastatrix</i> | 9 |
| Figura 4. Síntomas y signos de <i>Hemileia vastatrix</i> en hojas de café..... | 10 |

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Describir la metodología aplicada en el Laboratorio de Micología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria para la detección y diagnóstico de la roya del caféto *Hemileia vastatrix* Berk y Brome.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Información sobre la plaga

El cultivo de caféto (*Coffea arábica* L.) ocupa el segundo lugar en el comercio mundial (Rivillas et al., 2011). Entre los principales problemas fitosanitarios que afectan a este cultivo sobresale la roya causada por el hongo *Hemileia vastatrix* Berk y Brome, que puede ser muy devastadora a nivel mundial (Agrios, 2005).

La roya de caféto es una enfermedad que se encuentra distribuida de manera cosmopolita en todas las zonas donde se cultiva café. Se conoce como único hospedante al género *Coffea* spp.; infecta principalmente a café arábica (*Coffea arabica*) y café robusta (*Coffea canephora*), y posiblemente a otras 25 especies más. Aún no se conocen hospedantes alternos (Arneson, 2000; López, 2005). En México es una plaga clasificada como de importancia económica.

La roya infecta las hojas y causa su caída prematura. Las esporas del hongo son conocidas como uredosporas (Figura 1), éstas se producen en uredias, cuyas pústulas no están cubiertas por una membrana. Bajo condiciones de alta humedad y presencia de agua libre sobre la superficie de la hoja, germinan y penetran a través de las estomas (Figura 2) invadiendo los tejidos internos de la hoja. La expresión de los síntomas requiere de 20 a 40 días a partir de la germinación de las esporas dependiendo de la humedad y temperatura. Una vez que inicia la formación de esporas en las lesiones o manchas, su producción se mantiene activa mientras se mantenga adherida la hoja a la planta (Anexo 8.1) (Agrios, 2005; López, 2005; Baquero, 2013).

En las hojas, inicialmente se manifiesta con la aparición de lesiones de 1 a 3 mm, color amarillo pálido, translúcidas con apariencia aceitosa que al madurar se tornan de color amarillo naranja, aspecto polvoso y contienen las esporas del hongo. Al envejecer, se tornan de color naranja pálido y en el centro de la lesión amarilla surge una mancha de color café marrón o negro con apariencia seca que crece e invade toda la superficie de la lesión. Alrededor de la mancha marrón se forma un anillo de color amarillo donde se producen nuevas esporas del hongo y representa una fuente de infección para otro ciclo de la enfermedad. Las lesiones pueden unirse hasta cubrir la hoja y provocar su caída (Anexo 8.2) (Arneson, 2000; SENASICA, 2017).

2.2 Información taxonómica

Nombre científico: *Hemileia vastatrix* Berk. y Broome, 1869

Sinónimos: No se conocen

Nombres comunes: Roya del cafeto (español)

Coffee rust (inglés)

Clasificación taxonómica:

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Pucciniomycetes

Orden: Pucciniales

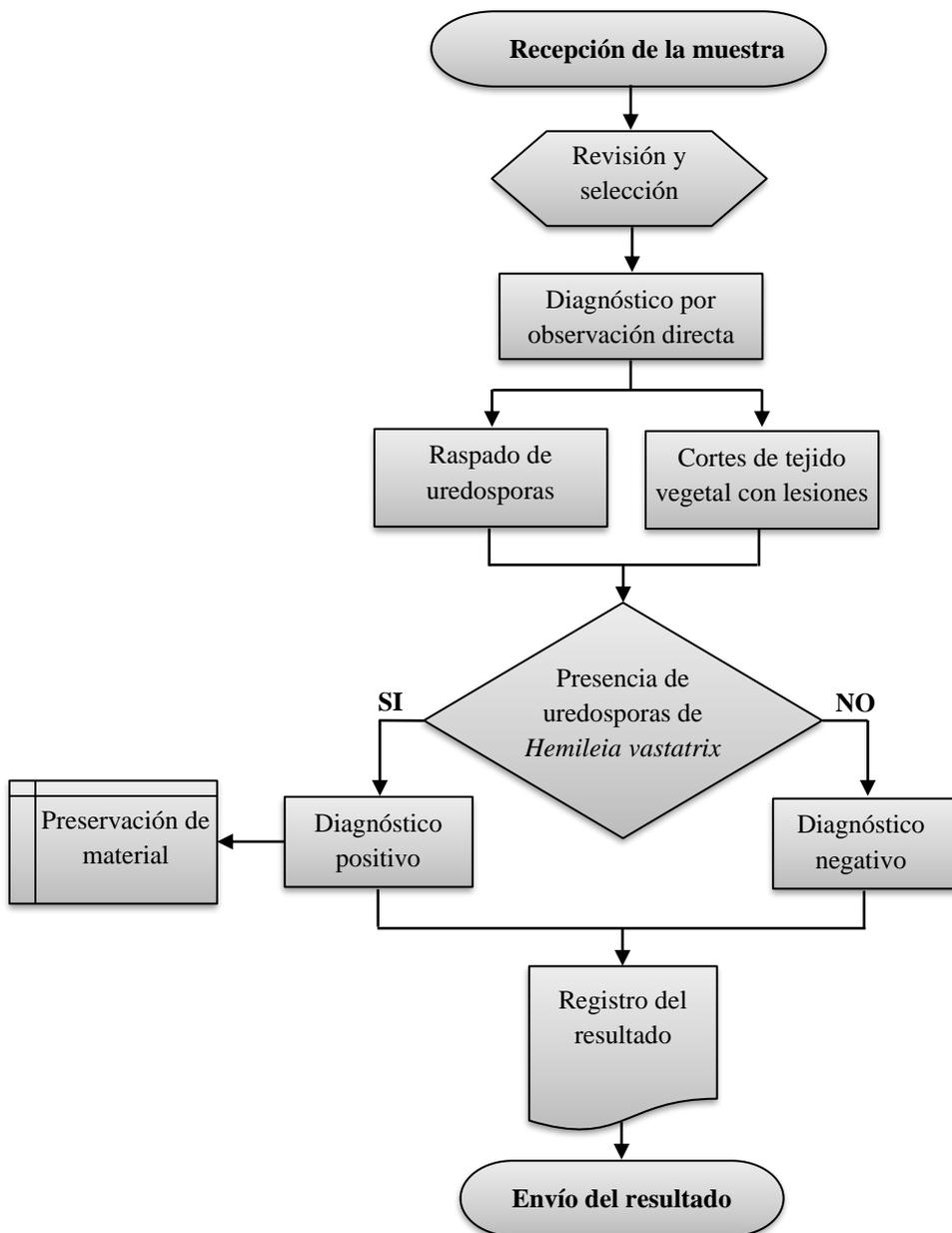
Familia: Mikronegeriaceae

Género: *Hemileia*

Especie: *Hemileia vastatrix*

(Robert et al., 2005; Aime, 2006)

2.3 Flujo de trabajo



3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

3.1 Identificación morfométrica

La muestra que se reciba para el diagnóstico de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*) debe presentar lesiones de color amarillo o naranja en el envés de las hojas (uredosporas) y manchas de color café, sin que el daño se presente en más del 50% de la superficie foliar.

3.1.1 Observación directa

3.1.1.1 Raspado de pústulas

- 1) Observar lesiones de color amarillo pálido a naranja pálido en el envés de la lámina foliar utilizando un microscopio estereoscópico.
- 2) Localizar las uredosporas y con ayuda de una aguja de disección o un alfiler entomológico, raspar sobre la lesión a fin de desprender las esporas del tejido vegetal.
- 3) Realizar preparaciones temporales o permanentes para su observación con un microscopio compuesto (Anexo 8.3).
- 4) Observar las características morfológicas de las uredosporas y obtener las medidas de largo y ancho de al menos 10 esporas.
- 5) Comparar las características morfométricas obtenidas con las reportadas en la literatura de referencia para obtener el diagnóstico (3.2).
- 6) En caso de corroborar las características morfométricas que definen a *H. vastatrix*, realizar montajes permanentes de las estructuras (Anexo 8.3.3).

3.1.1.2 Cortes de tejido vegetal con lesiones

- 1) Con un microscopio estereoscópico, localizar lesiones de color amarillo pálido a naranja pálido por el envés de la lámina foliar.
- 2) Cortar el tejido vegetal en una porción que incluya tejido sano y enfermo. Obtener fragmentos de tejido vegetal con esporas, procurando que no sean mayores a 0.5 mm de espesor a fin de permitir el paso del haz de luz a través del tejido (Figura 1 a).
- 3) Preparar montajes temporales para su observación con un microscopio compuesto (Anexo 8.3).

- 4) Observar las características morfológicas de las uredosporas y obtener las medidas de largo y ancho de al menos 10 esporas.
- 5) Comparar las características morfométricas obtenidas con las reportadas en la literatura de referencia para obtener el diagnóstico.
- 6) En caso de corroborar las características morfométricas que definen a *H. vastatrix*, realizar montajes permanentes de las estructuras.

3.2 Descripción morfométrica

Las uredosporas nacen de forma individual sobre pedicelos equinulados (Figura 1 a y b), son periformes, triangulares, rectas o ligeramente curvas, en forma de pirámide truncada y en ocasiones reniformes, de 25-30 μm de largo por 12-28 μm de ancho (Figura 1 c y d).

Las paredes laterales de las uredosporas que están en contacto con otras uredosporas son lisas y planas, mientras que las paredes libres son convexas y equinuladas, con verrugas cónicas o truncas, de 3 μm a 4 μm de largo (Figura 2) (Duran, 1985).

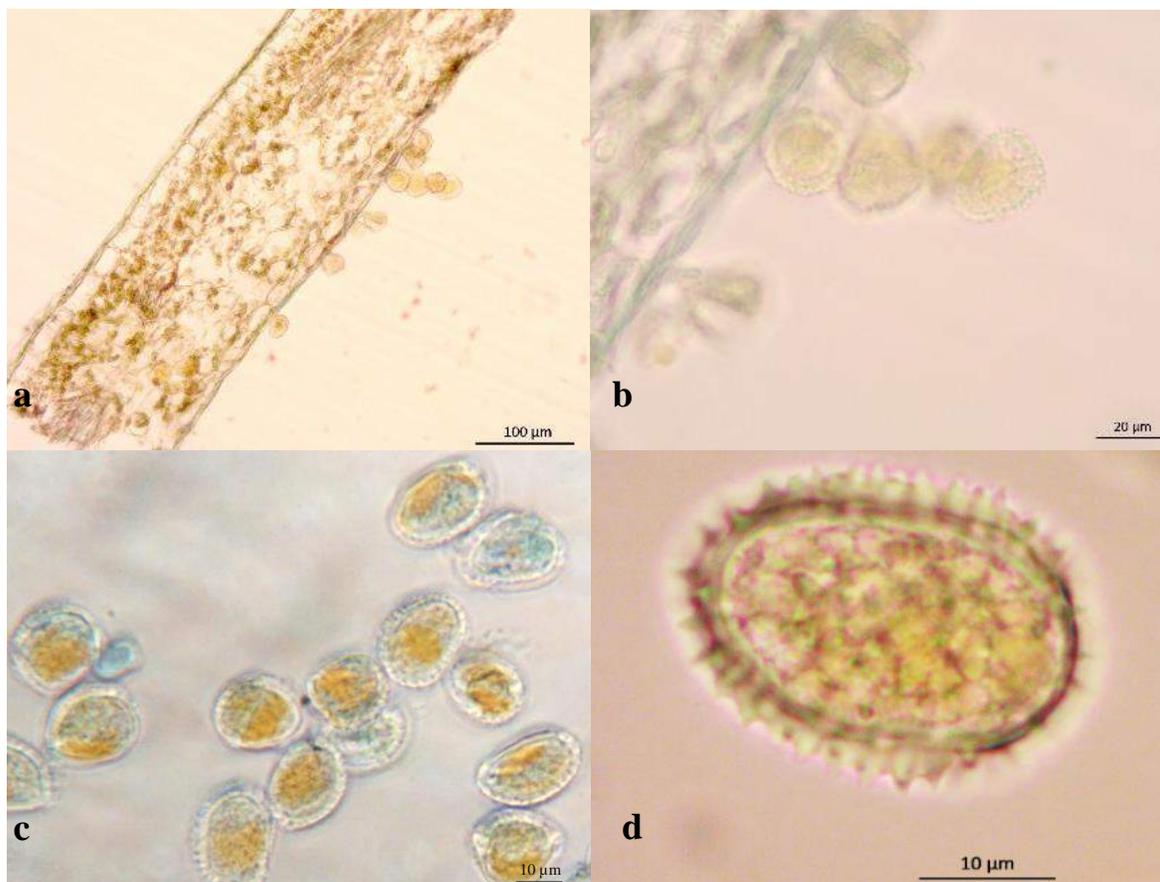


Figura 1. Uredosporas *Hemileia vastatrix* tomadas en un microscopio óptico. a) Corte longitudinal de tejido de hojas de café; b) Uredosporas sobre tejido vegetal; c) Masa de uredosporas; d) Uredospora con equinulaciones. (Créditos: Laboratorio de Micología, CNRF, 2018).

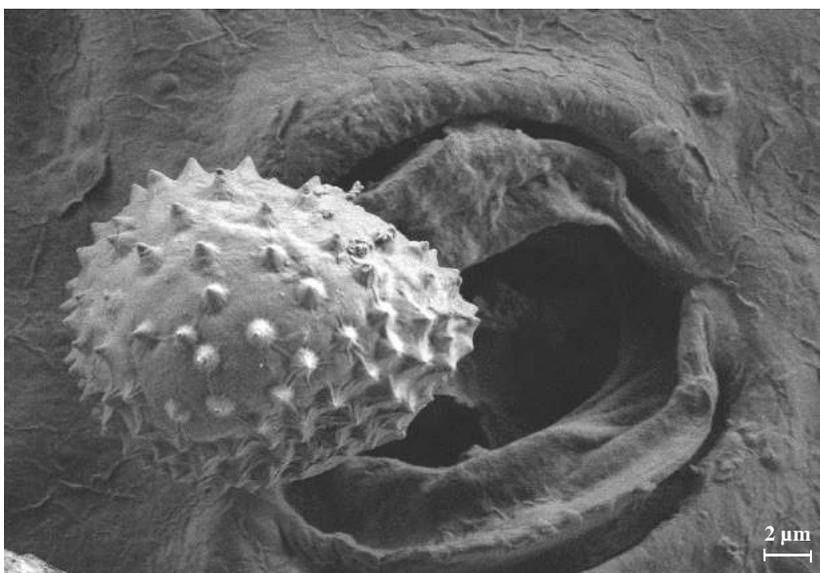


Figura 2. Uredosporas de *Hemileia vastatrix* en un microscopio electrónico de barrido. Mostrando paredes lisas y paredes equinuladas con espinas cónicas sobre el estoma de hoja. (Créditos: Área de Microscopia Electrónica, CNRF, 2015).

3.3 Identificación del hongo

- Para reportar una identificación positiva de *Hemileia vastatrix* es necesaria la observación directa de las uredosporas, ya sea por raspado de pústulas o sobre cortes de tejido vegetal.
- Diagnosticar como negativo, en caso de no encontrar uredosporas con características típicas de *H. vastatrix*.

4. REGISTROS

Mantener el material vegetal que no fue utilizado para el diagnóstico en su empaque original bajo refrigeración a 4 °C, durante al menos 1 mes posterior al diagnóstico.

Almacenar los registros y evidencias del proceso de diagnóstico de *Hemileia vastatrix*.

En caso de obtener un resultado negativo:

- Inactivar y desechar el material vegetal.

En caso de obtener un resultado positivo:

- Seleccionar hojas con síntomas y signos característicos de la roya del café, realizar el prensado (Anexo 8.5) y conservar como material de herbario. Desprender las uredosporas con un alfiler entomológico o aguja de disección y colectarlas en viales.
- Conservar los viales en refrigeración a 4 ± 2 °C.

- Robert, V., Stegehuis, G. & Stalpers, J. (2018). The MycoBank engine and related databases.
Recuperado de: <http://www.mycobank.org/MB/182962>
- Rivillas, C. A., Serna, G. A., Crisanto, A. M. (2011). *La Roya del Cafeto en Colombia. Impacto, manejo y costos del control*. Resultados de investigación. Boletín técnico 36. CENICAFE.
- SENASICA. (2017). *Guía de síntomas y daños de la roya del cafeto (Hemileia vastatrix)*. Programa de Vigilancia epidemiológica Fitosanitaria.

Forma recomendada de citar:

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Protocolo de Diagnóstico: *Hemileia vastatrix* (Roya del cafeto) [Versión 1.0]. Tecámac, México: Autor.

8. ANEXOS

8.1 Ciclo de vida

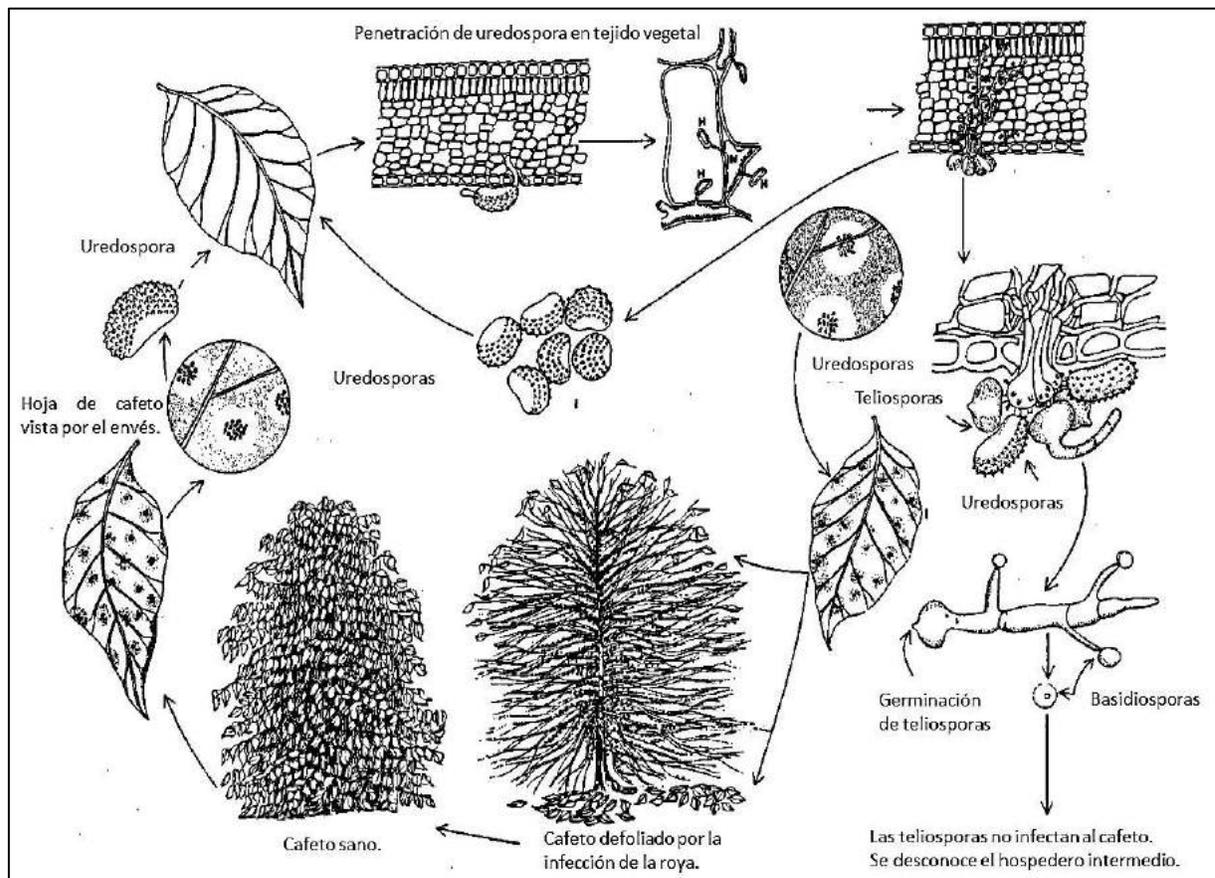


Figura 3. Ciclo biológico de *Hemileia vastatrix*. Agente causal de la roya del cafeto (Agris, 2005).

8.2 Signos y síntomas

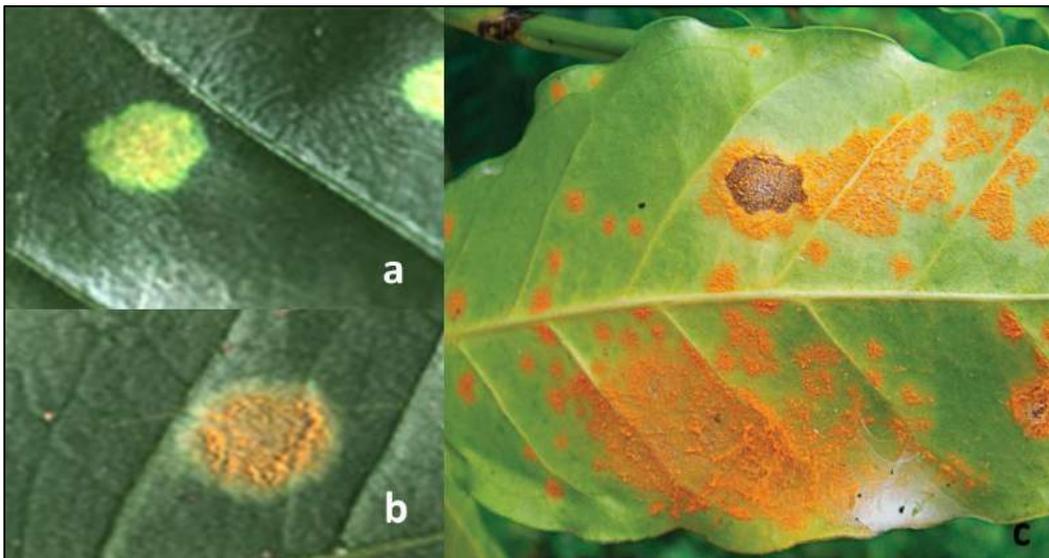


Figura 4. Síntomas y signos de *Hemileia vastatrix* en hojas de cafeto. a) Lesión amarillo pálido, translúcida con apariencia aceitosa; b) Lesión color amarillo de aspecto polvoso por la presencia de uredosporas; c) Mancha en estado avanzado color naranja pálido por la presencia de uredosporas maduras, con el centro café marrón y apariencia seca. (Créditos: Arneson, 2000 y SENASICA, 2017).

8.3 Elaboración de montajes

8.3.1 Preparaciones temporales con cubreobjetos

- 1) Colocar una gota de medio de montaje (Anexo 8.4) en un portaobjetos. Evitar la formación de burbujas de aire.
- 2) Adicionar las estructuras del hongo sobre la gota, con ayuda de una aguja de disección o de un alfiler entomológico.
- 3) Colocar un cubreobjetos sobre la gota y presionar ligeramente.
- 4) Observar las estructuras con microscopio compuesto de la disposición, tamaño, forma y ornamentación.

8.3.2 Preparaciones temporales con cinta adhesiva

- 1) Colocar en un portaobjetos una gota de medio de montaje (Anexo 8.4).
- 2) Con un pedazo de cinta adhesiva transparente tocar con delicadeza y en forma superficial las lesiones para obtener las uredosporas.
- 3) Pegar la cinta sobre el portaobjetos cuidando que las uredosporas queden dentro de la gota.
- 4) Observar en un microscopio compuesto.

8.3.3 Preparaciones permanentes

- 1) Colocar una gota de medio de montaje (Anexo 8.4) en un portaobjetos.
- 2) Adicionar las estructuras del hongo sobre la gota con ayuda de una aguja de disección o de un alfiler entomológico. Eliminar la formación de burbujas con una aguja o calentar el portaobjetos en un mechero o plancha.
- 3) Con ayuda de un sacabocados, formar un anillo de parafina alrededor de la gota del medio de montaje.
- 4) Colocar un cubreobjetos sobre el anillo de parafina y calentar hasta que se derrita la parafina, cuidando que no queden burbujas de aire en la gota.
- 5) Dejar enfriar y observar con un microscopio compuesto.

8.4 Medios de montaje

Lactofenol

| | |
|-------------------|-----------|
| Fenol (cristales) | 20 g |
| Ácido láctico | 20 mL |
| Glicerina | 40 mL |
| Agua destilada | 20 mL |
| Azul de Nilo | 0.1-0.5 g |

Agregar los cristales de fenol y el agua a un recipiente, calentar ligeramente para disolver los cristales, adicionar la glicerina y el ácido láctico, colocar el colorante azul de Nilo agitar hasta que se diluya, agregar colorante hasta obtener la coloración deseada.

Nota: este medio de montaje actúa como solución fijadora y restaura la turgencia del material seco. Es excelente medio para montajes temporales y permanentes.

Agua- glicerina

| | |
|----------------|-------|
| Glicerina | 50 mL |
| Agua destilada | 50 mL |

Consiste en una concentración de 50% de glicerina y adicionar algún colorante como azul de Nilo.

Nota: se utiliza en montajes temporales y permanentes.

Ácido láctico

Ácido láctico
Agua destilada

Se recomienda utilizar en una concentración de 45%. Se puede adicionar algún colorante.

Hidróxido de potasio

| | |
|----------------------|--------|
| Hidróxido de potasio | 40 g |
| Creatina | 0.3 g |
| Agua destilada | 100 mL |

Agregar el KOH a 75 mL de agua, agitando, una vez disuelto, agregar la creatina y aforar a 100 mL.

Nota: este medio restaura la turgencia del material seco, útil cuando se requiere aclarar el material montado.

8.5 Prensado de tejido vegetal

El prensado permite secar el material vegetal para conservar por mayor tiempo las estructuras de hongos como royas. Para ello se requiere una prensa de madera, papel periódico, láminas de cartón liso, liso y corrugado.

- 1) Seleccionar hojas con síntomas de la enfermedad y signos característicos del hongo.
- 2) Colocar una de las tapas de la prensa de madera y sobre esta una lámina de cartón.
- 3) Disponer tres hojas de papel periódico sobre el cartón corrugado.
- 4) Colocar de tres a cinco hojas de la planta sobre papel periódico, cuidando que no se doblen las hojas y cubrir con otra mitad de papel. Acomodar de esta forma todo el tejido vegetal hasta terminar y adicionar tres capas de papel periódico.
- 5) Sobreponer cartón corrugado y cubrir con una lámina de cartón y la otra tapa de la prensa.
- 6) Amarrar la prensa por sus cuatro lados con un cordón, a fin de mantener fijo el material prensado.
- 7) Cuidar conservar la identificación de la muestra durante todo el proceso.
- 8) Cambiar el papel periódico diariamente hasta obtener el secado total del material vegetal.
- 9) Guardar el material preservado en un folder para herbario debidamente etiquetado con los datos de identificación de la muestra.