



CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL  
DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

DIVISIÓN DE EDUCACIÓN

PROGRAMA DE POSGRADO

**Efecto de la sombra de Cashá (*Chloroleucon eurycyclum*) sobre los procesos de colonización, esporulación y dispersión aérea de la roya (*Hemileia vastatrix*) sobre plantas de café (*Coffea arabica*) en la zona de Turrialba, Costa Rica**

Tesis sometida a consideración de la División de Educación y el Programa de Posgrado  
como requisito para optar al grado de

***MAGISTER SCIENTIAE EN***

**Agroforestería y Agricultura Sostenible**

Por

**Alejandro Brenes Loaiza**

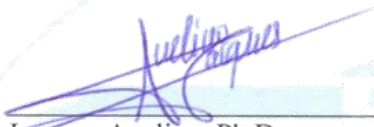
Turrialba, Costa Rica

Año 2017

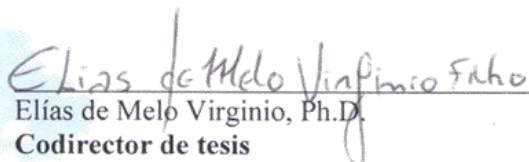
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por la División de Educación y el Programa de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del estudiante, como requisito parcial para optar por el grado de

**MAGISTER SCIENTIAE EN AGROFORESTERIA Y AGRICULTURA SOSTENIBLE**

**FIRMANTES:**



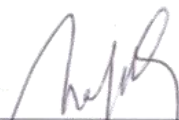
Jacques Avelino, Ph.D.  
**Codirector de tesis**



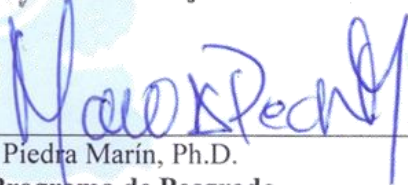
Elías de Melo Virginio, Ph.D.  
**Codirector de tesis**



Fernando Casanoves, Ph.D.  
**Miembro Comité Consejero**



Bruno Rapidel, Ph.D.  
**Miembro Comité Consejero**



Mario A. Piedra Marín, Ph.D.  
**Decano Programa de Posgrado**



Marvin Alejandro Brenes Loiza  
**Candidato**

## **Dedicatoria**

Dedicada primeramente a Dios, y especialmente a mi familia que me ha impulsado a seguir adelante con un apoyo incondicional. A mi madre Maritza Loaiza Edwards y mi padre Marvin Brenes Solano que son el motor de mi vida.

## **Agradecimientos**

Este estudio ha sido posible gracias al apoyo de la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID) a través del Programa Regional de Cambio Climático. Los contenidos y opiniones expresadas aquí no son responsabilidad del Programa Regional de Cambio Climático y no reflejan necesariamente las opiniones de USAID o del Gobierno de los Estados Unidos. CATIE no asume la responsabilidad por las opiniones y afirmaciones expresadas por los autores. Las ideas de los autores no reflejan necesariamente el punto de vista de la institución. Se autoriza la reproducción parcial o total de la información contenida en este documento, siempre y cuando se cite la fuente.

Quisiera expresar mi sincero agradecimiento al Proyecto USAID GDA, al Instituto Texas A & M Borlaug y al World Coffee Research por su valioso apoyo para completar con éxito mi proyecto de investigación. Los objetivos de estos patrocinadores permitieron que mi trabajo abordara las necesidades de la industria regional del café.

Al CATIE por haberme dado la oportunidad de ser parte de su prestigiosa escuela de posgrado.

Al CIRAD (Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Developpement), Francia, por darme la oportunidad de desarrollar mi proyecto de investigación con ellos.

Agradecer al Dr. Jacques Avelino por su apoyo en todo este proceso transmitiéndonos sus conocimientos y estando siempre al servicio del estudiante, siempre con un buen trato y sentido de mejora. Agradecer también a las otras personas de mi comité asesor: Fernando Casanoves, Bruno Rapidel y Elías de Melo, fue un honor y un privilegio para mí haber estado bajo su tutela, grandes profesionales e investigadores.

Agradecer a mi colega y amiga Beatriz Segura pues fue un bastión para mí en todo este proceso, haber trabajado con ella me dejó mucho aprendizaje y una muy bonita amistad.

Un agradecimiento también a todos los colegas de mi promoción 2015-2016 conocí personas increíbles de las cuales aprendí mucho en diferentes aspectos de mi vida, siempre estarán en mi corazón y mi mente.

Agradecer a la Dra. Nelly Vásquez por su cariño, amabilidad y entusiasmo como coordinadora de la maestría de Agroforestería y Agricultura Sostenible.

Agradecer también a Cristina Serrano, Cristian Vargas, Fernanda Segura, Steven y Hugo por su ayuda en la fase de campo de nuestro estudio. A mis amigos por el apoyo incondicional, así como al personal de CATIE desde administrativos, investigadores, conserjes, transporte, seguridad y demás que hicieron que mi estancia fuera mejor.

# Índice General

<b>Introducción</b> .....	1
Objetivo general: .....	3
Objetivos específicos: .....	3
Hipótesis de investigación: .....	3
<b>Marco referencial</b> .....	4
1. El cultivo del café ( <i>Coffea arabica</i> ) .....	4
2. El agente causal de la roya anaranjada del cafeto.....	5
3. Ciclo de vida de la roya anaranjada del café .....	7
4. Epidemiología y factores que la afectan .....	9
4.1. El inóculo primario.....	9
4.2. La lluvia y el rocío.....	10
4.3. Temperatura y altitud .....	10
4.4. La carga fructífera .....	10
4.5. El periodo de cosecha.....	10
4.6. Fertilización y calidad de suelo .....	11
5. Pérdidas en la producción .....	11
6. El efecto de la sombra.....	11
<b>Materiales y métodos</b> .....	14
Ubicación y descripción del área de estudio.....	14
2. Factores en estudio .....	14
3. Caracterización del microclima .....	14
3.1. Estaciones meteorológicas .....	14
3.2. <i>Splashcup</i> .....	16
4. Metodología por proceso para evaluaciones en campo y laboratorio.....	18
4.1. Evaluación del proceso de colonización .....	18
4.2. Evaluación del proceso de esporulación .....	19
4.3. Porcentaje de <i>Lecanicillium lecanii</i> por rama. ....	22
4.5. Evaluación del proceso de dispersión aérea .....	22
Variables de estudio .....	24
5. Análisis estadístico .....	25
<b>Resultados</b> .....	30
1. Caracterización del Microclima.....	30

1.1Energía cinética de las gotas de agua .....	31
2.Colonización .....	32
3.Esporulación e intensidad de esporulación.....	34
4.Dispersión aérea.....	36
<b>Discusión</b> .....	40
1.Proceso de colonización .....	40
2.Esporulación e intensidad de esporulación.....	41
3.Dispersión aérea.....	42
Discusión general.....	44
<b>Conclusiones</b> .....	46
<b>Recomendaciones</b> .....	47
<b>Literatura Citada</b> .....	48

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Representación resumida del ciclo de vida de la roya anaranjada del café; modificado de (Avelino <i>et al.</i> , 2004) .....	2
<b>Figura 2.</b> Morfología de la parte aérea de la planta de café .....	5
<b>Figura 3.</b> Lesiones esporuladas de la roya anaranjada del café ( <i>Hemileia vastatrix</i> ) (A) (A. Brenes), Lesiones esporuladas de la roya del trigo ( <i>Puccinia graminis</i> ) (B) (en.wikipedia.org/wiki/Stem_rust)..	6
<b>Figura 4.</b> Ciclo de vida de la roya del trigo <i>Puccinia graminis</i> . Fuente: (Agrios, 2005) .....	7
<b>Figura 5.</b> Representación del ciclo de vida de <i>H. vastatrix</i> (líneas continuas) y factores que lo afectan (líneas discontinuas). Fuente: Avelino y Rivas (2013). .....	9
<b>Figura 6.</b> Método utilizado para la aleatorización de las trampas Burkard en campo. ....	15
<b>Figura 7.</b> Sensores utilizados con la estación meteorológica Campbell, parcela a pleno sol. ....	16
<b>Figura 8.</b> Descripción de los componentes del <i>splashcup</i> (A) (Scholten et al., 2011). <i>Splashcup</i> colocado en campo (B). ....	17
<b>Figura 9.</b> Metodología para determinar el tamaño de las lesiones de roya. ....	19
<b>Figura 10.</b> Evaluación del proceso de esporulación, hoja de café con lesiones de roya. ....	20
<b>Figura 11.</b> Cuadrícula de conteo de la cámara de Neubauer (A). Conteo de esporas dentro de cada cuadrícula (B), se tomaron en cuenta las que tocaban el límite superior e izquierdo. Las esporas que tocaron el límite inferior y derecho no se contaron. ....	21
<b>Figura 12.</b> Trampa de succión para esporas tipo Burkard®. Fuente: (Merle 2014). ....	22
<b>Figura 13.</b> Esporas de roya capturadas por la trampa Burkard y observadas al microscopio bajo un lente (40X). ....	24
<b>Figura 14.</b> Condiciones microclimáticas (Humedad Relativa, Temperatura y Lluvia) presentadas durante el periodo de muestreo según cada tratamiento. ....	30
<b>Figura 15</b> Energía cinética promedio ( $J/m^2$ ) obtenida baja sombra y a pleno sol.....	31
<b>Figura 16.</b> Tasa de crecimiento diaria según el número secuencial de la foto (foto 1= lesión incipiente, intervalo de una semana entre cada foto) (A).Área promedio de las lesiones en el tiempo (B). Promedio de fotos tomadas a cada hoja presente por semana (C).....	33
<b>Figura 17.</b> Cantidad de uredosporas producidas por rama (A). Intensidad de esporulación (promedio por rama del número de uredosporas por $cm^2$ ) (B) y Promedio por rama del porcentaje del área esporulada parasitada por <i>Lecanicillium lecanii</i> (C). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) .....	35
<b>Figura 18.</b> Área promedio de lesiones infectadas de roya por rama. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) .....	36
<b>Figura 19.</b> Cantidad de uredosporas atrapadas según la hora del día (A). Variables climáticas de HR, Lluvia y Viento Máximo según la hora del día en las fechas de muestreo (B). ....	38
<b>Figura 20.</b> Cantidad de uredosporas capturadas por día, según el tratamiento.....	39

## Índice de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Procesos que conforman el ciclo de vida de la roya anaranjada del café .....	8
<b>Cuadro 2.</b> Posibles efectos de la sombra sobre los procesos de la enfermedad de la roya.....	13
<b>Cuadro 3.</b> Variables de estudio por proceso medido .....	24
<b>Cuadro 4.</b> Coeficientes de correlación de Pearson entre la energía cinética, las horas con lluvia y la lluvia al cuadrado. ....	31
<b>Cuadro 5.</b> Resumen de las variables significativas ( $p>0,05$ ) para cada modelo de dispersión.....	37
<b>Cuadro 6.</b> Efecto de la sombra sobre cada uno de los procesos del ciclo de vida de la roya.....	45



## **Lista de acrónimos, abreviaturas y unidades**

CATIE: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza

CIRAD: Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Developpement, Francia

ICAFE: Instituto del Café de Costa Rica

m.s.n.m: Metros sobre el nivel del mar

MJ: Megajoules

J: Julios (unidades de medida)

USAID: Agencia de los Estados Unidos para el desarrollo Internacional

PRCC: Programa Regional de Cambio Climático

## Resumen

Las epidemias de roya, sobre todo la más reciente producida en 2012 en Centroamérica, México y el Caribe, produjo una gran cantidad de pérdidas en producción y en consecuencia pérdidas económicas. El ataque del 2012 fue generalizado, sin embargo, se notó cierta variabilidad que puede asociarse a diferentes tipos de manejo, tales como la fertilización, las variedades, las aplicaciones de fungicidas y la sombra. En la epidemia del 2012, según técnicos y productores se notó que los cultivos de café bajo sombra aunque tuvieron altas incidencias tanto como a pleno sol, tuvieron una menor defoliación.

La sombra tiene diversos efectos sobre la roya, muchos de ellos opuestos, que interactúan con el ambiente y que son sujeto de controversias, por lo que el balance final de su efecto es difícil de establecer. Para contribuir a entender mejor este efecto se propuso evaluar el efecto de la sombra sobre la roya basándonos en un enfoque por proceso.

Se evaluaron por un periodo de seis meses los procesos de colonización, esporulación y dispersión aérea de la roya sobre las plantas de café bajo dos condiciones, café a pleno sol y bajo sombra de cashá (*Chloroleucon eurycyclum*). El estudio se realizó en el ensayo agroforestal permanente con café establecido por el CATIE, este está compuesto por tres bloques con diferentes combinaciones de tratamientos y manejos. En cada uno de los bloques tuvimos una parcela a pleno sol y otra bajo sombra. El ensayo está ubicado en la zona de Turrialba, Costa Rica, a una altitud cercana a los 600 m s.n.m.

La evaluación del proceso de colonización consistió en seleccionar hojas con lesiones iniciales de roya y tomar una fotografía a la misma lesión cada semana con el fin de conocer el crecimiento en área de la lesión en el tiempo. El área se calculó con el uso del programa ImageJ. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos sol y sombra. Sin embargo, se encontró una mayor área de lesiones bajo sombra debido a que las hojas tienen en promedio un 25% más de longevidad que a pleno sol.

La evaluación del proceso de esporulación consistió en seleccionar cada tres semanas y de forma aleatoria, 6 ramas de café por parcela útil. A estas se le extrajeron todas las hojas con lesiones de roya que posteriormente se llevaron al laboratorio para estimar tanto el área total con lesiones, como la cantidad de esporas que contenía. Se calculó además la intensidad de esporulación que corresponde a la cantidad de esporas encontradas por  $\text{cm}^2$  de lesión esporulada. No se encontraron diferencias significativas de esporulación por rama entre sol y sombra, sin embargo, sí hubo diferencias de intensidad de esporulación, siendo mayor bajo sombra (41.160 esporas/ $\text{cm}^2$  en promedio) en comparación con el pleno sol (30.798 esporas/ $\text{cm}^2$  en promedio). Se vio un aumento de la esporulación cuando aumentaron la frecuencia y cantidad de las lluvias.

La evaluación del proceso de dispersión aérea, consistió en colocar en cada tratamiento y a un bloque a la vez, una trampa de tipo Burkard, a 1,5m de altura. Entre las 11:00 am y las 4:00 pm se registró la mayor cantidad de uredosporas capturadas. Estas horas coinciden con los momentos del día en los que hay una mayor velocidad del viento. Se encontró además que cuando

no llueve, hay una mayor dispersión de uredosporas a pleno sol, mientras que cuando llueve la dispersión es mayor bajo sombra pero durante las horas de la noche. Durante el día no se encontraron diferencias entre los tratamientos cuando llueve.

En conclusión, la sombra interactúa con las condiciones meteorológicas. Es importante mantener la sombra en los cafetales por todos los servicios ecosistémicos que proveen, pero es aún más importante elegir la sombra y manejo adecuados según las condiciones propias de cada lugar para así desfavorecer el desarrollo de la enfermedad

## Abstract

Epidemics of rust, especially the most recent in 2012 in Central America, Mexico and the Caribbean, produced a large amount of production losses and consequently economic losses. The attack of 2012 was widespread; however, there was some variability that may be associated with different types of management, such as fertilization, varieties, fungicide applications and shade. In the epidemic of 2012, according to technicians and producers, it was noted that shade coffee crops, although they had high incidences as much as full sun, had less defoliation.

Shadow has several effects on rust, many of them opposite, interacting with the environment and being subject to controversy, so the final balance of its effect is difficult to establish. To contribute to a better understanding of this effect, it was proposed to evaluate the effect of shade on rust based on a process approach.

The processes of colonization, sporulation and aerial dispersion of rust on coffee plants under two conditions, coffee in full sun and under shade of cashá (*Chloroleucon eurycyclum*) were evaluated for a period of six months. The study was carried out in the permanent agroforestry test with coffee established by CATIE, which is composed of three blocks with different combinations of treatments and management. In each of the blocks we had a plot in full sun and another under shade. The trial is located in the area of Turrialba, Costa Rica, at an altitude of around 600 m s.n.m.

The evaluation of the colonization process consisted in selecting leaves with initial lesions of rust and taking a photograph of the same lesion every week in order to know the growth in area of the lesion over time. The area was calculated using the ImageJ program. No significant differences were found between sun and shade treatments. However, a greater area of lesions under shade was found because the leaves have on average 25% more longevity than in full sun.

The evaluation of the sporulation process consisted in selecting every six weeks and randomly, 6 branches of coffee per useful plot. All leaves with rust lesions were extracted and subsequently taken to the laboratory to estimate both the total lesion area and the amount of spores it contained. The sporulation intensity corresponding to the amount of spores found per cm<sup>2</sup> of sporulated lesion was also calculated. There were no significant sporulation differences per branch between sun and shade; however, there were differences in sporulation intensity, being higher under shade (41,160 spores / cm<sup>2</sup> on average) compared to full sun (30,798 spores / cm<sup>2</sup> on average). An increase in sporulation was seen when the frequency and amount of rainfall increased.

The evaluation of the aerial dispersion process consisted in placing in each treatment and to a block at the same time, a trap of type Burkard, to 1,5m of height. Between 11:00 a.m. and 4:00 p.m., the highest number of uredospores caught was recorded. These hours coincide with the

times of the day when there is a higher wind speed. It was also found that when it does not rain, there is a greater dispersion of uredospores in full sun, whereas when it rains the dispersion is greater under shade but during the hours of the night. During the day no differences were found between treatments when it rains.

In conclusion, shade interacts with weather conditions. It is important to keep the shade in the coffee plantations for all the ecosystem services they provide, but it is even more important to choose the appropriate shade and management according to the conditions of each place, thus disfavoring the development of the disease.

## Introducción

Una de las principales enfermedades que ataca a las hojas de la planta de café es la roya anaranjada del cafeto. Esta fue reportada por primera vez a principios de 1869 en una plantación de la isla de Ceilán, lo que actualmente es Sri Lanka. En ese mismo año el micólogo británico Berkeley describió y nombró el hongo responsable de la enfermedad como *Hemileia vastatrix* (Avelino y Rivas, 2013).

La roya llegó al continente americano (Brasil) en 1970, y a Centroamérica en 1976, en donde por más de tres décadas se logró convivir con ella, básicamente con el uso de fungicidas y materiales genéticos resistentes (McCook, 2009). Sin embargo, se han presentado epidemias fuertes como la de Colombia de 2008 a 2011 y en Centroamérica, México y el Caribe en el 2012 (Cressey, 2013). En Colombia la producción de café se vio reducida considerablemente, un 31% en promedio durante los años de epidemia comparada con el 2007, y en Centroamérica, un 16% en 2013 en comparación con el 2011 y 2012. Todas estas pérdidas han tenido un impacto directo en los medios de vida de las miles de familias de pequeños productores y recolectores (Avelino *et al.*, 2015).

Existen diversos factores que contribuyen a la aparición de estas epidemias de roya, entre ellas están el material genético susceptible utilizado, las edades avanzadas de las plantas y una baja economía de las familias productoras, lo cual se traduce en un mal manejo del cultivo. También se presentaron condiciones meteorológicas favorables para la enfermedad. (Avelino *et al.*, 2015). Las epidemias más grandes presentadas durante los últimos 37 años en Centroamérica y Colombia, han estado asociadas con periodos de baja rentabilidad, por bajos precios del café como en la epidemia del 2012 y 2013 (Centroamérica), o debido al aumento en los costos de los insumos agrícolas como pasó en la epidemia de 2008 a 2011 (Colombia). Una baja rentabilidad del cultivo llevó a un manejo deficiente que dio como resultado un aumento en la vulnerabilidad de las plantas al ataque de plagas y enfermedades (Avelino *et al.*, 2015).

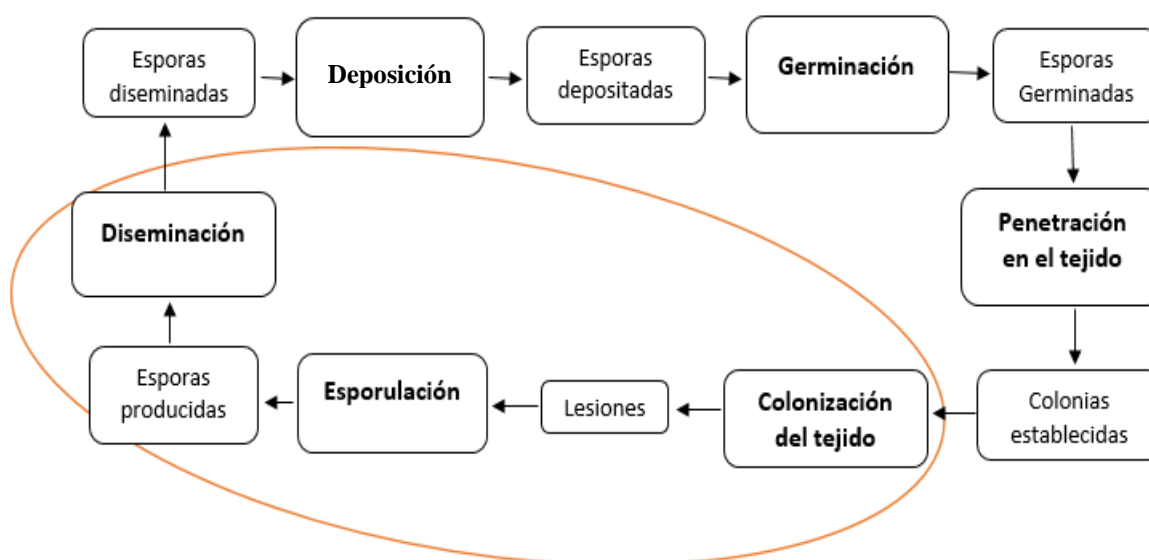
Otro de los factores al que se le ha atribuido estas epidemias severas, fue la amplitud térmica diurna. Se reportó en promedio un aumento de la temperatura mínima en 0,1 °C y una disminución de 0,5 °C en la temperatura máxima en la región de Chinchiná, Colombia de 2008 a 2011 en comparación con los datos climáticos de 1991 a 1994, periodo en el que no hubo roya. En el caso de Centroamérica, se estimó un aumento promedio de 0,9 °C en las temperaturas mínimas y una disminución de 1,2 °C en las temperaturas máximas, en 1.224 fincas de Guatemala en 2012, en comparación con datos climáticos de 1981 a 2010 (Avelino *et al.*, 2015).

El ataque de roya del 2012 fue generalizado a nivel de Centroamérica, México y el Caribe. Sin embargo, se notó cierta variabilidad que puede asociarse con los diferentes tipos de manejo, como las fertilizaciones, las aplicaciones de fungicidas, densidades de siembra, edad de las plantas, variedades, la carga fructífera y la sombra (Avelino *et al.*, 2015). En la epidemia presentada en 2012, según las observaciones empíricas de técnicos y productores, se pudo notar que los cultivos de café bajo sombra, aunque tuvieron altas incidencias de roya tanto como el

pleno sol, tuvieron una menor defoliación, comparado con el pleno sol. El año 2012 presentó periodos secos y altas temperaturas que pudieron ocasionar estrés a los cafetos a pleno sol, se incrementó así el impacto de la roya bajo esta condición. No obstante, los efectos más considerables en la producción de café se vieron reflejados en el periodo productivo siguiente, es decir en el periodo 2013-2014 (Avelino y Rivas, 2013).

La sombra tiene diversos efectos sobre la roya, muchos de ellos opuestos y que interaccionan con el ambiente. El balance final es difícil de establecer y es objeto de controversias. Para comprender mejor los efectos de la sombra, se propuso estudiar aisladamente cada uno de estos efectos sobre cada proceso del ciclo de vida de la enfermedad (Boudrot *et al.*, 2016). Se sabe por ejemplo que la sombra tiende a favorecer los procesos preinfecciosos de la roya en las plantas de café, porque mantiene condiciones de humedad más altas (López *et al.*, 2012). Se sabe también que la sombra interactúa con el viento y la lluvia para el proceso de dispersión aérea, favoreciendo la dispersión cuando llueve presumiblemente por el impacto de gotas de agua con mayor energía cinética sobre las hojas, pero limitando la dispersión cuando no llueve por el intercepción del viento. (Boudrot *et al.*, 2016). Sin embargo, falta documentar el efecto de la sombra sobre los procesos de colonización y esporulación, y confirmar el efecto sobre la dispersión aérea de la roya. Esta tesis se enfocó en el estudio de estos efectos.

La información obtenida a través de este estudio, será útil para identificar las características que debe tener la sombra para dificultar cada uno de los procesos del ciclo de vida de la roya. Esta información ayudará a los técnicos y productores de café a tomar mejores decisiones en cuanto al uso, manejo y recomendación de sombra en los cafetales y así mejorar el control y manejo de la enfermedad. El enfoque de la investigación fue en los procesos de colonización, esporulación y dispersión aérea de la roya (**Figura 1**), En una investigación complementaria se estudió el efecto de la sombra sobre los procesos de deposición, lavado y salpique para completar el ciclo.



**Figura 1.** Representación resumida del ciclo de vida de la roya anaranjada del café; modificado de (Avelino *et al.*, 2004)

### **Objetivo general:**

Entender el efecto de la sombra de Cashá (*Chloroleucon eurycyclum*) sobre la roya anaranjada del café (*Hemileia vastatrix*) basado en un enfoque por proceso y relacionándolo con el microclima.

### **Objetivos específicos:**

1. Evaluar el efecto de la sombra sobre el proceso de colonización de la roya en hojas de café.
2. Evaluar el efecto de la sombra sobre la esporulación y la intensidad de la esporulación de la roya en hojas de café.
3. Evaluar el efecto de la sombra y su interacción con el microclima, sobre el proceso de dispersión aérea de la roya anaranjada del café.
4. Caracterizar el microclima de la zona de estudio bajo condiciones de pleno sol y a la sombra.

### **Hipótesis de investigación:**

1. Existe un efecto de la sombra sobre el proceso de colonización de la roya sobre las plantas de café.
2. Existe un efecto de la sombra sobre la intensidad de la esporulación de la roya sobre las plantas de café.
3. Existe un efecto de la sombra y del microclima sobre el proceso de dispersión aérea de la roya sobre las plantas de café.
4. Existe un efecto de la sombra sobre el microclima.



## Marco referencial

### 1. El cultivo del café (*Coffea arabica*)

El café pertenece al género *Coffea* que está integrado por aproximadamente 100 especies. Sin embargo, únicamente dos de estas se mencionan como cultivadas comercialmente, *Coffea arabica* L., *C. canephora*. A continuación se presenta la clasificación taxonómica del café Arábica:

Clase: *Magnoliata*

Sub-Clase: *Asteridea*

Orden: *Rubiales*

Familia: *Rubiaceae*

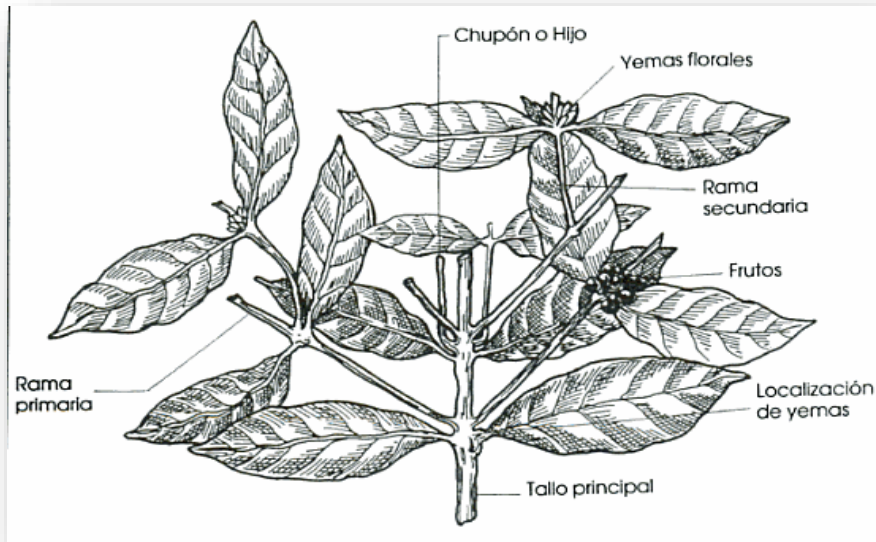
Género: *Coffea*

Especie: *arabica*.

Fuente: (Alvarado y Rojas, 2007)

**1.1. Morfología del café, aspectos generales:** La planta de café puede tener raíces pivotantes, axiales o de sostén, laterales y raicillas. El tallo es leñoso, erecto (**Figura 2**). Este varía entre 2 y 5 m de altura, de acuerdo con el clima, tipo de suelo y la variedad comercial. Las ramas o bandolas son opuestas, alternas y dan origen a las ramas secundarias. La lámina de la hoja mide de 12 a 24 cm de largo por 5 a 12 cm de ancho, variando su forma de elíptica a lanceolada. En las axilas de las hojas se presentan las yemas florales de 1 a 3 ejes. Las yemas están inducidas por días cortos. Permanecen latentes en ausencia de precipitación. Cuando hay humedad suficiente, ya sea de lluvia o riego, se da la floración. Esta permanece por pocos días. (Alvarado y Rojas, 2007).

Después de la fecundación de los óvulos, el ovario se transforma en fruto. Cuando este madura es una drupa elipsoidal en los cultivares comerciales, ligeramente aplanada, cuyos tres ejes principales miden entre 12 y 18 mm de longitud, 8 y 14 mm de ancho y 7 y 10 mm de espesor. Finalmente la semilla cuyo principal componente es el endospermo, contiene un embrión pequeño que mide de 1 a 2 mm. Consta de un hipocótilo y de dos cotiledones yuxtapuestos (Alvarado y Rojas, 2007).



**Figura 2.** Morfología de la parte aérea de la planta de café  
Fuente: (Alvarado y Rojas, 2007).

## 2. El agente causal de la roya anaranjada del cafeto

La roya es causada por el hongo *Hemileia vastatrix*. La principal forma de multiplicación del hongo es la uredospora. Esta es reniforme, equinulada sobre su mitad superior y lisa ventralmente. La roya se clasifica taxonómicamente de la siguiente forma:

Clase: *Basidiomycetes*  
 Subclase: *Teliomycetidae*  
 Orden: *Uredinales*  
 Familia: *Chaconiaceae*  
 Género: *Hemileia*  
 Especie: *vastatrix*

Fuente: (Avelino y Rivas, 2013)

La roya es un parásito obligado que se alimenta de las hojas vivas de las especies del género *Coffea*. A nivel comercial, *C. arabica* es la más atacada. Los primeros síntomas de la enfermedad surgen en el envés de las hojas, por donde ingresa el hongo. Estos se presentan como pequeñas lesiones de color amarillo que con el tiempo se vuelven coalescentes y producen estructuras de reproducción llamadas uredosporas con su característico color anaranjado (**Figura 3(A)**). En la cara superior de las hojas se divisan manchas amarillentas (cloróticas). Finalmente, las lesiones se vuelven necróticas y la hoja se cae de la planta (Avelino y Rivas, 2013).

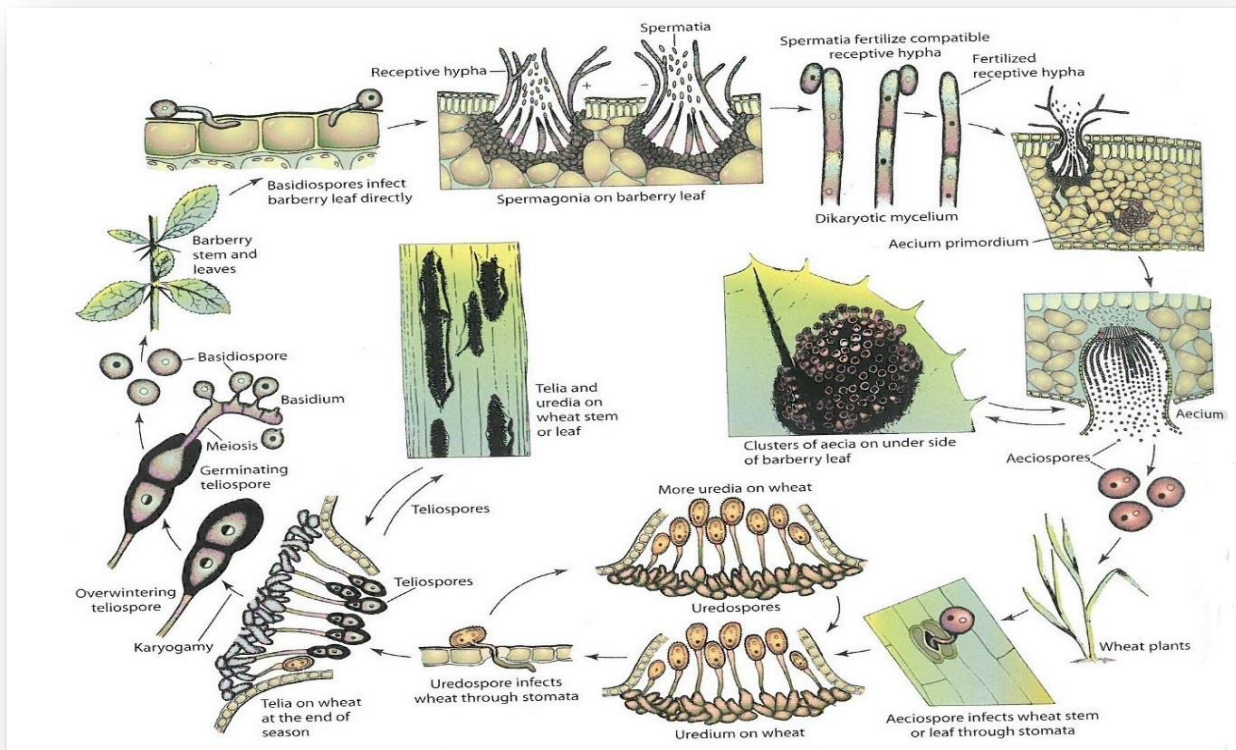
No se ha reportado ningún hospedero alternativo de la roya anaranjada aunque esta disponga de teliosporas y basidiosporas. Se ha demostrado que tanto las teliosporas como las basidiosporas son morfológica y genéticamente poco estables, inviábiles y son vestigios del pasado (Fernandes

*et al.*, 2009). Por lo tanto la roya anaranjada es monoica y simple. Existen sin embargo, royas más complejas. Un ejemplo es la roya del trigo (**Figura 3(B)**), que tiene dos hospederos alternos, el bérbero y el trigo. Se dice que esta roya es heteroica. La roya del trigo es causada por el hongo *Puccinia graminis*, que produce diferentes tipos de esporas tales como teliosporas, basidiosporas, espermacias, ecidiosporas y uredosporas (Agrios, 1998).



**Figura 3.** Lesiones esporuladas de la roya anaranjada del café (*Hemileia vastatrix*) (A) (A. Brenes), Lesiones esporuladas de la roya del trigo (*Puccinia graminis*) (B) (en.wikipedia.org/wiki/Stem\_rust).

A diferencia de la roya del café, la roya del trigo en verano produce teliosporas que caen al suelo y se mantienen en estado de latencia durante la época de invierno. Ya en la primavera se han formado basidiosporas producto de la meiosis. Estas se depositan sobre *Berberis vulgaris*. Posteriormente germinan y originan un micelio primario que emite hifas receptoras. Este micelio atraviesa la hoja, y en el envés se producen ecidios con ecidiosporas color amarillo. Finalmente estas ecidiosporas caen sobre la planta de trigo, germinan y producen uredos de color pardo rojizo. El ciclo de vida de la roya del trigo se puede observar en la (**Figura 4**) (Agrios, 1998).



**Figura 4.** Ciclo de vida de la roya del trigo *Puccinia graminis*. Fuente: (Agrios, 2005)

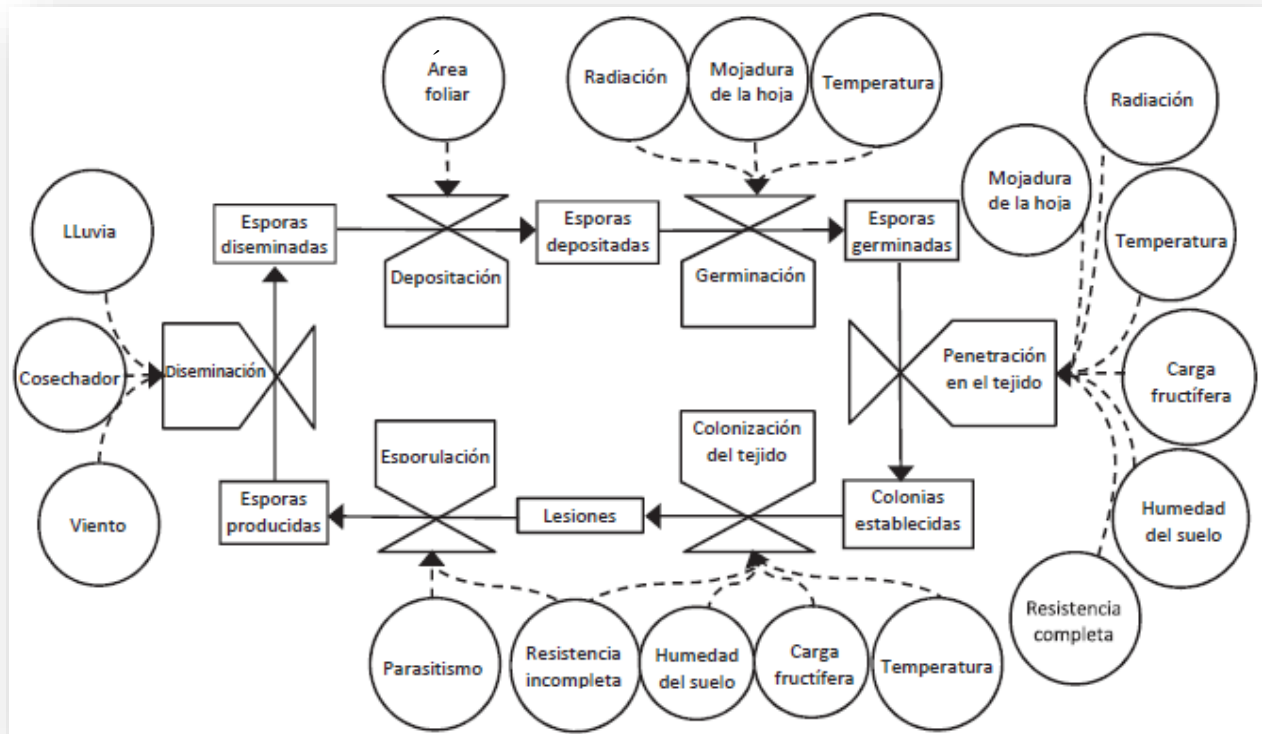
### 3. Ciclo de vida de la roya anaranjada del café

El ciclo de vida de la roya anaranjada del café (**Figura 5**) puede dividirse en las etapas de: diseminación, colonización, penetración, germinación, y esporulación. La diseminación se divide en liberación, dispersión y deposición sobre los órganos por infectar. La germinación constituye el inicio del proceso infeccioso. Cuando se da la penetración del hongo, empiezan a establecerse relaciones tróficas entre el hongo y el hospedero. La colonización del órgano infectado lleva a la formación de los primeros síntomas visuales (Avelino y Rivas, 2013).

El periodo comprendido entre el inicio de la germinación y la expresión de los primeros síntomas, constituye el periodo de incubación. El tiempo transcurrido entre el inicio de la germinación y la esporulación es el periodo de latencia. Este representa la variable más importante (Avelino y Rivas, 2013), ya que cuanto más corto sea, más repeticiones habrá en el año, y más intensa será la epidemia. En el (**Cuadro 1**), se hace una descripción general de los procesos que se llevan a cabo durante el ciclo de vida de la roya anaranjada del café.

**Cuadro 1.** Procesos que conforman el ciclo de vida de la roya anaranjada del café

<b>Proceso</b>	<b>Descripción</b>	<b>Autor</b>
<b><i>Germinación</i></b>	Se produce cuando la espora cuenta con las condiciones climáticas favorables como la presencia de una capa de agua, poca o ausencia de luz y un rango de temperatura entre 16 y 28 °C. Se producen los tubos germinativos que buscan los estomas en el envés de las hojas para penetrar e iniciar el proceso infectivo. Antes de penetrar, los tubos germinativos forman una estructura sobre los estomas llamada apresorio que permite forzar la entrada por los estomas.	Anacafé, 2015
<b><i>Penetración</i></b>	La penetración se da por los estomas bien formados. Es por esto que las hojas muy jóvenes con estomas inmaduros son menos receptivas que las hojas adultas. La receptividad de las hojas a la penetración de la roya anaranjada, varía en función de su carga fructífera. Después de la penetración se establecen las relaciones tróficas entre el hongo y la hoja.	Avelino y Rivas, 2013
<b><i>Colonización</i></b>	Ya en el interior de la hoja, el patógeno desarrolla estructuras llamadas haustorios que entran en contacto con las células de la planta para extraer sus nutrientes y favorecer su crecimiento. Las células parasitadas pierden su coloración natural, apreciándose en las hojas manchas cloróticas que corresponden a los síntomas de la enfermedad.	Anacafé, 2015
<b><i>Esporulación</i></b>	Después de unos 30 días de ocurrida la germinación, el hongo ha alcanzado su maduración, etapa en la que puede diferenciarse a través de la formación de estructuras llamadas soros que son los encargados de producir nuevas uredosporas a razón de 1,600 por milímetro cuadrado del área de la hoja.	Anacafé, 2015
<b><i>Diseminación</i></b>	La diseminación se da por diferentes mecanismos: el agua de lluvia (a corta distancia), el viento (mediana y larga distancias). La dispersión por el agua puede ser en seco por el impacto de las gotas de agua en la cara superior de las hojas, o a través del salpique. La dispersión por el viento es en seco y se da cuando la humedad relativa es baja. La dispersión por las personas es importante durante la cosecha, cuando hay mucho inóculo disponible y muchas personas circulando en las plantaciones.	Avelino y Rivas, 2013



**Figura 5.** Representación del ciclo de vida de *H. vastatrix* (líneas continuas) y factores que lo afectan (líneas discontinuas). Fuente: Avelino y Rivas (2013).

#### 4. Epidemiología y factores que la afectan

La epidemia de roya anaranjada consta de dos fases. La primera consiste en la formación del inóculo primario o inóculo inicial cuya mayor fuente es el inóculo residual conformado por las lesiones necrosadas o latentes llevadas por las hojas del café que sobrevivieron después de la época seca. Este inóculo residual depende por lo tanto de la intensidad de la defoliación y es el responsable del desarrollo inicial de la enfermedad (Avelino *et al.*, 1999). La segunda fase consiste en la repetición del ciclo patológico de la roya anaranjada y la formación del inóculo secundario (Avelino y Rivas, 2013).

##### 4.1. El inóculo primario

Como se mencionó antes la mayor fuente del inóculo primario es el inóculo residual, que a su vez depende de la intensidad de defoliación después de la cosecha. Esta se ve marcada por una serie de factores de estrés como una fuerte producción, un desequilibrio nutricional, una fuerte exposición al sol, un bajo potencial hídrico en el suelo o un periodo extenso de sequía. Las primeras lluvias reactivan la esporulación sobre las lesiones infectadas necrosadas o latentes y se forma el inóculo primario. La cantidad inicial de este inóculo afecta consecuentemente, la precocidad de la epidemia aunque no necesariamente la intensidad de esta. La intensidad de la epidemia depende más de las condiciones que permiten la repetición del ciclo, por lo tanto de la formación del inóculo secundario (Avelino y Rivas, 2013).



## **4.2. La lluvia y el rocío**

La lluvia contribuye al transporte de las uredosporas a corta distancia, y el agua líquida es necesaria para su germinación y hasta la penetración de la hoja. Esto explica que el desarrollo de la epidemia sea durante la época lluviosa, y su descenso se observe en la época seca. Sin embargo, la falta de lluvia no parece ser una limitante para el desarrollo de la epidemia, ya que otras fuentes de agua libre como el rocío, pueden facilitar la germinación de las esporas en ausencia de lluvia (Avelino y Rivas, 2013).

## **4.3. Temperatura y Altitud**

El proceso de germinación de las uredosporas, es muy dependiente de las condiciones de temperatura. La formación del apesorio y la progresión del hongo en la hoja también dependen de esta variable. En los meses en que las temperaturas no son ni excesivas ni demasiado bajas, el periodo de incubación del hongo se puede acortar extremadamente como resultado de estos efectos. Al igual que la temperatura, la altitud también juega un papel importante en el periodo de latencia del hongo. A mayor altitud se encuentran menores temperaturas que alargan este periodo, mientras que los periodos de latencia más cortos ocurren a temperaturas entre los 18 y 28 °C que favorecen la enfermedad (Avelino y Rivas, 2013).

## **4.4. La carga fructífera**

La receptividad de las hojas a la roya anaranjada es mayor, a mayor carga fructífera. El comportamiento bienal de la producción en ocasiones puede conducir a subestimar el efecto de la enfermedad, pues después de un año de mucha cosecha, siempre se espera un año de baja producción, con o sin presencia de la roya (Avelino *et al.* 1993). Según López (2010), existe un efecto positivo de la carga fructífera sobre la incidencia y severidad de la roya, que se refleja en una menor incidencia de la enfermedad en plantas con poca o nula producción, caso contrario en plantas con mucha producción.

## **4.5. El periodo de cosecha**

La receptividad del cafeto pareciera incrementarse no solamente en plantas con una carga fructífera importante sino también en una misma planta a medida que se desarrolla el fruto. Esto se traduce al momento de la recolecta del café por una correspondencia marcada entre el avance de la cosecha y el avance de la epidemia. Se ha notado en México por ejemplo, que el inicio de la epidemia coincidió con el de la cosecha, luego el crecimiento acelerado de la epidemia ocurrió con la cosecha bien establecida y posteriormente el máximo de infección se dio al final del periodo de recolección. Es claro que esto también pudo deberse al movimiento de personas dentro del cafetal que serían dispersores de las uredosporas (Avelino *et al.*, 1999).

#### **4.6. Fertilización y calidad de suelo**

El buen estado nutricional de un hospedero no garantiza una alta resistencia fisiológica a patógenos. La estrategia de infección del parásito es determinante. En el caso de parásitos biotróficos como *H. vastatrix*, que requieren células vivas del hospedero para su propio desarrollo, el efecto de la nutrición es menos claro. Una buena nutrición nitrogenada ha demostrado ser más bien, beneficiosa para este tipo de parásito. La incidencia y la severidad de la roya anaranjada han sido relacionadas con características del suelo, por ejemplo suelos con pH entre 4,7 y 6,5 y con contenidos de materia orgánica inferiores a 3% serían más propensos a la enfermedad (Avelino y Rivas, 2013). En su estudio, Lagos (2014), concluye que los elementos del suelo y la nutrición tienen efectos variados sobre la roya. Algunos la desfavorecen incrementando la resistencia fisiológica y el crecimiento del café (efecto dilución) como el fósforo aplicado al suelo o el potasio, zinc y calcio aplicados foliarmente. Y otros favorecen el crecimiento de la roya mediante un menor crecimiento de las ramas del café como el hierro.

#### **Pérdidas en la producción**

Existe una gran cantidad de conocimiento acumulado sobre la roya anaranjada del café. Sin embargo, no se conocen bien las pérdidas en la producción causadas por la enfermedad. Es claro que la roya puede causar pérdidas primarias, es decir pérdidas inmediatas sobre la producción del año en que se desarrolló la epidemia, como lo sucedido en el 2012-2013. Pero estas han sido evaluadas pocas veces debido posiblemente a que no son tan frecuentes. Las pérdidas en la producción se observan más frecuentemente al año siguiente de la epidemia. Estas pérdidas secundarias tampoco han sido evaluadas con gran precisión y los datos deben tomarse con precaución. Por ejemplo Avelino *et al.* (1993) encontraron en Guatemala pérdidas de producción del 21% en plantas con una infección acumulada de 16% de hojas jóvenes enfermas, en comparación con plantas totalmente sanas. Es decir que por cada acumulado de roya de 1,0% se tiene una pérdida secundaria al año siguiente de la epidemia de 1,3%.

#### **6. El efecto de la sombra**

Los sistemas agroforestales con café representan un ecosistema cuyo fin principal es la producción de café. Puede haber cafetales arbolados simples, con una sola especie arbórea o compuestos en los que se utiliza más de una especie arbórea en el cafetal. Dentro de los beneficios más importantes que brinda la sombra están: fijación de nitrógeno en plantas leguminosas, las raíces de los árboles mejoran la aireación del suelo, la hojarasca y la sombra reducen la presencia de malezas. Además los árboles aportan materia orgánica al suelo, la vida útil de los cafetos es más larga, se modifica el microclima creando sistemas más estables. Finalmente, se promueve el control biológico (que para el caso de la roya se da mediante su hongo antagonista *Lecanicillium lecanii* y se incrementa la biodiversidad en el sistema entre otros beneficios. Por otra parte sin embargo, un mal uso de la sombra puede generar una mayor incidencia de plagas y enfermedades en el café (Rojas *et al.*, 2005).



En el caso de las plantaciones de café a pleno sol, estas reciben una alta radiación solar que es interceptada por su dosel. Esta condición es propicia para lograr altos rendimientos de café en algunos años, pero esto a su vez suprime la productividad del año siguiente. Mientras que el café bajo sombra permite obtener rendimientos anuales más estables debido a que las plantas mantienen una mejor área foliar (Avelino *et al.*, 2004).

Según Avelino *et al.* (2004), en plantaciones de café bajo sombra, cuando por ejemplo la intensidad y duración de la lluvia son bajas, muchas de las gotas de agua podrían no llegar a las plantas de café y de esta forma la liberación y dispersión de las uredosporas se reduciría. Cuando la intensidad y la duración de la lluvia son altas, las copas de los árboles funcionarían como canales que generan gotas más grandes impactando a las plantas de café. Lo anterior produce una energía cinética más alta que a su vez produciría la liberación y dispersión de las uredosporas presentes en las hojas infectadas inicialmente en seco (“*tap and puff*”). Se ha demostrado recientemente por otra parte, que la dispersión en el aire de las uredosporas de roya es efectivamente más importante bajo sombra cuando llueve (Pico, 2014; Boudrot *et al.*, 2016), siendo esto un argumento en favor de un incremento de la energía cinética de las gotas bajo sombra.

La sombra además, puede favorecer el crecimiento de la enfermedad a través del amortiguamiento de las altas temperaturas. Esto posiblemente aumenta la humedad de la hoja produciendo condiciones más favorables para la germinación y penetración de las uredosporas. El sombreado también disminuye la cantidad de luz que llega al café y la reducción de la radiación favorece la germinación de las uredosporas, aumenta la vida útil de hojas y de ese modo la vida útil de las lesiones esporuladas. Finalmente, un aspecto negativo de la sombra sobre la roya, es que reduce la velocidad del viento por lo que disminuye la dispersión de las uredosporas (Avelino *et al.*, 2004).

Los efectos de la sombra sobre la roya anaranjada han sido y siguen siendo controvertidos, algunos autores han mencionado que la sombra incrementa la enfermedad, otros dicen que la reduce, otros que la incrementa dependiendo del tipo de sombra, otros que la incrementa o que la reduce dependiendo de la carga fructífera del café. El balance final de los efectos, frecuentemente opuestos es siempre difícil de establecer y depende de las condiciones específicas en las que se realizaron los estudios (Avelino y Rivas, 2013). En el este trabajo se encontraron algunos efectos positivos, negativos o ambos que puede tener la sombra sobre los diferentes procesos del ciclo de vida de la roya. Otros efectos se observan en el (**cuadro 2**).

**Cuadro 2.** Posibles efectos de la sombra sobre los procesos de la enfermedad de la roya (modificado de Avelino y Rivas, 2013)

Vía de acción	Proceso de la Roya anaranjada afectado	Efecto potencial de la sombra sobre cada proceso a través de la vía de acción indicada	Explicación
Lluvia	Dispersión	+/-	La sombra intercepta las gotas de agua. Cuando la lluvia es poco abundante, el agua no llega al café, no se da la dispersión. Cuando las lluvias son abundantes, la sombra canaliza el agua, forma gotas más grandes con un impacto potencial más fuerte sobre el café.
Viento	Dispersión	-	La sombra intercepta el viento, y reduce la dispersión en seco.
Área foliar	Depositación	+	Si la sombra no es excesiva, el índice de área foliar de café es más alto que al pleno sol. La probabilidad de éxito de la depositación es mayor bajo sombra.
Mojadura	Germinación Penetración	+/-	La sombra conserva el agua libre Procedente de las lluvias en la plantación Bajo sombra, no hay rocío, única fuente de agua libre en días sin lluvia.
Radiación	Germinación	+	La sombra intercepta la radiación y facilita La germinación.
	Penetración	-	La sombra intercepta la radiación y disminuye la receptividad de la hoja de café.
Temperatura	Germinación Penetración Colonización	+	La sombra regula las temperaturas. Sobre todo las temperaturas máximas diarias. Estas se mantienen más cerca del óptimo para la roya.
Carga fructífera	Penetración Colonización	+/-	La sombra reduce el ritmo bienal de la producción Nunca hay producciones muy elevadas o muy bajas.
Humedad del suelo	Penetración Colonización	+	La sombra conserva la humedad del suelo, y favorece la penetración y la colonización.
<i>Lecanicillium lecanii</i>	Esporulación	-	La sombra favorece el micoparásito de la roya

## Materiales y métodos

### Ubicación y descripción del área de estudio

El estudio se realizó de febrero a agosto del 2016 en el ensayo de sistemas agroforestales con café, a largo plazo, en la finca del CATIE que tiene cerca de 16 años de haber sido establecido en Turrialba. El trabajo de laboratorio por su parte, se efectuó en el laboratorio de raíces del CATIE.

El ensayo se ubica entre las coordenadas de 9°53'44'' latitud norte; 83°40'7'' longitud oeste, con una elevación de 600 msnm. En los últimos 10 años se obtuvo un promedio de temperatura de 22,4°C, humedad relativa 90,6%, la radiación solar de 16,6 MJ/m<sup>2</sup>, y la precipitación de 2.928 mm/año. Los suelos se caracterizan como aluviales mixtos, con texturas entre franco y franco-arcilloso (Virginio Filho *et al.* 2002).

El área total del ensayo es de aproximadamente 9.2 hectáreas. Fue establecido en el año 2000 con café Arábica variedad Caturra, con distancias de 2 m entre hileras y 1 m entre plantas, con una densidad de 5.000 plantas/ha. Las especies de sombra estudiadas en este ensayo son: el poró (*Erythrina poeppigiana*), amarillón (*Terminalia amazonia*) y cashá (*Abarema idiopoda/Chloroleucon eurycyclum*). Estas especies solas o en asociación dos a dos da origen a seis tipos de sombras, en contraste con pleno sol, las cuales son combinadas con cuatro niveles de manejo. Lo anterior genera 20 tratamientos en estudio (de 28 combinaciones posibles), dispuestos en tres repeticiones (bloques) (Virginio Filho *et al.*, 2002; Hagggar *et al.*, 2011).

### 2. Factores en estudio

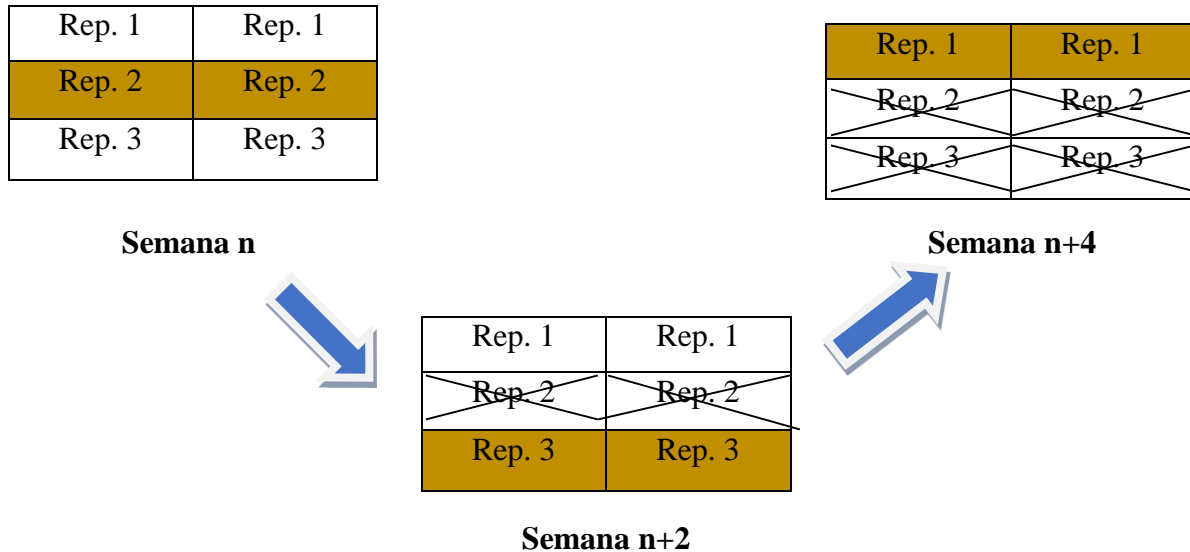
Se estudió únicamente el factor sombra con dos tipos: sombra densa de cashá (*Chloroleucon eurycyclum*) (SC) y café sin sombra (SS). Ambos tratamientos tuvieron tres repeticiones y estuvieron bajo un manejo agrícola determinado como medio convencional, este consiste en una aplicación de 500 kg de 18-5-15, más 180 kg/ha de nitrógeno. El control de malezas se realiza de forma química en las calles y con deshierbas manuales. Se utilizan productos a base de cobre para el control de enfermedades. Las fechas de aplicación fueron: el 8 y 16 de marzo y 14 de junio. En total fueron seis parcelas útiles (unidades experimentales) y cada una de ellas fue de aproximadamente 430 m<sup>2</sup>, compuesta de nueve surcos y 24 puntos de plantas.

### 3. Caracterización del microclima

#### 3.1. Estaciones meteorológicas

Se colocó en cada parcela y en un bloque a la vez, una estación meteorológica Hobo, colocada una en el café bajo sombra y otra a pleno sol. Las estaciones se rotaron cada dos semanas de acuerdo con las parcelas donde se hizo el trampeo de esporas. Mediante una rifa y de forma aleatoria (**Figura 6**), se eligió en cual de los tres bloques irían las dos trampas primero. Luego de transcurridos los tres días de funcionamiento del equipo, se hizo una nueva rifa con los dos

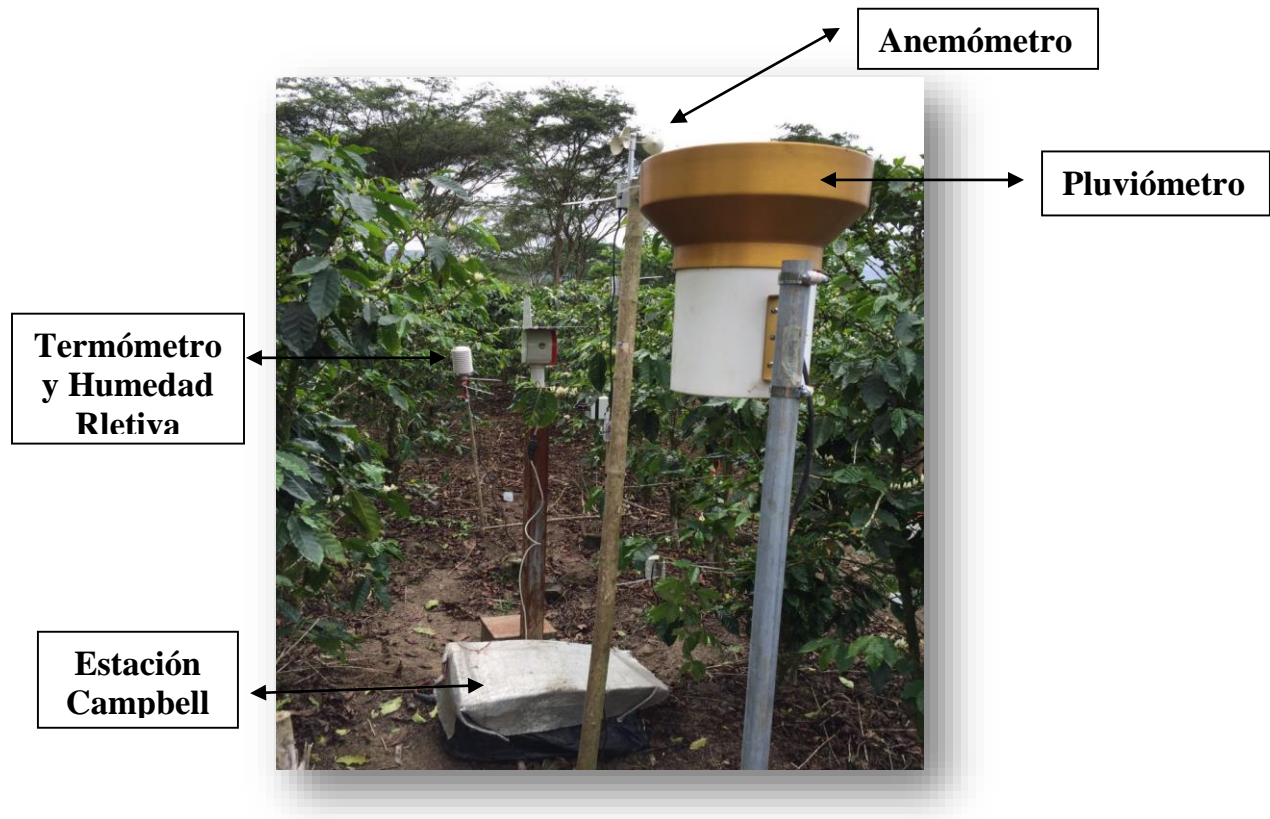
bloques que no fueron muestreados antes, para saber en cual se colocarían trampas en el siguiente periodo de muestreo. Finalmente para la tercera evaluación, las trampas se colocaron en el bloque restante. Una vez completado este ciclo de rotación de las trampas el proceso se hizo de nuevo siguiendo el orden inicial.



**Figura 6.** Método utilizado para la aleatorización de las trampas Burkard en campo.

En cada parcela se instaló un *data logger* (*Hobo weather station*), un sensor mixto que midió la temperatura del aire y humedad relativa. También se colocó un anemómetro para medir las ráfagas de viento. El *data logger* (*Hobo weather station*) fue programado para realizar lecturas cada cinco minutos y registrar un promedio cada 30 minutos. La recopilación de la información se hizo cada 15 días y se utilizó el programa Hobo Ware. Antes de llevar las estaciones al campo, se procedió a elaborar curvas de calibración para ajustar los datos obtenidos.

Por problemas en el funcionamiento de las estaciones Hobo, a partir del 25 de abril se procedió a cambiarlas por estaciones tipo Campbell. Se colocó también con esta estación, un sensor de temperatura del aire y de humedad relativa, un anemómetro para medir las ráfagas de viento. En el tratamiento de pleno sol se colocó además un pluviómetro para medir los milímetros de lluvia. De la misma manera que con la estación Hobo, la estación Campbell se programó para tomar datos cada cinco minutos y hacer un promedio cada 30. Los datos se recolectaron cada 15 días y se procedió a transformarlos con ecuaciones de calibración específicas para los sensores utilizados. Los sensores (**figura 7**) se colocaron sobre estacas a 1m de altura y alrededor del centro de la parcela de muestreo en donde se encontraban las trampas. Los sensores de velocidad del viento y lluvia se colocaron a una altura superior a las plantas de café.



**Figura 7.** Sensores utilizados con la estación meteorológica Campbell, parcela a pleno sol.

### 3.2. *Splashcup*

Como complemento a las estaciones meteorológicas, se colocaron en campo *splashcups* con la misma rotación de tiempo y lugar que las estaciones climáticas. Estos fueron utilizados para medir la energía cinética de las gotas de agua después de un evento de lluvia. Este proceso se evaluó hasta por un máximo de cinco eventos de lluvias en el periodo de dos semanas de evaluación en cada bloque

Los *splashcups* se prepararon previamente en el laboratorio antes de llevar a campo. Este instrumento radica en un matraz de plástico con agua que tiene unido un sistema portador. Este sistema consiste en una taza que contiene arena calibrada con tamaño de partículas entre 125 y 200  $\mu\text{m}$  y con peso conocido. En la parte inferior de la taza se coloca una cubierta de seda que evita la pérdida de arena y garantiza el libre drenaje de agua de la taza para el portador y viceversa. El matraz de plástico y la taza están conectados hidráulicamente por una mecha de algodón (**figura 8 (A)**). Esta permite asegurar el constante contenido de humedad en la arena durante todo el tiempo de medición (Scholten *et al.*, 2011).

Se utilizó una taza numerada que se llenó con arena calibrada. Esta se puso a secar en un horno por 48 horas a 80 °C. Una vez que la arena estuvo seca, se pesó en una balanza analítica y

se anotó su peso inicial en una hoja. Luego de esto, la arena se humedeció y se colocó en el sistema portador que contenía agua y una mecha que mantuvo siempre la arena húmeda. El *splashcup* se llevó a campo y se recolectó después de un evento de lluvia, dejando otro nuevo en su lugar. Se colocaron tres *splashcup* en triángulo para el tratamiento de pleno sol, para sombra se colocaron dos por árbol en cuatro árboles que estuvieran dentro de nuestra parcela de estudio, se colocó un *splashcup* al lado del tronco y el otro justo debajo de donde terminaba la copa. Todos se colocaron en estacas por encima de las plantas de café (**figura 8 (B)**).

La taza con arena recolectada después del evento de lluvia, se llevó al laboratorio con el cuidado necesario para no perder arena. Esta se secó nuevamente por 48 horas a 80 °C y se pesó. La diferencia de peso de la arena seca antes y después de la lluvia, se utilizó para calcular la energía cinética de la gota de agua según la siguiente fórmula:

$$E_c = \text{Sandloss} * 0,1455 * (10,000 / \pi * r^2)$$

donde:

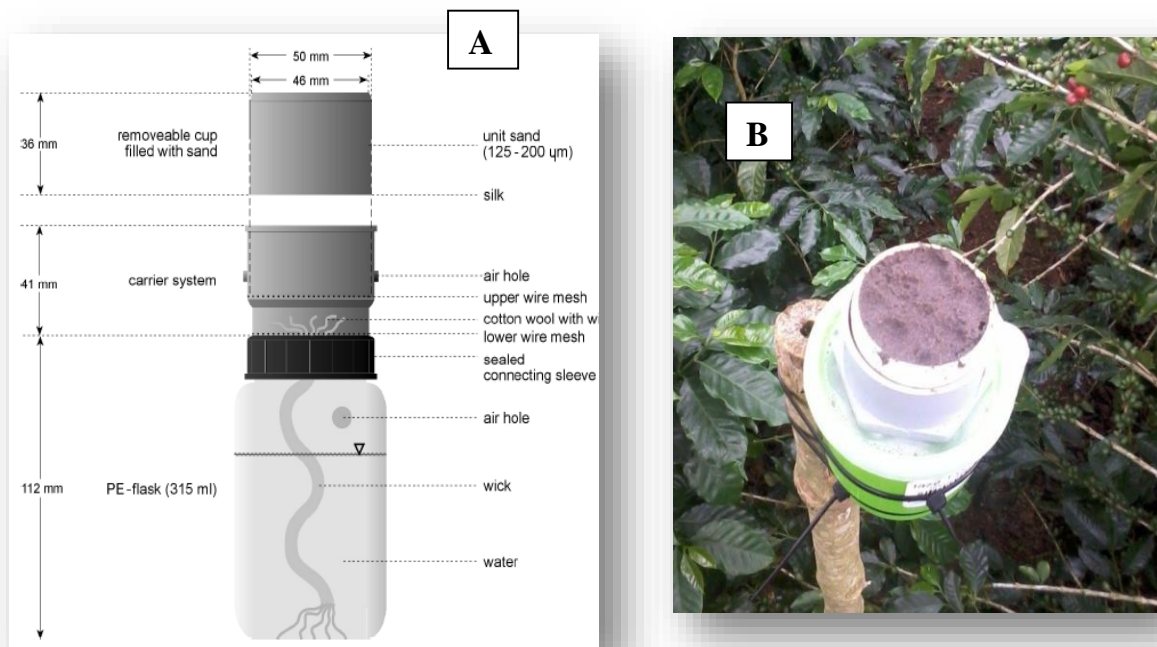
$$E_c = \text{Energía cinética en J/m}^2$$

*Sandloss*= La arena perdida durante la lluvia (en gramos).

$\pi$ = 3,1416 (constante).

$r^2$ = radio del *splash cup* (en cm).

(Scholten et al., 2011).



**Figura 8.** Descripción de los componentes del *splashcup* (A) (Scholten et al., 2011). *Splashcup* colocado en campo (B).

## 4. Metodología por proceso para evaluaciones en campo y laboratorio

### 4.1. Evaluación del proceso de colonización

Para este proceso se calculó el área en cm<sup>2</sup> de una lesión inicial de roya a través del análisis de una fotografía. A esta lesión se le dio seguimiento en el tiempo para conocer su tasa de crecimiento, esto se hizo de la siguiente manera.

De cada parcela útil (6 parcelas en total), se seleccionaron cuatro plantas de café con buena vigorosidad. De cada planta se eligieron tres ramas: parte alta, media y baja. De cada rama se escogió una hoja con pocas lesiones de roya, algunas de ellas incipientes y que estuvieran separadas entre sí. Esto tiene dos propósitos: (i) que las lesiones permanezcan individualizadas durante mucho tiempo y (ii) que la hoja se mantenga viva más tiempo. Una vez seleccionada la hoja, se marcó con una cinta para poder darle seguimiento. Se procedió luego, a tomarle una fotografía semanal a la misma hoja, hasta que esta se cayera de la planta o hasta que la lesión no fuese posible de medir, esto en el caso de que se uniera a otras lesiones cercanas. Cuando esto sucedió, la hoja fue sustituida por otra en la misma rama. En cada fotografía debió salir una regla, esto para que el programa *ImageJ* pudiera establecer la escala y tamaño de la hoja y así poder calcular el área con mayor exactitud. Se tuvo especial cuidado en que la fotografía saliera lo más perpendicularmente posible para no afectar la escala. En total se tomaron 72 fotografías por semana.

Cada fotografía fue identificada por bloque, tratamiento, planta y rama. Posteriormente para poder determinar el área de las lesiones que incluyó el halo clorótico alrededor de la lesión, se utilizó el programa *ImageJ* (**figura 9**). Este programa es compatible con Windows y permite visualizar, editar, analizar, procesar, comprimir, imprimir en escala de grises o a color más de 22 formatos de archivos comunes tales como BMP, PCX, TIF, JPEG. Las funciones de análisis de las imágenes incluyen dimensiones (distancia, ángulo, perímetros, áreas) y mediciones de escalas de grises (puntos, líneas, área de histogramas con estadística) entre otros. En el *ImageJ* también se han incorporado capacidades de interacción que permiten al usuario grabar tareas repetidas y reproducir secuencias de comandos guardados para automatizar el análisis de imágenes (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/intro.html>).

Finalmente la variable a utilizar para el análisis fue la tasa de crecimiento (TC) por día en porcentaje para cada lesión individual, este valor se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\%TC = ((A2 - A1) / (F2 - F1) * A1) * 100$$

donde:

%TC= Tasa de crecimiento

A2= área de la lesión en la fecha 2.

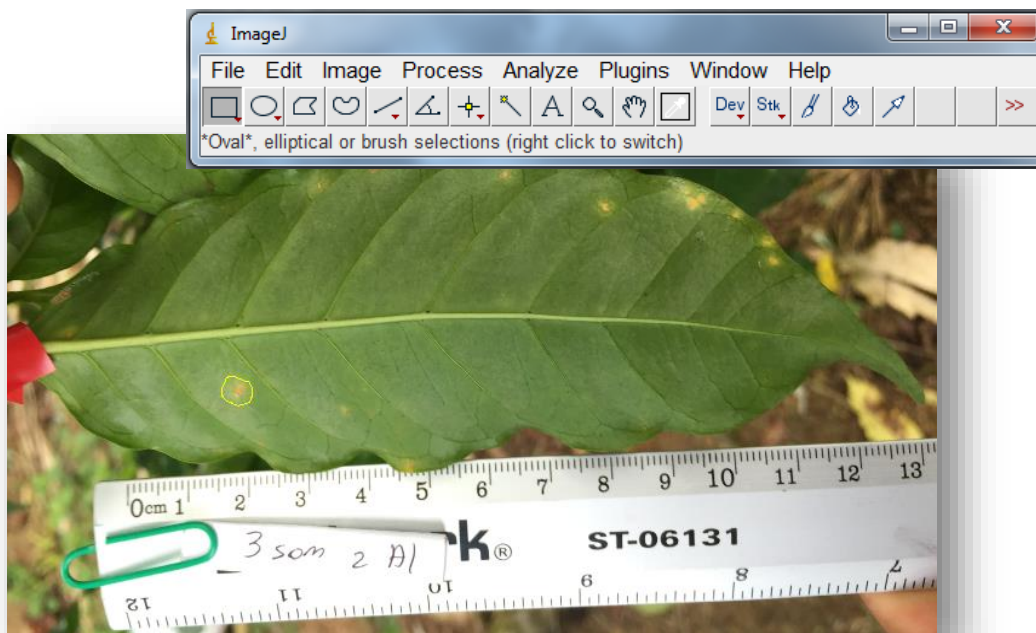
A1= área de la lesión en la fecha 1.

F2= fecha 2.

F1= fecha 1.



Al momento de elaborar la base de datos con la información obtenida, se tuvo presente anotar cuando la hoja se caía y se realizaba el cambio correspondiente, esto para conocer el número de hojas que se analizaron por cada estrato de la planta. De igual forma se anotaron cuantas fotografías individuales se le tomaba a cada hoja.



**Figura 9.** Metodología para determinar el tamaño de las lesiones de roya.

#### **4.2. Evaluación del proceso de esporulación**

Con la evaluación de este proceso se pudo conocer el *stock* de inóculo de roya que había en campo en cada una de las parcelas de estudio. Las evaluaciones para este proceso se realizaron cada tres semanas y consistieron en seleccionar de forma aleatoria seis plantas de café por parcela útil. De cada planta se eligió aleatoriamente una rama de la parte alta, media o baja, de manera que al final contábamos dos ramas de cada estrato de la planta. En algunos casos, se seleccionaron ramas cuyas hojas no tenían lesiones de roya. Una vez elegidas las ramas, se procedió a extraer únicamente las hojas enfermas, estas se almacenaron en bolsas plásticas etiquetadas. Las hojas colectadas se llevaron al laboratorio, posteriormente se fotografiaron en un fondo blanco y con la presencia de una regla (**figura 10**) para poder calcular el área de las lesiones ( $\text{cm}^2$ ) con el programa *ImageJ*. Se calculó el área de las lesiones con roya esporulada, con roya sin esporular y el área con presencia del hongo antagonista de la roya el *Lecanicillium lecanii*, por hoja y rama.

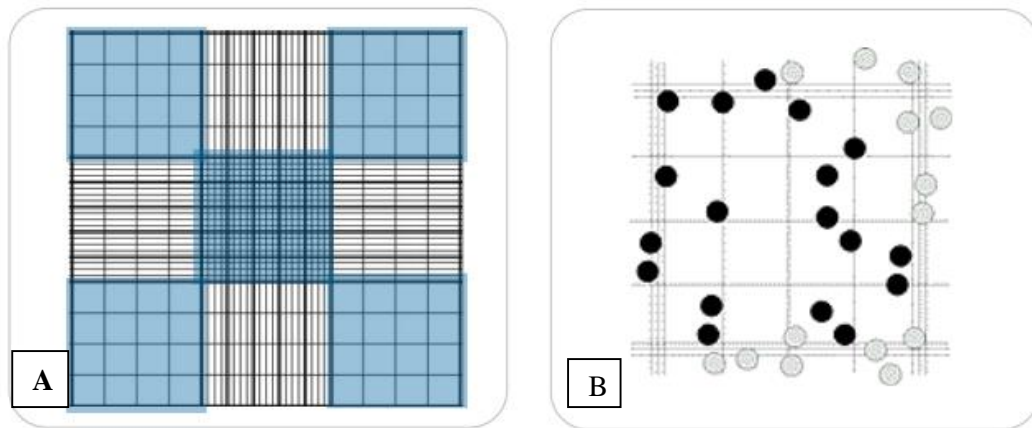




**Figura 10.** Evaluación del proceso de esporulación, hoja de café con lesiones de roya.

Luego se realizó un raspado sobre las pústulas de roya con un bisturí. Lo recolectado se colocó en tubos ependorf de 1.5 ml. Posteriormente, se añadió en cada tubo ependorf 1 ml de agua estéril al 2.5 % de Tween 80. La muestra fue colocada en el ultrasonificador por cinco minutos para romper partículas adheridas. Posteriormente se agitó en un Mixer para homogeneizar la muestra. Para el conteo se tomaron 10  $\mu$ l de la suspensión homogenizada y se colocaron en la cámara de Neubauer (Granados, 2015).

La cámara de Neubauer consiste en una cuadrícula de recuento formada por nueve cuadrados grandes, cada uno de ellos con una superficie de 1 mm<sup>2</sup> y 0,1mm de profundidad (<http://celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>). El cuadrado grande se divide en 16 cuadrados pequeños. El conteo de esporas se realizó en el cuadrado grande central y en cada uno de los cuadrados grandes de las cuatro esquinas (es decir cinco cuadros en total). Se tomó en cuenta las esporas que estaban dentro de cada uno de los cuadrados pequeños y las que estaban tocando parcialmente la parte superior y derecha para los cuadritos exteriores del cuadrado grande (**figura 11**). Se realizaron cuatro lecturas de cada muestra, tomando el promedio de las mismas.



**Figura 11.** Cuadrícula de conteo de la cámara de Neubauer (A). Conteo de esporas dentro de cada cuadrícula (B), se tomaron en cuenta las que tocaban el límite superior e izquierdo. Las esporas que tocaron el límite inferior y derecho no se contaron.

La variable a medir fue la cantidad de esporas totales por rama (por ml) que se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\text{Conteo de esporas} = \frac{\text{Promedio de número de esporas}}{\text{Número de cuadros}} \times 10.000$$

Era de nuestro interés conocer la cantidad de inóculo presente por bloque para cada día específico en el que se colocaron las trampas de dispersión aérea que no necesariamente coincidieron con el día del muestreo para el proceso de esporulación. Por esto se hizo un cálculo para estimar la cantidad de esporas de roya para una fecha específica, de acuerdo con los valores observados en la fecha anterior y la fecha posterior a cada parcela. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$EI = \frac{(F_2 - F_x) * I_1 + (F_x - F_1) * I_2}{(F_2 - F_1)}$$

donde:

EI= Estimación de inóculo.

F<sub>2</sub>= Fecha 2 de muestro para esporulación.

F<sub>x</sub>= Fecha de interés para conocer la cantidad de inóculo (esta fecha debe estar entre las fechas 1 y 2).

I<sub>1</sub>= Cantidad total de inóculo en la fecha 1.

F<sub>1</sub>= Fecha 1 de muestro para esporulación.

I<sub>2</sub>= Cantidad total de inóculo en la fecha 2.

### 4.3. Porcentaje de *Lecanicillium lecanii* por rama.

Se calculó una variable que representó el porcentaje del área con roya esporulada, parasitada por el hongo *Lecanicillium lecanii* (LL) por rama. Esta se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%LL = \frac{ALL}{AT} \times 100, \text{ donde:}$$

$\%LL$  = Porcentaje de *Lecanicillium lecanii*

$ALL$  = Área con *Lecanicillium lecanii* por rama en (cm<sup>2</sup>)

$AT$  = Área total por rama (área con roya esporulada + área con LL en cm<sup>2</sup>)

### 4.4. Intensidad de la esporulación

La intensidad de la esporulación en número de uredosporas por cm<sup>2</sup>, es la relación de la cantidad de inóculo (uredos/ml) dividido entre el área (cm<sup>2</sup>) de las lesiones con roya esporulada por rama.

### 4.5. Evaluación del proceso de dispersión aérea

Para la evaluación de este proceso se utilizó una trampa Burkard que es eficiente para medir la dispersión aérea en condiciones secas, incluso a densidades de esporas aéreas bajas ya que es una trampa de succión. Asimismo, es eficiente cuando las esporas son dispersadas por gotas de agua lo suficientemente pequeñas como para ser transportadas por el aire. Sin embargo, esta trampa es menos adecuada para atrapar esporas que se liberan en gotas gordas durante el salpique y/o cuando hay lluvias fuertes (Evenhuis *et al.*, 1997).

La trampa Burkard (**figura 12**), gira en dirección del viento. Esta funciona mediante succión (10 l/min) y atrapa las esporas suspendidas en el aire. Estas se adhieren a una cinta de 336 mm de largo revestida con vaselina que está fijada a un tambor que gira en función de las manecillas del reloj. Este tipo de trampas se puede programar mediante un panel de control para que el tambor dé una vuelta durante un tiempo determinado, y así conocer la cantidad de esporas capturadas por unidad de tiempo y por volumen de aire (Pico, 2014)



**Figura 12.** Trampa de succión para esporas tipo Burkard®. Fuente: (Merle 2014).

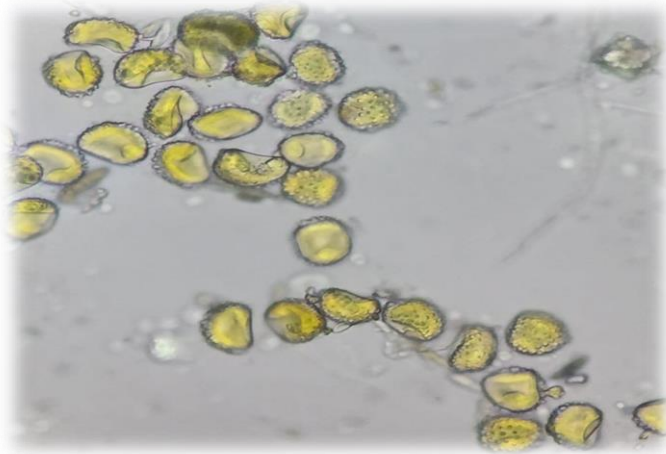
La preparación de la trampa Burkard antes de llevarlas a campo se hizo en el laboratorio, lugar en el cual se colocó una cinta transparente alrededor del tambor que va en el interior de la trampa. Luego sobre la cinta, se le colocó una capa fina de vaselina para que las esporas se quedaran adheridas. Una vez las trampas estuvieron listas se llevaron a campo. Se colocó una para el pleno sol y una bajo sombra en el centro de la parcela de estudio, sobre un poste de metal y a una altura de 1,5m. Estas trampas succionaron las 24 horas, durante tres días consecutivos (martes a viernes). Fueron alimentadas por baterías y su funcionamiento fue de semana por medio.

El panel de control de la trampa se puso sobre la posición 4 días de rotación para que cada medio día (12 horas) correspondiera a un corte de cinta de  $336/8=42$ mm fácilmente manejable bajo el microscopio. La succión de las trampas (10L/min) se verificó diariamente con un medidor de succión. Las trampas estuvieron dispuestas siempre en un mismo bloque. Los bloques se cambiaron cada dos semanas de trampeo de la misma forma que con las estaciones meteorológicas.

Una vez transcurridos los días de muestro, las trampas se quitaron del campo y se llevaron al laboratorio hasta una próxima fecha de evaluación. Se retiró con cuidado el tambor con la cinta y las esporas y se procedió a hacer el conteo correspondiente. Se hicieron 8 cortes de 42 mm de largo de la cinta (bandas) que indicaban 12 horas consecutivas de succión. Cada banda se colocó en un porta objetos teniendo el cuidado de indicar el inicio de la banda (del tiempo) en el porta objeto. Se hizo una observación rápida de la banda con el uso de un microscopio Olympus modelo (CX21 LEDFS1) y con el lente de 10X. Cuando se tuvo la sospecha de que había esporas de roya, se usó el lente 40X. Se identificó que era roya, de acuerdo con su forma reniforme, la presencia de crestas, su tamaño (25  $\mu$ m en promedio) y el color anaranjado (**Figura 13**). Esta observación rápida permitió eliminar las horas o pedazos de banda en los que no hubo ninguna captura.

Cuando se observaron esporas, se ubicó la hora exacta en la que estas fueron capturadas. Para eso se siguió el siguiente procedimiento:

- 1) 12 horas representan 42 mm; esto significa que una hora representa 3.5 mm
- 2) Se usó el objetivo 40 X con el ocular 10 X; cada campo representa 0.5 mm.
- 3) Se inició desde el lado del inicio de la banda (inicio del tiempo) y se movió el porta objeto de 0.5 mm en 0.5 mm hasta llegar al lugar donde se ubican las esporas.
- 4) Se hizo una lectura transversal de toda la banda para cada hora en que se encuentren esporas, o sea 7 campos consecutivos ( $7 \times 0.5 = 3.5$  mm).
- 5) Para cada hora de trampeo se anotó el número de esporas atrapadas, así como si eran esporas solitarias o en grupos (el número en cada caso).



**Figura 13.** Esporas de roya capturadas por la trampa Burkard y observadas al microscopio bajo un lente (40X).

### VARIABLES DE ESTUDIO

A continuación se recapitulan las variables de estudio (**Cuadro 3**) que permitirán explicar cada uno de los procesos que se medirán.

**Cuadro 3.** Variables de estudio por proceso medido

Proceso	Variables explicadas	Otras variables
Colonización	Tasa de crecimiento	Crecimiento de las lesiones (cm <sup>2</sup> ) por día. Posición de la rama muestreada. Hoja. Número secuencial de la foto
Esporulación e Intensidad de esporulación	Cantidad de (uredosporas) por rama. Área de lesiones en cm <sup>2</sup> con roya esporulada.	% del área esporulada con <i>Lecanicillium lecanii</i> por rama. Posición de la rama muestreada. Fecha en días julianos.
Dispersión Aérea (Trampa Burkard)	Cantidad de uredosporas atrapadas por hora.	<i>Stock</i> de inóculo, energía cinética de las gotas, Velocidad máxima del viento por hora, Humedad Relativa por hora, horas secas y horas con lluvia.

## 5. Análisis estadístico

El análisis de la información se hizo mediante el programa estadístico Infostat versión 2016 (Di Rienzo *et al.*, 2015)

### Microclima: Energía cinética de las gotas de agua

**Modelo Estadístico:**  $Y_{ij} = \mu + T_i + L_j + B_k + \epsilon_{ijkl}$

donde:

$Y_{ij}$ : Energía cinética de las gotas de agua

$\mu$ : Media general

$T_i$ : Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento.

$L_j$ : Efecto del  $j$ -ésima lluvia.

$B_k$ : Efecto del  $k$ -ésimo bloque

$\epsilon_{ijk}$ : Es el término de error aleatorio, independiente, y supuestamente distribuido normal con media cero y varianza constante.

Se hizo una correlación de Pearson entre la energía cinética obtenida en cada evento de lluvia, la suma de las lluvias al cuadrado y una variable que llamamos hora que corresponde a la cantidad de horas que llovió durante el día anterior a la recolección del *splashcup*. Esto se hizo para determinar cuales de estas variables estaban más correlacionadas para usarlas en el modelo. Posteriormente se realizó el análisis estadístico mediante modelos lineales generales y mixtos, (Di Rienzo *et al.*, 2011) utilizando como variable de respuesta el logaritmo (mejor ajuste) de la energía cinética. Se declaró como efecto fijo el tratamiento y las covariables hora con lluvia y la suma de las lluvias al cuadrado, como efecto aleatorio se declaró el bloque. Esto para identificar en cual de los tratamientos se obtiene una mayor energía cinética y si hay diferencias entre ellos.

Se evaluó además la multicolinealidad que se dio por la inclusión de las covariables antes mencionadas, se usó el estadístico VIF (factor de inflación de varianza). Con las figuras QQ-plot se evaluó el supuesto de normalidad, mientras que para el caso de la homogeneidad de varianza se utilizaron diagramas de dispersión de residuos versus predichos. Cuando se presentaron modelos con diferentes funciones de varianza heterogénea, se usó criterio AIC y BIC. Para las comparaciones de medias, se usó el prueba de formación de grupos excluyentes DGC con un nivel de significancia de  $p < 0.05$  (Di Rienzo *et al.*, 2015).

## Colonización

**Modelo estadístico:**  $Y_{ij} = \mu + T_i + S_j + P_k + T_i:S_j + T_i:P_k + S_j:P_k + T_i:S_j:P_k + A_m + F_{\tilde{n}} + B_l + \epsilon_{ijklm\tilde{n}}$

donde:

$Y_{ij}$ : Ln de la tasa de crecimiento

$\mu$ : Media general

$T_i$ : Efecto del i-ésimo tratamiento.

$S_j$ : Efecto de la j-ésima semana

$P_k$ : Efecto de la k-ésima posición

$T_i:S_j$ : Es el efecto de la interacción del tratamiento por la semana.

$T_i:P_k$ : Es el efecto de la interacción del tratamiento por la posición.

$S_j:P_k$ : Es el efecto de la interacción de la semana por la posición.

$T_i:S_j:P_k$ : Es el efecto de la interacción triple del tratamiento por la semana por la posición.

$A_m$ : Es es efecto de la m-ésima área

$F_{\tilde{n}}$ : Es el efecto de la  $\tilde{n}$ -ésima foto

$B_l$ : Efecto del l-ésimo bloque

$\epsilon_{ijklm\tilde{n}}$ : Es el término de error aleatorio, independiente, y supuestamente distribuido normal con media cero y varianza constante.

El análisis se hizo mediante Modelos lineales generales y mixtos (Di Rienzo *et al.*, 2011). Utilizando el logaritmo natural (Ln) de la tasa de crecimiento diario como variable de respuesta (mejor ajuste). En el modelo se declararon como efectos fijos, el tratamiento, la semana y la posición de la rama muestreada, así como sus interacciones. Se utilizó como covariable, el área de la lesión en  $\text{cm}^2$  y la foto. Como efectos aleatorios se declaró una variable llamada “sujeto” que identificó independientemente a cada hoja evaluada. Esto se hizo cruzando las variables de: bloque, tratamiento, planta, posición y hoja. Se utilizó un autoregresivo continuo de orden 1 (corCAR1) como correlación, con la variable semana como orden y la variable “sujeto” como criterio de agrupamiento. Con las figuras QQ-plot se evaluó el supuesto de normalidad, mientras que para el caso de la homogeneidad de varianza se utilizaron diagramas de dispersión de residuos versus predichos. Cuando se presentaron modelos con diferentes funciones de varianza heterogénea, se usó criterio AIC y BIC. Para las comparaciones de medias, se usó la prueba LSD Fisher con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

## Esporulación e Intensidad de esporulación

**Modelo estadístico:**  $Y_{ij} = \mu + T_i + D_j + P_k + T_i:D_j + T_i:P_k + D_j:P_k + T_i:D_j:P_k + B_l + \epsilon_{ijkl}$

donde:

$Y_{ij}$ : Esporas por rama o esporas por centímetro cuadrado

$\mu$ : Media general.

$T_i$ : Efecto del i-ésimo tratamiento.

$D_j$ : Efecto del j-ésimo día.

$P_k$ : Efecto de la k-ésima posición

$T_i:D_j$ : Efecto de la interacción del tratamiento con el día.

$T_i:P_k$ : Efecto de la interacción del tratamiento con la posición.

$D_j:P_k$ : Efecto de la interacción del día con la posición.

$T_i:D_j:P_k$ : Efecto de la interacción del tratamiento con el día con el posición.

$B_l$ : Efecto del l-ésimo bloque.

$\epsilon_{ijkl}$ : Es el término de error aleatorio, independiente, y supuestamente distribuido normal con media cero y varianza constante.

El análisis se hizo mediante modelos lineales generalizados mixtos (Di Rienzo *et al.*, 2011), utilizando el mismo modelo tanto para esporulación como intensidad cambiando únicamente la variable de respuesta, esporas/rama para esporulación o esporas/cm<sup>2</sup> de área esporulada para la intensidad. Se declararon como efectos fijos el tratamiento, la posición de las ramas muestreadas y los días de muestreo en días julianos, como efectos aleatorios el bloque, bloque por tratamiento y bloque por tratamiento por posición. Se utilizó una distribución de Poisson con log como familia. Con las figuras QQ-plot se evaluó el supuesto de normalidad, mientras que para el caso de la homogeneidad de varianza se utilizaron diagramas de dispersión de residuos versus predichos. Cuando se presentaron modelos con diferentes funciones de varianza heterogénea, se usó criterio AIC y BIC. Para las comparaciones de medias, se usó la prueba de formación de grupos excluyentes DGC con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

## Área infectada por rama con lesiones de roya

**Modelo estadístico:**  $Y_{ij} = \mu + T_i + D_j + P_k + T_i:D_j + T_i:P_k + D_j:P_k + T_i:D_j:P_k + B_l + \epsilon_{ijkl}$

donde:

$Y_{ij}$ : Variable de respuesta

$\mu$ : Media general.

$T_i$ : Efecto del i-ésimo tratamiento.

$D_j$ : Efecto del j-ésimo día.

$P_k$ : Efecto de la k-ésima posición

$T_i:D_j$ : Efecto de la interacción del tratamiento con el día.

$T_i:P_k$ : Efecto de la interacción del tratamiento con la posición.

$D_j:P_k$ : Efecto de la interacción del día con la posición.

$T_i:D_j:P_k$ : Efecto de la interacción del tratamiento con el día con el posición.



$B_i$ : Efecto del  $i$ -ésimo bloque.

$C_{ijkl}$ : Es el término de error aleatorio, independiente, y supuestamente distribuido normal con media cero y varianza constante.

El análisis se hizo mediante modelos lineales generales y mixtos (Di Rienzo *et al.*, 2011). La variable de respuesta fue el Ln del área total de lesiones infectadas por rama, que resulta de la suma del área con lesiones de roya esporulada y sin esporular. Se declararon como efectos fijos el tratamiento, la posición de las ramas muestreadas y los días julianos, como efectos aleatorios el bloque. En heteroscedasticidad se aplicó un varIdent para posición, días y tratamiento, esto debido a la variabilidad en estos datos. Con las figuras QQ-plot se evaluó el supuesto de normalidad, mientras que para el caso de la homogeneidad de varianza se utilizaron diagramas de dispersión de residuos versus predichos. Cuando se presentaron modelos con diferentes funciones de varianza heterogénea, se usó criterio AIC y BIC. Para las comparaciones de medias, se usó la prueba de formación de grupos excluyentes DGC con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

### Dispersión aérea

**Modelo estadístico General:**  $Y_{ij} = \mu + T_i + I_j + H_k + R_m + V_n + L_{\tilde{n}} + B_p + C_{ijkmn\tilde{p}}$

Donde:

$Y_{ij}$ : Variable de respuesta esporas capturadas/hora.

$\mu$ : Media general

$T_i$ : Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento

$I_j$ : Efecto del  $j$ -ésimo inóculo

$H_k$ : Efecto de la  $k$ -ésima Hora

$V_n$ : Efecto de la  $n$ -ésima Velocidad Máxima del viento

$L_{\tilde{n}}$ : Efecto de la  $\tilde{n}$ -ésima Lluvia

$B_p$ : Efecto del  $p$ -ésimo bloque

$R_m$ : Efecto de la  $m$ -ésima Humedad Relativa

$C_{ijkmn\tilde{p}}$ : Es el término de error aleatorio, independiente, y supuestamente distribuido normal con media cero y varianza constante.

Para el análisis de estos datos se elaboraron cuatro modelos estadísticos, primero separando los datos para las horas del día (de 7:00am a 7:00pm) y las horas de la noche (de 7:00pm a 6:00am). Luego cada uno de estos periodos se separó a su vez en horas secas y horas con lluvia, esto se hizo haciendo una distinción para las horas del día en las que llovió una cantidad igual o mayor a 0,1mm (horas con lluviosa) y cuando llovió menos de esa cantidad o no llovió del todo (horas secas). Finalmente se hizo un modelo para día con lluvia y día sin lluvia, también para noche con lluvia y noche sin lluvia.

El análisis se hizo mediante modelos lineales generalizados y mixtos (Di Rienzo *et al.*, 2011), la variable de respuesta para todos los modelos fue la cantidad de esporas atrapadas por hora. Como efectos fijos se declararon, el tratamiento, y las covariables (*stock* de inóculo, la hora de trampeo, la velocidad máxima del viento y la lluvia). Estas variables de clima, el inóculo y la

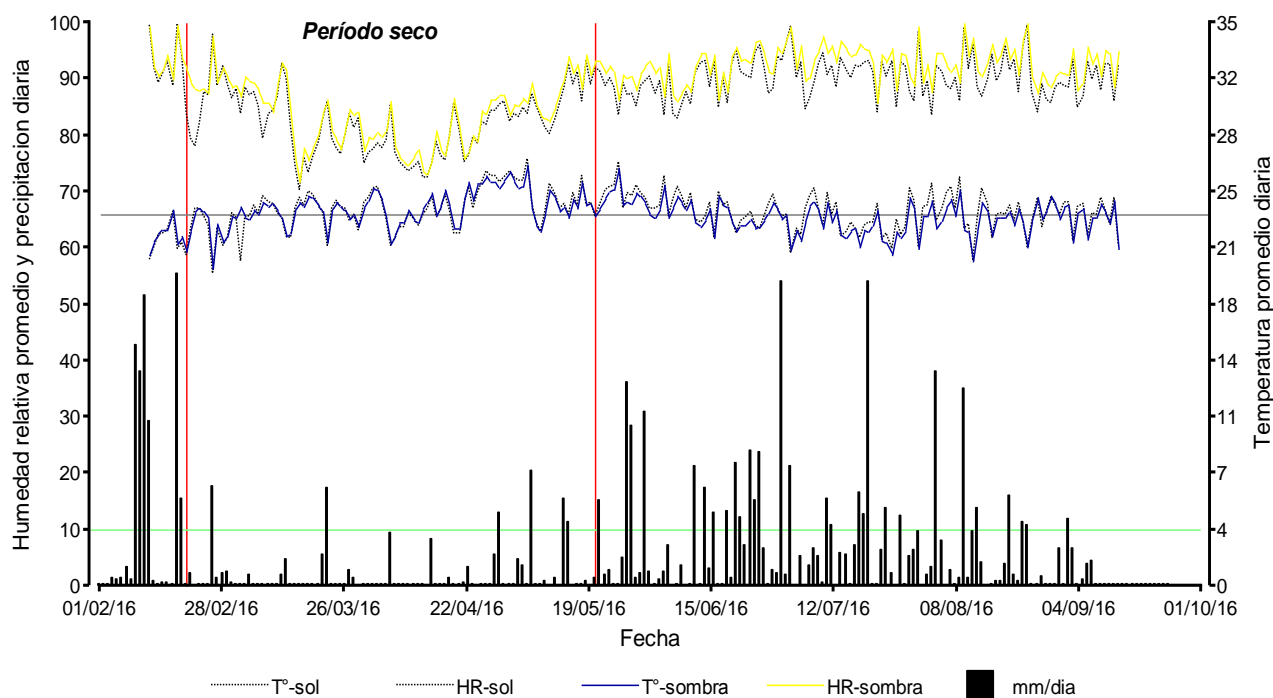
hora, corresponden a la hora y día de las capturas en campo. Como efectos aleatorios se declararon: El bloque, la semana y el día de trampeo en esa semana, es decir si era el día uno, dos o tres. Se utilizó una distribución de Poisson con log como familia que es adecuada para análisis de conteos. Con las figuras QQ-plot se evaluó el supuesto de normalidad, mientras que para el caso de la homogeneidad de varianza se utilizaron diagramas de dispersión de residuos versus predichos. Cuando se presentaron modelos con diferentes funciones de varianza heterogénea, se usó criterio AIC y BIC. Para las comparaciones de medias, se usó el prueba LSD Fisher con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

# Resultados

## 1. Caracterización del Microclima

En la **Figura 14** se observan los promedio diarios de las variables microclimáticas de humedad relativa (HR), Temperatura del aire y la lluvia que se presentaron durante los 7 meses de toma de datos y muestreo en campo para cada uno de los tratamientos. La HR bajo la sombra (línea continua color amarillo) siempre fue mayor o igual que a pleno sol (línea punteada color negro). Mientras que para el caso de la temperatura, se observa que a pleno sol (línea punteada color negro) fue mayor que bajo sombra (línea continua color azul) prácticamente durante todo el periodo de muestreo.

Si relacionamos esta información de HR y temperatura con la cantidad de lluvia que cayó, se observa que cuando hay una mayor precipitación, la HR aumenta y la temperatura disminuye. Mientras que se da el efecto contrario cuando se da un periodo sin lluvias, pues la HR disminuye pero la temperatura del aire tiende a aumentar.



**Figura 14.** Condiciones microclimáticas (Humedad Relativa, Temperatura y Lluvia) presentadas durante el periodo de muestreo según cada tratamiento.

La temperatura del aire máxima se registró el 28/04/2016 y fue de 36,80°C a pleno sol, mientras que la máxima bajo sombra ese mismo día fue de 34,3°C. La línea horizontal color gris en la figura representa el rango de temperatura óptimo para la roya que es de 23°C. El periodo de lluvias aumentó a partir del mes de mayo. Es importante destacar que el estudio abarcó un periodo mayormente seco al inicio (de febrero a mayo) donde las lluvias diarias pocas veces superaron los 10mm de precipitación (línea horizontal color verde).

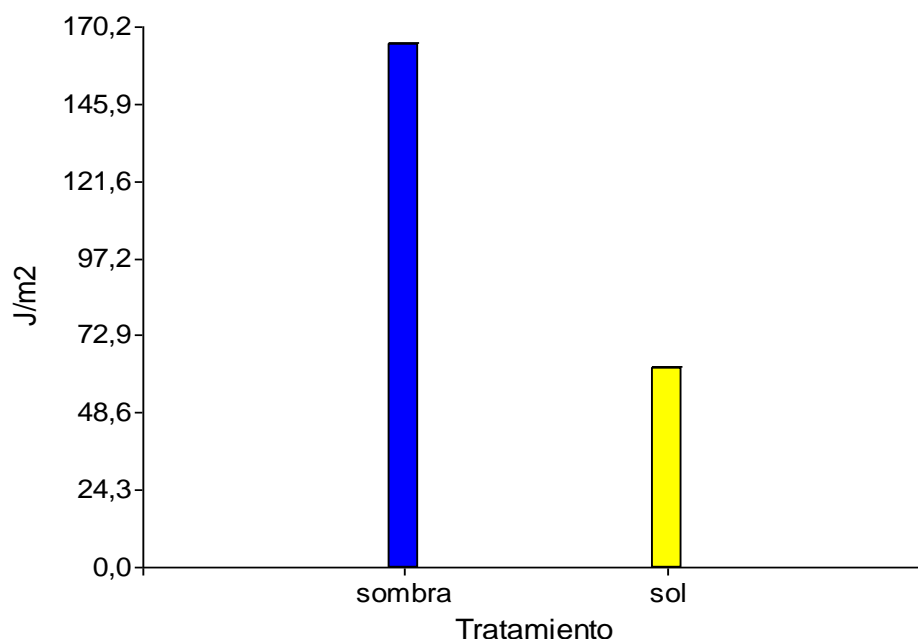
## 1.1 Energía cinética de las gotas de agua

El periodo de evaluación fue del 27/05/2016 al 08/09/2016. A continuación se muestran los coeficientes de correlación de Pearson obtenidos del análisis (**Cuadro 4**), en donde se muestra que las variables (transformadas al logaritmo) de horas con lluvia en el día anterior a la recolección del *splashcup* (hora) y lluvia al cuadrado están correlacionadas con la energía cinética para ambos tratamientos ( $p < 0,05$ ). Para el análisis estadístico se utilizó solamente la variable de lluvia al cuadrado, que corresponde a la suma del cuadrado de las lluvias durante el día. Esto porque la variable de horas en el análisis de regresión lineal, mostró tener un VIF muy alto (por encima de 10). Se encontró además que hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos (sol/sombra) y para la covariable de lluvia al cuadrado. Bajo sombra se tiene una mayor energía cinética (164,7 J/m<sup>2</sup> en promedio) en comparación a pleno sol (62,9 J/m<sup>2</sup> en promedio), lo que quiere decir que bajo sombra hay una energía cinética 2,6 veces mayor. Esto se puede visualizar mejor en la (**Figura 15**).

**Cuadro 4.** Coeficientes de correlación de Pearson entre la energía cinética, las horas con lluvia y la lluvia al cuadrado.

Tratamiento	Pearson (p-valor) Horas*	Pearson (p-valor) Lluvia <sup>2</sup>
Sol	0,40 (0,0159)	0,49 (0,030)
Sombra	0,40 (0,0183)	0,43 (0,0098)

\* Horas con lluvia del día anterior.

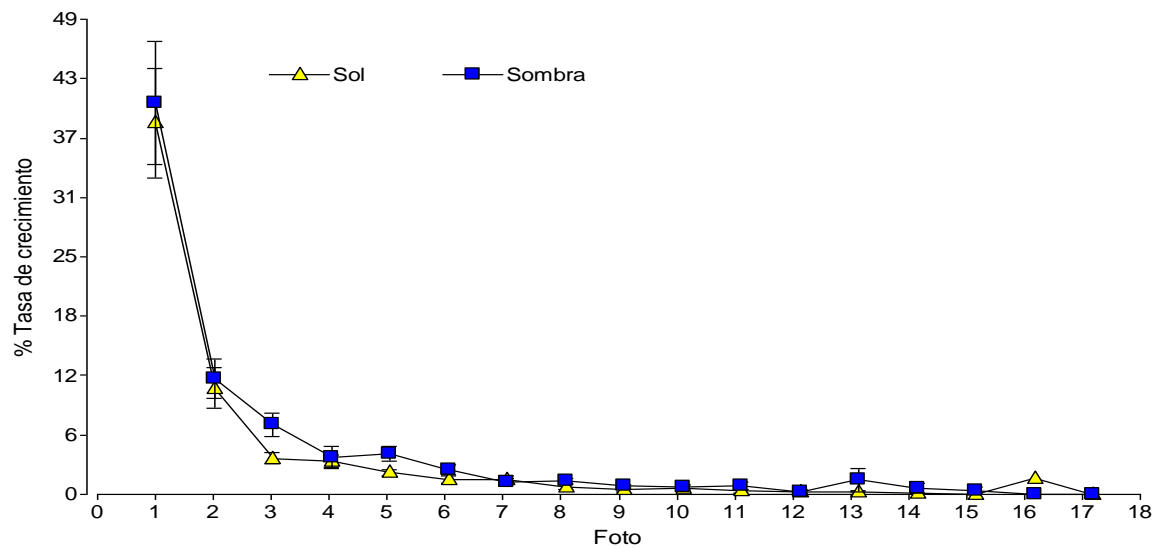


**Figura 15** Energía cinética promedio (J/m<sup>2</sup>) obtenida baja sombra y a pleno sol.

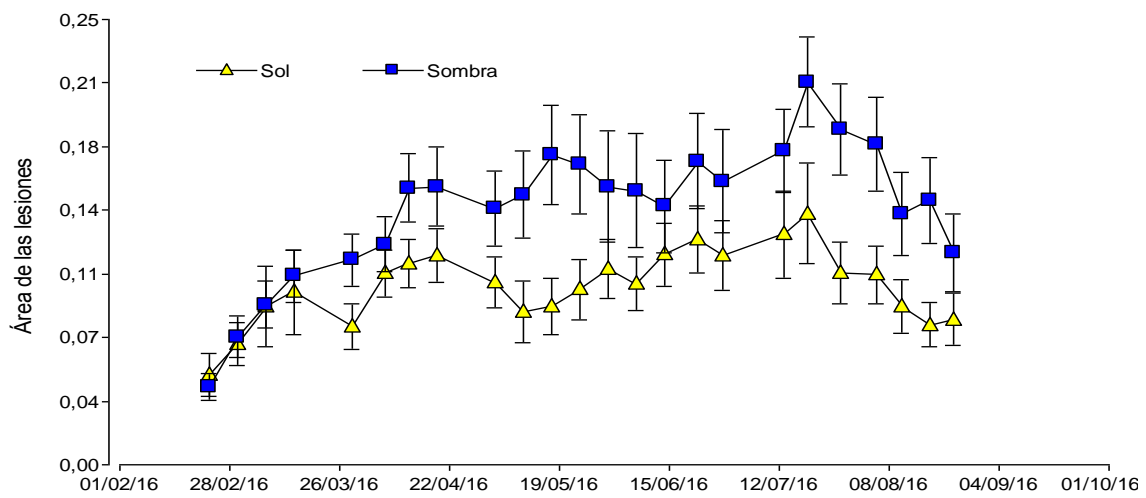
## 2. Colonización

Este proceso fue evaluado en un periodo comprendido de febrero a setiembre del 2016 y en un total de 27 semanas. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en cuanto al porcentaje de la tasa de crecimiento diario entre los tratamientos de sol y sombra. Fueron significativas las covariables de número de foto y área de la lesión, así como la interacción de tratamiento con semana. En **Figura 16 (A)**, se muestra la tasa de crecimiento diario (TC) con respecto al número secuencial de las fotos tomadas. Se observa que efectivamente no hay diferencias entre los tratamientos cuando se toma en cuenta el número de la foto. Se nota una caída importante de la TC de la primera a la segunda foto (una disminución de un 29%) y después de la foto 5 se estabiliza manteniéndose muy baja. Esto hace pensar que la lesión crece más en las 5 primeras semanas aunque su crecimiento cada vez es menor y luego prácticamente no crece del todo. En la **Figura 16 (B)**, se muestra el área promedio medida en  $\text{cm}^2$  para cada lesión a través del tiempo. En la primera evaluación el área es muy pequeña ya que todas las hojas tienen lesiones incipientes pequeñas. Con el paso de las semanas el área fue aumentando, sin embargo, hubo momentos en los que bajó nuevamente. Esto pasó cuando muchas hojas se cayeron y fueron reemplazadas por nuevas con lesiones pequeñas. Se observa que bajo sombra el área promedio de las lesiones fue mayor en todas las fechas de evaluación con respecto a pleno sol.

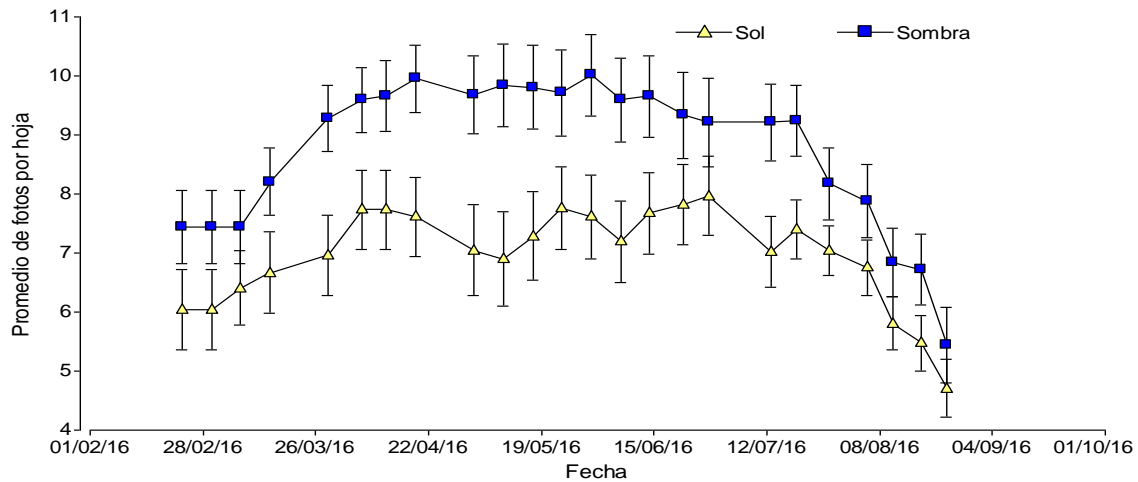
En la **Figura 16 (C)** se muestra el promedio de duración de las hojas presentes para cada semana de evaluación. En todas las evaluaciones bajo sombra se observa que se tomaron más fotos por hoja en comparación con el pleno sol. En promedio bajo sombra se tomaron 6,22 fotos por hoja mientras que a pleno sol 4,67 lo que quiere decir que las hojas bajo sombra duraron cerca de un 25% más de tiempo unidas a la planta. En total durante el estudio se evaluaron 323 hojas.



A



B



C

**Figura 16.** Tasa de crecimiento diaria según el número secuencial de la foto (foto 1= lesión incipiente, intervalo de una semana entre cada foto) (A). Área promedio de las lesiones en el tiempo (B). Promedio de fotos tomadas a cada hoja presente por semana (C).

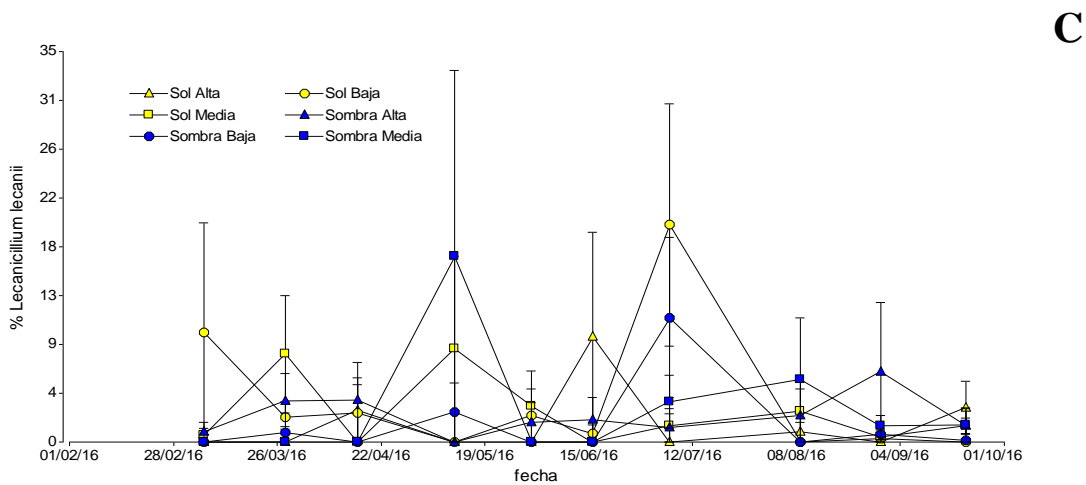
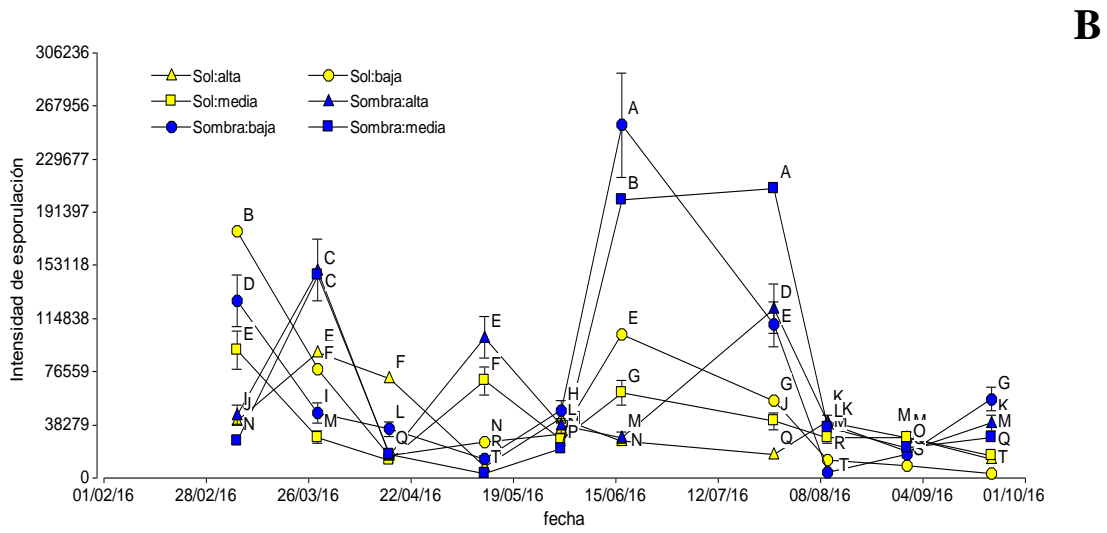
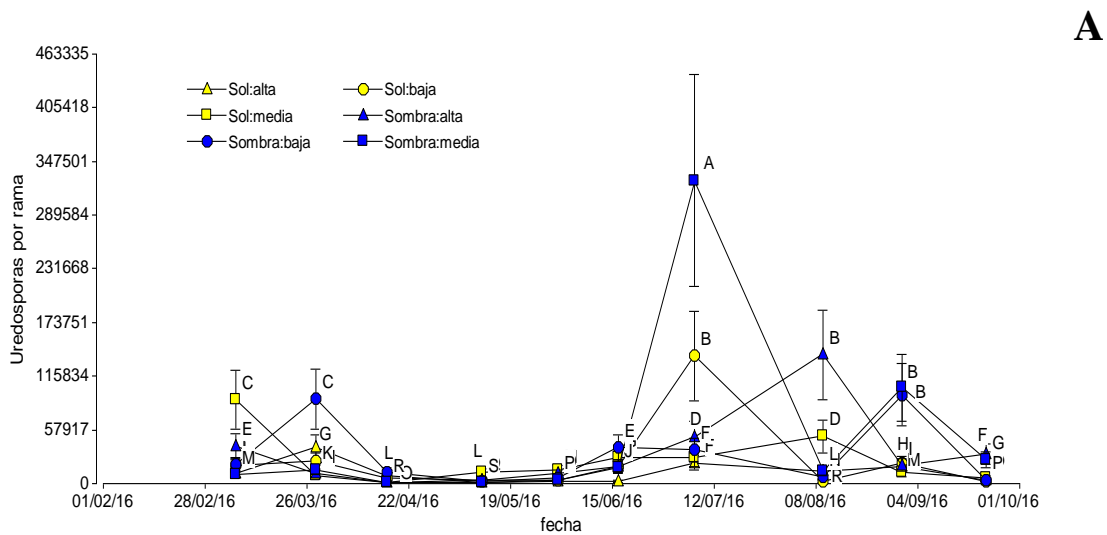
### 3. Esporulaci3n e Intensidad de esporulaci3n

Este proceso fue medido en un periodo comprendido de febrero a inicios de octubre del 2016. En la **Figura 17(A)** se muestra la esporulaci3n promedio obtenida por posici3n para cada tratamiento. No hubo diferencias estadísticas entre tratamientos (sol/sombra) sin embargo, sí se encontró una interacci3n triple significativa ( $p < 0,05$ ) entre el tratamiento, la posici3n de la rama muestreada (3 estratos) y el día del ańo. En términos generales se observa una tendencia a que haya una mayor esporulaci3n bajo la sombra prácticamente en todas las fechas de evaluaci3n, excepto en el periodo seco en el que la esporulaci3n es muy baja; eso explica parte de la interacci3n. Se nota que a inicio de ańo (febrero y marzo) hubo un pico de esporulaci3n que luego cay3 durante los meses de abril a junio y a partir del mes de julio hay nuevamente un aumento importante. Estas variaciones en la cantidad de in3culo est3n asociadas a las variables climáticas de esos periodos.

El promedio general de uredosporas bajo sombra fue de 15.271 por rama mientras que a pleno sol fue de 10.472. El valor m3ximo de esporulaci3n se encontró en el mes de julio con aproximadamente 422.166 esporas en una rama media bajo la sombra. A pleno sol por otra parte, en la rama alta la cantidad de esporas fue muy baja, no así en las ramas media o baja en donde hubo una mayor cantidad de esporas.

Para el caso de la intensidad de la esporulaci3n **Figura 17(B)**, se obtuvo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos sol y sombra así como en las interacciones con la posici3n de la rama muestreada (3 estratos) y el día del ańo. Bajo sombra densa se tiene una mayor intensidad de esporulaci3n (41.160 esporas/cm<sup>2</sup> en promedio) con respecto a pleno sol (30.798 esporas/cm<sup>2</sup> en promedio). A diferencia del gráfico de esporulaci3n total por rama, en donde para los meses de abril a junio la cantidad de esporas encontradas fue muy baja, la intensidad de esporulaci3n para esas mismas fechas fue importante. Esto indica que hubo poca área esporulada, pero con muchas esporas de roya. Por otra parte, en el mes de julio se observa tanto una alta esporulaci3n total por rama como intensidad, lo que hace pensar que para esa fecha, hubo una gran área esporulada con bastantes esporas por unidad de área. Caso contrario para el periodo de agosto a octubre en el cual se nota una disminuci3n en la intensidad pero una esporulaci3n total por rama importante, lo que indica que hubo mucha área esporulada pero con pocas esporas por unidad de área. La intensidad de esporulaci3n más alta fue de 254.316 esporas/cm<sup>2</sup> en una rama baja, bajo sombra el 16/06/2016

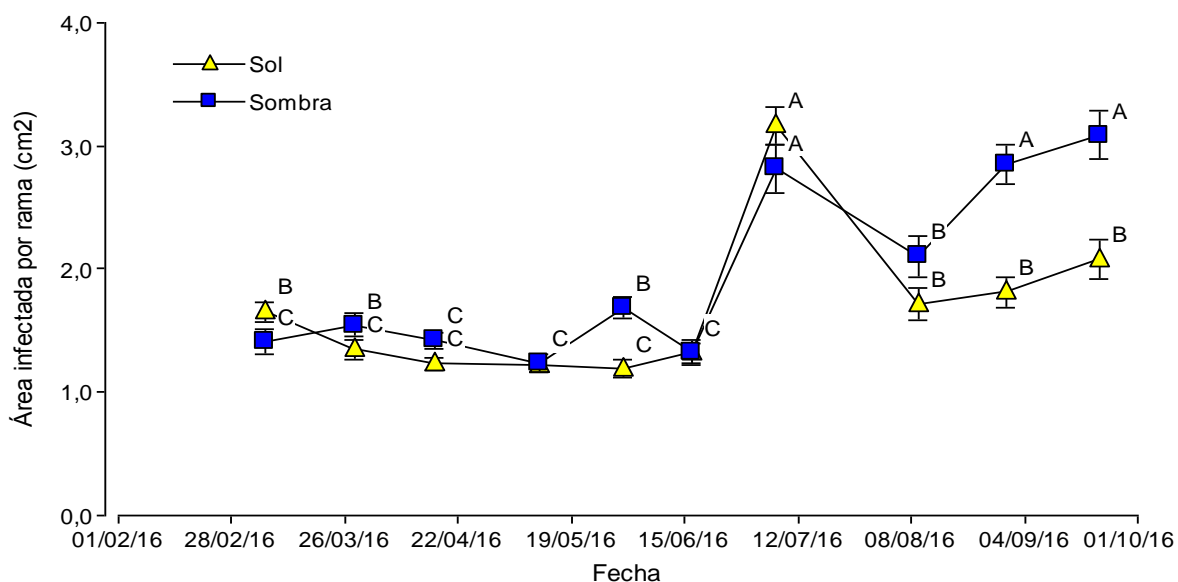
En la **Figura 17(C)** se muestra el porcentaje del área esporulada con *Lecanicillium lecanii* (LL) por rama para cada una de las posiciones de la rama a través del tiempo. No fue posible hacer un análisis estadístico de esta informaci3n debido a que se tenían muy pocos datos pues la mayoría de las hojas evaluadas tenían poca o nula área con este hongo antagonista. No se distingue un patr3n claro para deducir a través del gráfico, en cual tratamiento hay un mayor porcentaje de LL pues se invierte a través del tiempo. En promedio el porcentaje más alto que se registr3 con LL fue de 19,5% en una rama baja a pleno sol el 06/07/2016, mientras que bajo sombra, fue de 16,7 % en una rama media el 11/05/2016.



**Figura 17.** Cantidad de uredosporas producidas por rama (A). Intensidad de esporulación (promedio por rama del número de uredosporas por cm<sup>2</sup>) (B) y Promedio por rama del porcentaje del área esporulada parasitada por *Lecanicillium lecanii* (C). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )



El área promedio de las lesiones infectadas de roya por rama, se encuentran en la **figura 18**. Esta área contempla la suma del área con lesiones de roya esporulada y sin esporular en los diferentes momentos de evaluación. En análisis estadístico realizado indicó que hubo diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) para tratamiento (sol y sombra) y la interacción de este con las fechas de evaluación. Se encontró una mayor área de lesiones bajo sombra ( $1,95\text{cm}^2$  en promedio/rama) a comparación de plantas expuestas a pleno sol ( $1,67\text{cm}^2$  en promedio/rama). Se observa una interacción en las primeras fechas de evaluación que luego del mes de agosto se separa siendo mayor bajo sombra como en la mayoría de las evaluaciones. El pico de aumento de área que se observa para ambos tratamientos en la evaluación del 06/07/2016, coincide con los mayores niveles de esporulación encontrados en la misma fecha. La esporulación para esa fecha fue más alta bajo sombra, sin embargo, se observa que el área de las lesiones infectadas fue menor, por lo que posiblemente hubo menos área bajo sombra pero con más esporas.



**Figura 18.** Área promedio de lesiones infectadas de roya por rama. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 4. Dispersión aérea

Se elaboraron 4 modelos estadísticos para el análisis de este proceso. Durante el día cuando hubo lluvia, no se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) para los tratamientos sol y sombra, lo que quiere decir que se capturó la misma cantidad de esporas bajo sombra y pleno sol bajo esta condición. Sí fueron significativas las variables de *stock* de inóculo, la hora de trampeo y la velocidad máxima del viento por hora para este análisis. Durante el día pero cuando no llueve, se encontraron diferencias entre los tratamientos sol y sombra. Hubo una mayor captura a pleno sol (0,53 esporas/hora en promedio) en comparación con la sombra (0,35 esporas/hora en promedio). Para este análisis, otras variables significativas fueron: El *stock* de inóculo, la hora de trampeo, el viento máximo y la humedad relativa por hora.

Para el caso de las horas de la noche, se encontró que cuando llueve, hubo diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) para tratamiento. Bajo sombra densa se capturaron más

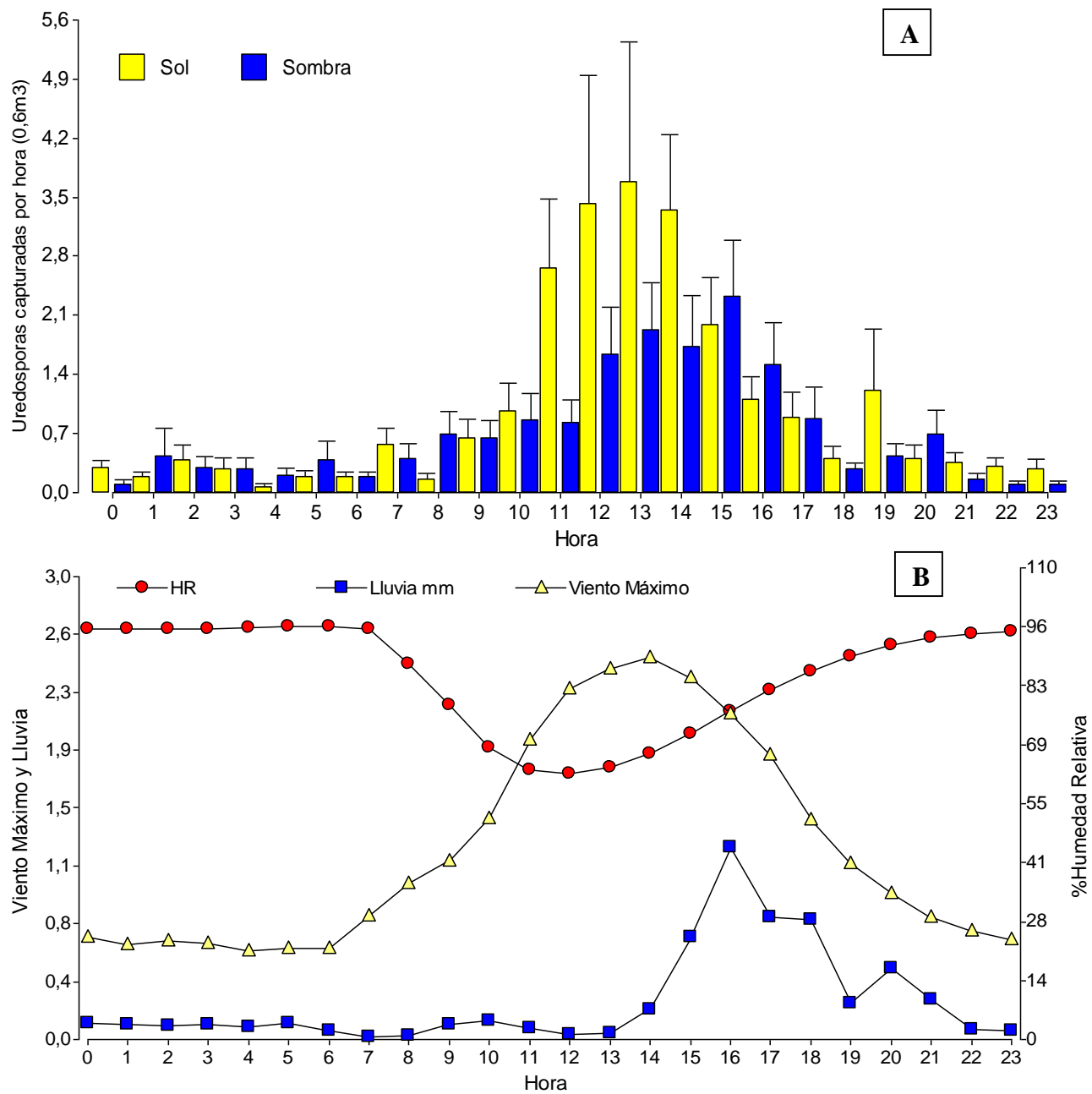
esporas (0,05 esporas/hora en promedio) con respecto a pleno sol (0,02 esporas/hora en promedio). Fue significativa también la variable de *stock* inóculo. La velocidad máxima de viento por hora fue marginal. Cuando no llueve durante la noche, se encontraron diferencias entre los tratamientos. Se capturaron más esporas a pleno sol (0,04 esporas/hora en promedio) en comparación con la sombra (0,03 esporas/hora en promedio). Otras variables significativas para este modelo fueron: el *stock* de inóculo, la hora de trampeo y la HR. No se detectaron problemas de sobre dispersión asociados a ninguno de los modelos antes descritos. En el **cuadro 5**, se muestra un resumen de los resultados obtenidos para cada modelo.

**Cuadro 5.** Resumen de las variables significativas ( $p > 0,05$ ) para cada modelo de dispersión.

Modelo	Tratamiento	Inóculo	Hora	Viento Máximo	HR
Día con Lluvia		X (-)	X (-)	X (+)	(-)
Día sin Lluvia	Pleno Sol > sombra densa	X (-)	X* (-)	X* (+)	X* (+)
Noche con Lluvia	Sombra densa > Pleno sol	X (-)	(-)	Marginal (-)	(-)
Noche sin Lluvia	Pleno Sol > Sombra densa	X (-)	X (+)	(-)	X* (-)

X = Variable significativa; X\* = Muy significativa; Espacio en blanco = No significativa. Sentido del efecto de la variable sobre la dispersión, negativo (-) o positivo (+).

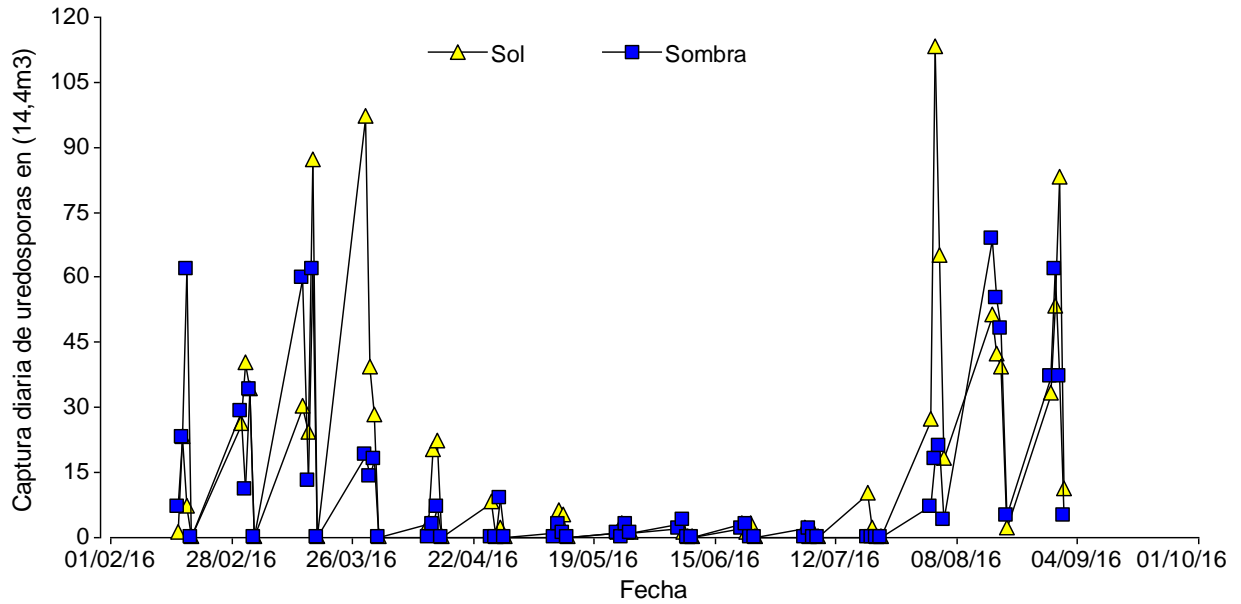
En la **figura 19(A)** se muestra la cantidad promedio de esporas capturadas según la hora del día para cada tratamiento. Entre las 11:00am y las 3:00pm se concentra la mayor cantidad de capturas durante el día a pleno sol. Para el caso de la sombra hay un pequeño desfase y la mayor concentración de capturas se da entre las 12:00pm y las 4:00pm. Por otra parte en las horas de la noche hay una disminución importante de las capturas. En la **figura 19(B)** se encuentran las variables climáticas más importantes que están asociadas a la dispersión según la hora del día. Durante las horas del día, hay un aumento de la velocidad máxima del viento, sobre todo entre las 10:00am y 3:00pm, la humedad relativa baja y casi no llueve, lo que facilita la dispersión de las esporas en seco a través del viento. Posteriormente, a partir de las 2:00pm se da un aumento de la HR pues comienza a llover más frecuentemente y se da una disminución de la velocidad máxima del viento.



**Figura 19.** Cantidad de uredosporas atrapadas según la hora del día (A). Variables climáticas de HR, Lluvia y Viento Máximo según la hora del día en las fechas de muestreo (B).

En la **figura 20** se observa la cantidad total de esporas capturadas por día a través del tiempo para cada tratamiento, sin tomar en cuenta las variables climáticas asociadas. No se identifican diferencias marcadas entre los tratamientos pero si las fechas en las que se capturó más. En los meses de febrero a marzo hubo una mayor captura de esporas en comparación con los meses de abril a julio en donde estas fueron muy bajas. Ya a partir del mes de agosto, se da nuevamente un aumento importante en las capturas.

En el mes de julio se puede notar que hubo un pico importante en la esporulación no así en las capturas con la trampa Burkard que se mantuvo casi en cero. Por otra parte la mayor cantidad de esporas capturadas en un día durante el periodo de muestreo que fue de febrero a setiembre del 2016, fue de 113 esporas el 03/08/2016, a pleno sol. Mientras que para sombra la mayor cantidad fue de 69 esporas el 16/08/2016



**Figura 20.** Cantidad de uredosporas capturadas por día, según el tratamiento.

## Discusión

### 1. Proceso de Colonización

Se encontró que las condiciones que favorecen el proceso de colonización de la roya sobre las hojas de café, son iguales a la sombra que a pleno sol. Sin embargo, el periodo infeccioso que es el periodo en el cual la lesión es infecciosa, es más largo a la sombra porque la vida de la hoja es más larga. Esto por lo tanto da oportunidad a las lesiones de producir más esporas. Lo anterior concuerda con los hallazgos de López *et al.* (2010) quienes encontraron en el mismo lugar de nuestro estudio, que no hubo diferencias de severidad significativas ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos de sol y sombra, a pesar que se encontraron incidencias mayores bajo sombra. Es importante mencionar que la severidad no es una medida exacta del proceso de colonización que solo incluye el tamaño de las lesiones, pues la severidad incluye también el proceso de infección y el número de lesiones.

A nuestro conocimiento, no hay mucha información sobre lo que afecta precisamente el proceso de colonización. Si hay información sobre lo que afecta el periodo de latencia, que va desde la germinación hasta la esporulación, y que incluye por lo tanto el proceso de colonización. Avelino y Rivas (2013) mencionan que los principales factores que afectan este periodo son la humedad del suelo (a mayor humedad, la latencia es más corta), la carga fructífera (a mayor carga, la latencia es más corta), la resistencia genética (las resistencias incompletas alargan la latencia) y la temperatura de la hoja (existe un óptimo alrededor de 23°C). La temperatura de la hoja es uno de los principales factores microclimáticos que podrían afectar la colonización.

Solo se tiene conocimiento de un estudio sobre colonización a diferentes temperaturas, realizado por Salustiano; Empélio y Ferraz en el 2007. Estos autores probaron dos aislados de roya sobre plantas de café. Encontraron que para uno de los aislados la severidad fue mayor cuando la inoculación del hongo se hizo a una temperatura de la hoja de 25°C. Mientras que para el otro aislado, la severidad fue mayor cuando la temperatura era de 15°C. Esto demuestra que existe relación entre la temperatura de la hoja y el tamaño de las lesiones, aunque esta relación dependa de las cepas de roya. Esto no se encuentra en nuestro experimento a pesar de que hay diferencias de temperatura entre sol y sombra.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio difieren también de lo encontrado en otros modelos biológicos, como lo hallado por Bernard *et al.* (2012) quienes reafirman que la temperatura de la hoja afecta la colonización. Ellos descubrieron que, a una temperatura entre 10 y 12°C se tiene el mayor porcentaje (80%) del área inoculada con el hongo *Mycosphaerella graminicola* que produce lesiones sobre el trigo (*Triticum aestivum*), mientras que a una temperatura entre 12 y 14°C el porcentaje no llegó al 50% de colonización.

En este experimento, a diferencia de los dos anteriores en los que se utilizaron grandes variaciones de las temperaturas, el promedio de temperatura por día no se alejó grandemente del óptimo para la roya que es de 23°C ni al sol ni bajo sombra. La temperatura se mantuvo bastante

estable a lo largo del tiempo y eso pudo influir en que no se encontraran diferencias en colonización entre los tratamientos al sol y bajo sombra.

El hecho de no encontrar diferencias entre sol y sombra, también podría deberse a efectos contradictorios que se anulan. Así, la sombra por regular las temperaturas podría favorecer la colonización a través de sus efectos sobre el patógeno. Pero al sol, la alta carga fructífera y las fuertes radiaciones podrían volver la hoja más susceptible (Eskes, 1982; López-Bravo *et al.*, 2012)

A nuestro conocimiento, nunca se había reportado el efecto de la sombra sobre la colonización de la roya.

## **2. Esporulación e intensidad de esporulación**

Evaluar la esporulación fue importante porque permitió conocer el *stock* de inóculo de roya que había en el campo y relacionarlo con los demás procesos. Por otra parte la intensidad permitió conocer la relación entre el área afectada y la cantidad de esporas producidas en esa área. En nuestro estudio encontramos que en los periodos en los que se dio un aumento de la frecuencia y cantidad de las lluvias, y por ende también en la humedad relativa, se dio a aumento en la esporulación y su intensidad. Mientras que en los periodos más secos la esporulación y la intensidad bajaron. Bajo sombra se generaron condiciones de microclima, como una mayor humedad relativa y una temperatura más estable que pudieron ser condiciones favorables para la roya. También que el área de las lesiones infectadas por rama fue mayor por lo que esa área pudo producir más inóculo. Esto pudo incidir en que globalmente se encontrara una mayor esporulación y significativamente una mayor intensidad de esporulación.

Lo anterior coincide con lo que mencionan Avelino y Rivas (2013), se cree que cambios en la HR y temperatura podrían afectar la esporulación. Muller en 1975, observó que el riego en época seca, adelantaba las epidemias de la roya anaranjada, dado que se estimulaba una esporulación precoz de las lesiones en estado latente.

Los resultados acá presentados concuerdan también con lo reportado por Pico en el (2014), quien en el mismo lugar de nuestro estudio, encontró que ante una misma carga fructífera, bajo sombra la roya se vio favorecida. Bajo sombra densa se presentaron mayores cantidades de esporas: máximas de inóculo de 296.181 y 118.703 esporas por rama respectivamente. Pero esto pudo deberse a que las incidencias y severidades máximas, también eran mayores bajo sombra que al pleno sol: 94,5% y 74,8% para la incidencia, y 3,6% y 1,92% para la severidad a la sombra y pleno sol respectivamente.

Los resultados acá presentados también concuerdan con otros modelos biológicos como lo estudiado por Anco; Madden y Ellis en el 2013. Bajo un ambiente controlado, estos autores probaron el efecto de la temperatura y la duración de la humedad sobre la esporulación de *Phomopsis viticola* en bastones de uva. Encontraron que la esporulación aumentó cuando se obtuvo una temperatura cercana de los 21°C y había un aumento de la duración de la humedad. Por otra parte, la esporulación se vio afectada negativamente por temperaturas altas por encima

de las 36°C. Es por esto que la influencia de la precipitación y periodos más largos de humedad así como temperaturas más estables, condiciones que en este estudio se dieron bajo la sombra, pudieron haber tenido influencia no solamente sobre una mayor esporulación por rama sino también en la intensidad de la esporulación de la roya anaranjada por unidad de área. Este último resultado nunca había sido reportado a nuestro conocimiento.

### **3. Dispersión aérea**

Se encontró que la dispersión aérea de la uredosporas, está ligada a una interacción de la sombra con la lluvia y con el viento, haciendo que esta sea dependiente de estas condiciones climáticas cambiantes. La sombra puede reducir la dispersión tanto en el día como en la noche bajo condiciones secas, ya que el dosel de los árboles puede interceptar y reducir las ráfagas de viento y disminuir la propagación por esa vía. Por otro lado la sombra aumenta la dispersión cuando llueve, pero durante la noche ya que durante el día no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Posiblemente esto puede deberse a la energía cinética de las gotas de agua que fue mayor bajo sombra. El dosel del árbol intercepta las gotas pequeñas, hace gotas más grandes que al caer impactan con mayor fuerza las hojas del café infectadas, haciendo que se dé una mayor liberación de las esporas en el aire.

A lo largo del tiempo, se encontró una relación entre la cantidad de esporas producidas por rama (proceso de esporulación) y la cantidad de esporas capturadas por la trampa Burkard en las mismas fechas. Cuando la esporulación aumentó, también lo hizo la cantidad de esporas atrapadas y cuando la esporulación bajó del mismo modo las capturas. Hubo una fecha (06/07/2016) en la que esta relación no se cumplió, ya que la esporulación para esa fecha fue la más alta de todo el periodo de evaluación, pero prácticamente no hubo capturas. Esto pudo deberse a que para esa fecha bajo sombra, el bloque 2 presentó una esporulación muy alta (418.583 esporas/rama) en comparación con los otros dos bloques lo que elevó el promedio general de esporulación. La trampa Burkard por su parte, para esas fechas estuvo colocada en el bloque 1, que de los tres fue el que presentó la menor esporulación (12.916 esporas/rama).

En el caso de pleno sol en el bloque 1 para esa misma fecha, se dio la mayor esporulación (217.000 esporas/rama) de los 3 bloques sin embargo, las capturas fueron muy bajas. Esto posiblemente se debió a que en la rama alta se dio la menor esporulación (9.250 esporas/rama) mientras que en la rama baja se dio la mayor (569.550 esporas/rama) lo que elevó el promedio de esporulación para ese bloque. La trampa Burkard al estar a una altura de 1,5m del suelo, tiene la posibilidad de capturar principalmente las esporas que se encuentra en los estratos más altos de la planta. Es por esto que difícilmente la trampa pudo capturar la gran cantidad de esporas que habían en el estrato bajo y por eso globalmente las capturas fueron muy bajas para ese bloque a pesar de tener altos niveles de esporulación.

Otro aspecto importante por considerar fue la distribución de las capturas según la hora del día y de las condiciones climáticas para esas mismas horas. La mayoría de las capturas a pleno sol se dio durante las horas del día, mismas en las que la velocidad del viento aumentó y prácticamente no llovía. Para el caso de la sombra, se notó un pequeño desfase en las

horas de captura, incrementándose a la hora en la que generalmente comenzaba a llover. Lo anterior reafirma lo encontrado con los modelos estadísticos.

Es importante comparar este resultado con la precipitación (**figura 14**) y la esporulación (**Figura 17(A)**) que hubo durante ese mismo periodo. La esporulación está relacionada con condiciones climáticas de lluvia y HR, por lo que una mayor frecuencia de días con lluvia incide en una mayor esporulación y por ende una mayor posibilidad de capturar esas esporas producidas. En el mes de febrero hubo días en los que hubo una alta precipitación y esto pudo influir en el aumento de la esporulación de finales del mes de febrero y marzo lo que aumentó las capturas para ese periodo. Posteriormente se dio un periodo relativamente seco (de marzo a mayo) en el que hubo pocas lluvias y poca esporulación, para ese mismo periodo las capturas fueron muy bajas. Finalmente se dio un aumento en la frecuencia y cantidad las lluvias a partir del mes de julio, esto coincidió con mayores niveles de esporulación y también en un aumento importante de las capturas para los meses siguientes.

Nuestros hallazgos concuerdan con lo descrito por Nutman *et al.* (1960) quien asegura que la liberación de las uredosporas es posible cuando llueve. Una lluvia de 0,8mm es suficiente para producir la liberación a través de la salpicadura producida por las gotas de agua. Por su parte Vis (1986) coincide con la que energía cinética de las gotas de agua es mayor bajo árboles que a campo abierto. En su estudio encontró que bajo los árboles había de un 20 a 70% más de energía cinética. Becker, (1977) con sus trabajos aclaró la importancia tanto de la lluvia y del viento como medios de dispersión, indicando que la uredosporas principalmente se dispersan por el viento, cuando no llueve, y que en un menor grado por el agua. Pero estos trabajos se hicieron al pleno sol.

Nuestros resultados también concuerdan parcialmente con lo encontrado por Boudrot *et al.* (2016), quien en el mismo lugar y con el mismo equipo que el nuestro, encontró que durante el día cuando no llueve, hay una mayor dispersión de uredosporas a pleno sol, mientras que durante el día cuando llueve, había una mayor dispersión bajo sombra. Lo anterior difiere con nuestros hallazgos pues no encontramos diferencias estadísticas de capturas entre los tratamientos cuando llueve en el día, pero las tendencias de que el viento es el principal vector de las esporas al sol, y que la lluvia lo es bajo sombra se confirman.

A diferencia del estudio anterior en el que el periodo de toma de datos abarcó poco más de un año y que incluyó la época de mayores precipitaciones y por lo tanto mayores niveles de esporulación, en este estudio las evaluaciones abarcaron solamente 6 meses y fueron en gran medida en la época seca. Esto pudo influir en que en nuestro estudio no se encontraron diferencias entre los tratamientos justamente para los periodos de lluvias pues no se tenían tantos datos. El estudio de Boudrot *et al.* (2016) sí concuerda con nuestros resultados en cuanto a la distribución de las capturas en el tiempo, siendo entre las 10:00am y las 4:00pm los periodos de mayor captura y su relación con el clima presente a esas horas. Así como la relación entre los periodos de mayor esporulación y el aumento de las capturas por la trampa.



## Discusión General

Para tratar de entender mejor los efectos de la sombra sobre la roya, se planteó hacer un estudio que se enfocara en cada uno de los procesos que forman parte del ciclo de vida de la roya anaranjada de café. Se sabe ahora, considerando las condiciones propias de nuestro estudio, que el proceso de colonización de la roya sobre las hojas de café, afecta de igual forma a plantas que están bajo sombra como a pleno sol, esto a pesar de que el área de las lesiones siempre fue mayor bajo sombra densa, pero es debido en parte a que bajo esta condición la longevidad de las hojas es mayor.

Una mayor longevidad de las hojas, da oportunidad a que las lesiones crezcan más y estas duren más tiempo produciendo y liberando nuevas esporas. Diferencias de esporulación total también puede deberse al hecho que bajo sombra hay más infecciones (López-Bravo *et al.*, 2012), lo cual podría incrementar el área afectada. Hay que tomar en cuenta que las condiciones microclimáticas propias de cada tratamiento, influyen también sobre este proceso de esporulación, sobre todo la lluvia y la HR. Las condiciones húmedas de la sombra posiblemente hayan propiciado una mayor intensidad de esporulación por unidad de área esporulada.

Una vez que se ha dado el proceso de esporulación y las uredosporas están preparadas para dispersarse lo pueden hacer por dos vías principales, una de ellas es por el viento. La sombra dificulta el proceso de dispersión aérea de las esporas por el viento bajo condiciones secas. Por otra parte cuando llueve, la sombra favorece la dispersión, especialmente durante la noche, como lo mostramos, pero también durante el día como lo mostraron Boudrot *et al.* (2016). Demostramos que la energía cinética de las gotas de agua es mayor bajo sombra, lo que favorecería la liberación de las esporas y su dispersión en el aire cuando llueve, por el impacto de las gotas sobre las hojas.

La segunda vía principal de dispersión de las uredosporas es a través del agua, esta se puede dar ya sea por splashing (salpique) o lavado. Segura (2016) en un estudio complementario a este, en el mismo lugar y el mismo momento, ha estudiado el efecto de la sombra sobre este proceso. Encontró que el salpique de las esporas de roya producto de la lluvia es igual bajo sombra que a pleno sol, y que las diferencias estadísticas encontradas fueron producto de la interacción del tratamiento con la posición de las ramas en la planta. Esta interacción no logró explicarse satisfactoriamente. Para el caso del lavado encontró que fue significativamente mayor a pleno sol, por lo que bajo sombra se conservan más esporas. Esto posiblemente porque la lluvia que cae a pleno sol es más uniforme y se mantiene más en la planta produciendo un mayor escurrimiento. En el caso de la sombra densa alta, como la gota trae una energía cinética alta, tiende a reventar sobre la hoja y producir gotas que podrían salir de la planta hacia otras direcciones. También se verificó que la sombra intercepta agua. Al haber menos agua en el cafetal, necesariamente hay menos lavado.

Finalmente está la deposición, proceso que también fue evaluado por Segura (2016), quien encontró que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, por lo que se deposita la misma cantidad de esporas bajo sombra que a pleno sol. Encontró una mayor cantidad de esporas

en las hojas más bajas de la planta. Esto es consecuente si se piensa que durante el lavado, el agua arrastra las esporas desde la parte más alta de la planta y las deposita mayormente en las partes más bajas. Luego del proceso de deposición, cuando se dan las condiciones de clima adecuadas, las esporas depositadas germinan, penetran la hoja por los estomas e inicia nuevamente el proceso de colonización. Este ciclo se repite continuamente y su duración está ligada tanto a factores fisiológicos de la planta, como factores externos como el clima antes mencionados.

De esta forma se completa el estudio sobre el efecto de la sombra y el microclima sobre los diferentes procesos que conforman el ciclo de vida de la roya anaranjada del café. La sombra tiene diferentes efectos que están en función de la interacción con el microclima, en el **cuadro 6** se muestra un resumen del efecto que tiene la sombra sobre cada uno de los procesos evaluados.

**Cuadro 6.** Efecto de la sombra sobre cada uno de los procesos del ciclo de vida de la roya.

Proceso	Sol	Sombra	Fuente
Incidencia	-	+	(López-Bravo <i>et al.</i> , 2012; Pico, 2014)
Colonización	=	=	
Esporulación	=	+	(Pico, 2014)
Intensidad de esporulación	-	+	
Dispersión aérea (en seco durante el día )	+	-	Boudrot <i>et al.</i> (2016)
Dispersión aérea (cuando llueve durante el día)	=	=	Boudrot <i>et al.</i> (2016)
Dispersión aérea (en seco por la noche)	+	-	
Dispersión aérea (cuando llueve por la noche)	-	+	
Dispersión por el agua (Splashing)	=	=	(Segura, 2016)
Dispersión por el agua (Conservación de esporas)	-	+	(Segura, 2016)
Deposición	=	=	(Segura, 2016)

(+ = favorece el proceso, tomando en cuenta solamente diferencias estadísticas significativas entre tratamientos)

## Conclusiones

- ❖ La sombra densa de Cashá (*Cloroleucon eurycyclum*) no tuvo efecto sobre la colonización de la roya sobre las hojas de café, este proceso se da de igual manera bajo sombra y a pleno sol. El área de las lesiones es mayor bajo sombra densa, esto debido en parte a que las hojas en esta condición duran aproximadamente un 25% más de tiempo en la planta con respecto a las hojas a pleno sol.
- ❖ Se encontró un efecto de la sombra sobre la intensidad de esporulación, esta fue más alta bajo sombra densa, por lo que hubo más esporas por centímetro cuadrado en comparación con el pleno sol. Para el caso de esporulación no se encontraron diferencias entre los tratamientos, aunque sí en la interacción del tratamiento, la posición de la rama y la semana. Esto sugiere la importancia que tiene la esporulación según el estrato de la planta y la semana de evaluación, que está asociada a las condiciones de clima, pues cuando se aumentó la frecuencia y cantidad de lluvias, de la misma manera la esporulación.
- ❖ Se encontró una interacción de la sombra densa con las condiciones de clima y las horas del día que determina la dispersión de las esporas de roya en el aire. Cuando no llueve, la dispersión se favorece a pleno sol, cuando llueve la dispersión se favorece bajo la sombra densa pero durante la noche, pues durante el día no hay diferencias entre tratamientos. Sin embargo, los valores de dispersión observados parecen extremadamente bajos, por lo cual se piensa que la dispersión en el aire de la roya es un proceso secundario dentro del ciclo de vida del patógeno.
- ❖ Las condiciones de microclima fueron muy importantes en la determinación del efecto de la sombra sobre los diferentes procesos de la enfermedad. La energía cinética de las gotas de agua, mayor bajo sombra, explica que haya más dispersión cuando llueve en esta condición. El efecto del viento sobre la dispersión en el aire, explica las menores dispersiones observadas bajo sombra, cuando no llueve. Pues la sombra intercepta el viento. La humedad relativa más alta bajo sombra podría, por otro lado, explicar la mayor intensidad de la esporulación en esta condición.
- ❖ En nuestro estudio hemos comparado dos condiciones extremas, como lo son el café con sombra densa de cashá con una altura entre 13 y 15m y el pleno sol, esto con el fin de encontrar diferencias. Bajo estas condiciones de sombra, el balance final indica que la sombra tiende a favorecer a la roya. Lo que queda ahora es buscar un tipo de sombra cuyas características tiendan a disminuir, la intensidad de esporulación y la conservación de esporas.

## Recomendaciones

- ❖ Para un estudio posterior del proceso de colonización de la roya sobre hojas de café, se recomienda hacer mediciones de la temperatura de la hoja que como se vio es un factor muy importante que determina este proceso. De igual forma evitar tomar las fotografías de las lesiones en presencia de mucha luz, ya que eso dificulta la identificación del halo clorótico de la lesión a la hora de estimar su área.
- ❖ Los niveles de esporulación están muy ligados al inicio de la época lluviosa, por lo que se propone que la evaluación de este proceso se haga principalmente durante ese periodo.
- ❖ De la misma manera, se propone hacer la evaluación del proceso de dispersión aérea sobre todo en la época en dónde hay mayores niveles de esporulación. Esto con el fin de obtener buenos niveles de capturas y al mismo tiempo contar con más datos a la hora de hacer los análisis estadísticos.
- ❖ Finalmente se recomienda mantener la sombra en los cafetales, pues se sabe que los árboles proveen diferentes servicios ecosistémicos y se logran sistemas más estables. Para evitar que la sombra pueda favorecer a la roya, se propone utilizar árboles de porte más bajo que tiendan a disminuir la energía cinética de las gotas de agua. De igual manera que sus hojas no sean muy grandes de manera que no intercepten mucha agua. Que se pueda podar fácilmente de manera que el nivel de sombra que produce sea el adecuado según las condiciones climáticas propias de la zona. Que se pueda podar durante la época lluviosa y mantener una buena copa durante la estación seca. Que sea fijador de nitrógeno y que su biomasa se pueda incorporar como materia orgánica que aporte en la nutrición de las plantas.

## Literatura Citada

- Agrios, G. 1998. Fitopatología. Enfermedades ocasionadas por Basidiomycetes. 2a ed México, DF (México), Limusa. p 413 - 437.
- Agrios, GN. 2005. Plant pathology. Departament of Plant Pathology University of Florida, Elsevier Academic Press.
- Alvarado, M.; Rojas, G. 2007. Cultivo y beneficiado del café. Segunda edición. Editorial Universidad Estatal a Distancia. San José, Costa Rica. 165p.
- Anacafé, 2015. Manejo integrado de la roya anaranjada *Hemileia vastatrix* Berk et Br. Boletín Técnico. Centro de Investigaciones en Café (CEDICAFÉ). Consultado en línea el 10 de noviembre del 2015. Disponible en: [http://anacafe.org/glifos/images/4/4f/Manejo\\_Integrado\\_de\\_la\\_Roya2.pdf](http://anacafe.org/glifos/images/4/4f/Manejo_Integrado_de_la_Roya2.pdf)
- Anco, D; Madden, V; Ellis, M. 2013. Effects of temperature and wetness duration on the sporulation rate of *Phomopsis viticola* on infected grape canes. *Plant Dis.* 97:579-589.
- Avelino, J; Toledo, J.c.; Medina, B. 1993. Développement de la rouille orangée (*Hemileia vastatrix*) dans une plantation du Sud-Ouest du Guatemala et évaluation des dégats qu'elle provoque. In 15 Colloque Scientifique International sur le Café, Montpellier, France, 6-11 juin 1993. France, ASrc. p. 293-302.
- Avelino, J; Muller, R; Eskes, A; Santacreo, R; Holguin, F. Capítulo 6. 1999. La roya anaranjada del cafeto: mito y realidad. In Bertrand, B.; Rapidel, B. eds. Desafíos de la caficultura de Centroamérica. San José, Costa Rica. p. 193-241.
- Avelino, J.; Willocquet, L.; Savary, S. 2004. Effects of crop management patterns on coffee rust epidemics *Plant pathology* 53(5): 541-547.
- Avelino, J.; Rivas, G. 2013. La roya anaranjada del cafeto. <http://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01071036>. 1-47.
- Avelino, J; Cristancho, M; Georgiou, S; Imbach, P; Aguilar, L; Bornemann, G; Läderach, P; Anzueto, F; Hruska, A; Morales, C. 2015. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. Consultado en línea el 14 de Noviembre del 2015. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12571-015-0446-9>. 19p.
- Becker, S., 1977. Diurnal periodicity in spore dispersal of *Hemileia vastatrix* in relation to weather factors *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 84(10): 577-591.

- Becker, S. y Kranz, J., 1977. Comparative studies on the dispersal of *Hemileia vastatrix* in Kenya. *Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 84(9): 526-539.
- Bernard, F; Sache, I; Suffert, F; Chelle, M. 2012. The development of a foliar fungal pathogen does react to leaf temperature. *New Phytologist* (2013) 198: 232–240.
- Boudrot, A; Pico, J; Merle, I; Granados, E; Vílchez, S; Tixier, P; Virginio, E; Casanoves, F; Tapia, A; Allinne, C; Rice, R; Avelino, J. 2016. Shade Effects on the Dispersal of Airborne *Hemileia vastatrix* Uredospores. *Phytopathology* 106:572-580.
- Cressey, D. 2013. Coffee rust regains foothold. Researchers marshal technology in bid to thwart fungal outbreak in Central America. *Nature* (7434): 587.
- Di Rienzo JA, Macchiavelli RE, Casanoves F. 2011. Modelos lineales mixtos: aplicaciones en InfoStat. 1a. ed. Grupo Infostat, Córdoba, Argentina. 193 p.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Eskes, AB. The effect of light intensity on incomplete resistances of coffee to *Hemelia vastatrix*. *Neth J Plant Pathol* 1982; 88 (5): 191-202.
- Evenhuis, A; Verdam, B; Zadoks, J. 1997. Splash dispersal of conidia of *Mycocentrospora acerina* in the field. *Plant Pathology* 46. 459-469p.
- Fernandes, R.d.C., Evans, H.C., y Barreto, R.W., 2009. Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. *Tropical Plant Pathology*. 34(2): 108-113.
- Granados, E. 2015. Evaluación de la incidencia y severidad de *Hemileia vastatrix* en plantas de café bajo diferentes intensidades de sombra y estrategias de manejo. Tesis, Lic, Universidad de Costa Rica. Turrialba, Costa Rica.
- Haggar, J.; Barrios, M.; Bolaños, M.; Merlo, M.; Moraga, P.; Munguía, R.; Ponce, A.; Romero, S.; Soto, G.; Staver, C. 2011. Coffee agroecosystem performance under full sun, shade, conventional and organic management regimes in Central America. *Agroforestry Systems* (3): 285-301.
- Lagos, S. 2014. Efecto de la condición química del suelo y de la fertilización sobre la incidencia, severidad y resistencia fisiológica de plantas de café a la roya (*Hemileia vastatrix*). Tesis de Maestría. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 81p.

- López, D. 2010. Efecto de la carga fructífera sobre la roya (*Hemileia vastatrix*) del café, bajo condiciones microclimáticas de sol y sombra, en Turrialba, Costa Rica. Tesis de Maestría. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 13-14p.
- McCook, S. 2009. La Roya del café en Costa Rica: Epidemias, innovación y medio ambiente, 1950-1995. *Revista de Historia* (59-60).
- Merle, I. 2014. Efecto de la sombra y del microclima sobre la dispersión de las uredosporas de *Hemileia vastatrix* en sistemas agroforestales de café (*Coffea arabica* var. Caturra) en Turrialba, Costa Rica. Consultado en línea el (25 de octubre del 2015). Disponible en: [http://agritrop.cirad.fr/573483/1/document\\_573483.pdf](http://agritrop.cirad.fr/573483/1/document_573483.pdf). 17p.
- Muller, R.A., 1975. *L'irrigation précoce, assurance pour une production régulière de haut niveau du caféier Arabica*. *Café Cacao Thé*. **19**(2): 95-122.
- Nutman, F.J., Roberts, F.M., y Bock, K.R., 1960. Methods of uredospore dispersal of the coffee leaf rust fungus, *Hemileia vastatrix*. *Transactions of the British Mycological Society*. 43(3): 509-515.
- Pico, J. 2014. Efecto de la sombra del café y el manejo sobre la incidencia, severidad, cantidad de inóculo y dispersión de *Hemileia vastatrix* en Turrialba, Costa Rica. Tesis de Maestría. CATIE. Costa Rica. 79p.
- Rojas, F; Canessa, R; Ramírez, J. 2005. Cafetales arbolados. Kurú: *Revista Forestal*. Costa Rica. Consultado en línea el 10 de Noviembre del 2015. Disponible en: [dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5123358.pdf](http://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5123358.pdf). 6p.
- Salustiano, M; Ampélio, E; Ferraz, A. 2007. Differences in the intensity and pustule expansion of coffee rust for two *Hemileia vastatrix* accesses. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1837 -1841, 2009.
- Segura, B. 2016. Efecto de la sombra en el cultivo del café sobre los procesos de esporulación, la dispersión a través de agua y la deposición, de *Hemileia vastatrix*, en Turrialba, Costa Rica. Tesis de maestría. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba. Costa Rica.
- Scholten, T; Gelbler, C; Goc, J; Kühn, P. Wlegand, C. 2011. A new splash cup to measure the kinetic energy of rainfall. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 174, 596–601p.
- Virginio Filho, E.d.M.; Hagggar, J.; Staver, C. 2002. Sostenibilidad y sinergismo en sistemas agroforestales con café: Estudio de largo plazo de interacciones agroecológicas.

Vis, M. 1986. Interception, drop size distributions and rainfall kinetic energy in four Colombian forest ecosystems. *Earth Surface Processes and Landforms* (6): 591-603.