

ESTUDIO DE METODOLOGÍAS PARA LA CONSERVACIÓN DE UREDINIOSPORAS DE LA ROYA DEL CAFETO

Carolina Escobar-Ochoa; Marco A. Cristancho-Ardila

RESUMEN

ESCOBARO., C.; CRISTANCHOA., M. Estudio de metodologías para la conservación de urediniosporas de la roya del café. *Cenicafé* 58(4): 324-332.2007.

La roya anaranjada del café (*Hemileia vastatrix*) es un parásito biotrófico que no ha sido posible cultivar *in vitro*, lo cual obliga al mantenimiento de aislamientos puros mediante ciclos continuos de inoculaciones en plantas susceptibles, que pueden afectar las características fenotípicas y genotípicas presentes en las poblaciones silvestres. Por esta razón se requieren sistemas de almacenamiento que preserven de manera eficaz y duradera la viabilidad y capacidad infectiva de urediniosporas de roya, recolectadas en el campo. Con este propósito se evaluó el efecto de tres temperaturas (4°C, -80°C y -196°C) para la conservación de urediniosporas y se determinó que las alternativas más promisorias son la congelación a -80°C y -196°C, las cuales permiten mantener un alto índice de viabilidad con porcentajes de germinación de 51 y 49% después de 304 y 366 días, respectivamente. En cuanto a la capacidad infectiva, se determinó que hasta el día 252 para -80°C y 320 para -196°C, el período de incubación fue de 14 a 17 días y el período de latencia fue de 28 a 31 días, datos que al ser comparados con el testigo (inóculo fresco) permiten proponer estas metodologías de conservación para su uso permanente en el laboratorio.

Palabras clave: *Hemileia vastatrix*, viabilidad, infectividad, métodos de conservación.

ABSTRACT

Orange coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) is a biotrophic parasite that has been impossible to cultivate *in vitro*, which forces the preservation of pure isolates by continuous cycles of inoculations in susceptible plants that can affect the phenotypic and genotypic characteristics present in the wild populations. For this reason, storage systems that efficiently and lastingly preserve the viability and infective capacity of coffee leaf rust urediniospores, collected from the field, are necessary. With the purpose of meeting that need, the effect of three temperatures (4°C, -80°C and -196°C) for urediniospores conservation was evaluated and it was determined that the most promising alternatives are freezing at -80°C and -196°C, which permit to maintain a high viability index with germination percentages of 51% and 49% after 304 and 366 days, respectively. As for the infective capacity, after 252 days for -80°C and 320 days for -196°C, the incubation period lasted between 14 and 17 days and the latency period lasted between 28 and 31 days. When these data are compared with the blank (fresh isolate) it is possible to propose these conservation methodologies for its permanent use in the laboratory.

Keywords: *Hemileia vastatrix*, viability, infectivity, conservation methods.

¹ Investigador Asociado e Investigador Científico II, respectivamente. Fitopatología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

El hecho que la roya anaranjada del cafeto sea un parásito obligado constituye un factor limitativo para estudiar su biología, debido a la dificultad de almacenar y multiplicar este patógeno *in vitro*. En la actualidad, el mantenimiento y la conservación de inóculos de urediniosporas de *H. vastatrix* se realiza *in vivo*, sobre cafetos en invernadero o en hojas desprendidas, en condiciones de humedad y temperatura controladas, y para ello se requieren frecuentes inoculaciones, lo cual aumenta el riesgo de contaminaciones con otras razas de roya o incluso con otros hongos. Estas frecuentes inoculaciones no permiten garantizar la estabilidad genética de las razas del hongo a largo plazo, lo que resulta incluso en pérdidas de algunas razas que fueron mantenidas sobre plántulas en invernadero, lo cual es un impedimento para la realización de estudios epidemiológicos, genéticos y fisiológicos. Adicionalmente, los costos de infraestructura y mantenimiento de los invernaderos son aspectos a considerar.

El principal objetivo de una adecuada metodología de conservación es mantener el microorganismo viable, sin cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos, hasta que sean requeridos para su uso a mediano o largo plazo. Una de las condiciones primordiales de todas las formas de preservación es la calidad del inóculo inicial, así como ajustar las mejores condiciones de humedad, temperatura, aireación e intensidad lumínica, entre otros, junto al establecimiento de un sistema de monitoreo, que permitan evaluar adecuadamente al microorganismo y su respuesta frente a dichos factores (4).

En Brasil, se han realizado estudios sobre almacenamiento a largo plazo de urediniosporas de roya, y los resultados indican que éstas permanecen viables por espacio de tres a cuatro semanas si son almacenadas bajo intensidad de luz normal, pero si se exponen a la luz directa del sol mueren a las 48h

(1). Igualmente, se ha determinado que factores como la temperatura y la humedad relativa juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la viabilidad y la capacidad infectiva de las urediniosporas, es así como una temperatura de 5°C y una humedad relativa alrededor de 50-80% ofrecen condiciones óptimas para la preservación de la viabilidad por un período de 100 días, aproximadamente; sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron a -196°C, seguido de un choque térmico a 40°C, durante 15 minutos (5).

Dada la importancia de los estudios de las razas fisiológicas, de la determinación de nuevas razas en la zona cafetera central colombiana y de la caracterización a nivel molecular de las mismas, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar y estandarizar, en las condiciones del laboratorio de Cenicafé, una metodología de conservación de *H. vastatrix* a bajas temperaturas (4°C, -80°C y -196°C), que garantice la viabilidad y la capacidad infectiva del hongo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las muestras. Para el presente estudio se recolectaron en el campo mezclas de urediniosporas, provenientes de la Estación Central Naranjal de Cenicafé, entre el año 2005 y 2006. Ninguno de los aislamientos recolectados tuvo reportes de aplicaciones de productos químicos dentro de los lotes de recolección ni en lotes adyacentes. De acuerdo con estas características, los lotes seleccionados fueron: La Floresta, El Reposo, 1321, Lote de Caturra autofecundado y Parque Clonal. La denominación de las muestras para cada tratamiento se presenta en la Tabla 1.

Las urediniosporas se recolectaron directamente de las hojas, posteriormente

se pesaron y se depositaron en cápsulas de gelatina, destinadas para cada uno de los siguientes tratamientos evaluados.

Conservación a 4°C. Se empleó un desecador de vidrio con una solución de ácido sulfúrico al 32,6% (v/v), para mantener una humedad relativa del 50% (3). En el desecador se dispusieron cajas de petri estériles que contenían las cápsulas de gelatina con las muestras (7mg/cápsula), éstas a su vez conservaban los aislamientos y evitaban las contaminaciones cruzadas, gracias a los tubos de 1,5mL en los que estaban contenidos.

Conservación en congelador a -80°C. Las cápsulas de gelatina se ubicaron dentro de viales de criopreservación *Nunc Cryotube vials®* y se dispusieron en cajas especiales para almacenar este tipo de tubos. Las esporas se sometieron a choque térmico durante 10 minutos, a una temperatura de 40°C, con el fin de romper la dormancia (5).

Conservación por congelación a -196°C.

Las cápsulas de gelatina se colocaron en un vial de criopreservación *Nunc Cryotube vials®* y se organizaron dentro de una manguera especialmente diseñada para soportar bajas temperaturas *Nunc Cryoflex®*. Posteriormente, este sistema se colocó sobre un soporte para mantenerlo fijo y poder sumergirlo en un tanque de nitrógeno de 22 litros. En el momento de la evaluación, de igual forma que para el ensayo anterior, las muestras se sometieron a choque térmico.

Ensayos de viabilidad. Por muestra se emplearon tres hojas sanas, desprendidas de plantas de café de la variedad Caturra. Para todos los tratamientos se utilizó una suspensión de urediniosporas de roya a una concentración de 0,5mg/mL, para inocular las hojas con cuatro gotas de 5µL, dos a cada lado de la nervadura principal. Posteriormente, las hojas se dejaron en cámara húmeda y en oscuridad, durante seis horas, tiempo

Tabla 1. Origen y denominación de los aislamientos recolectados por tratamiento.

Tratamiento	Muestra	Genotipo de origen	Lote Experimental
4°C	C-1	<i>C. arabica</i> var. Caturra	Lote 1321
	C-2	<i>C. arabica</i> var. Caturra	Lote 1321
	D-1	<i>C. arabica</i> var. Caturra	Lote 1321
	D-2	<i>C. arabica</i> var. Caturra	Lote 1321
-80°C	MA-1	<i>C. arabica</i> var. Caturra	Lote "La Floresta"
	MA-2	<i>C. arabica</i> var. Caturra	Lote "La Floresta"
	MC-1	<i>C. arabica</i> var. Caturra	Lote 1321
	MC-2	<i>C. arabica</i> var. Caturra	Lote 1321
	MF-1	<i>C. canephora</i>	Lote "Parque Clonal"
	MF-2	<i>C. canephora</i>	Lote "Parque Clonal"
-196°C	M1-1	<i>C. arabica</i> var. Caturra	Lote 1321
	M1-2	<i>C. arabica</i> var. Caturra	Lote 1321
	M2-1	<i>C. arabica</i> var. Caturra	Lote "El Reposo"
	M2-2	<i>C. arabica</i> var. Caturra	Lote "El Reposo"
	M3-1	<i>C. arabica</i> var. Caturra	Lote "La Floresta"
	M3-2	<i>C. arabica</i> var. Caturra	Lote "La Floresta"

después del cual se realizaron lecturas al microscopio para evaluar los porcentajes de germinación. Se evaluaron tres campos por gota y para cada campo, seleccionado al azar, se contaron el número total de esporas y el número de esporas germinadas. De esta manera se realizó la evaluación para todas las muestras de los tratamientos de congelación a -196°C y -80°C .

En el ensayo de almacenamiento a 4°C el montaje se realizó empleando sólo dos hojas de café del mismo genotipo y ocho inoculaciones, cuatro a cada lado de la nervadura central, con las mismas condiciones de incubación de los tratamientos anteriores. Se realizó la evaluación al microscopio, de cuatro campos por cada una de las cuatro gotas inoculadas, se contaron el número total de esporas y el número de esporas germinadas. Para esta metodología, al igual que para los tratamientos anteriores, se incluyó un ensayo previo de calidad del inóculo mediante la evaluación en el día cero, seguido de un incremento gradual pero con intervalos más cortos, dado que reportes anteriores señalan un menor tiempo de viabilidad de las urediniosporas a esta temperatura (5). Las evaluaciones se realizaron a los 5, 15, 20 y 40 días.

Ensayos de la capacidad infectiva. Para los ensayos de la capacidad infectiva se tomaron muestras de los tratamientos a -80°C y -196°C , a los 252 y 320 días de congelación, respectivamente. Debido a la dificultad de conseguir en un mismo tiempo la cantidad de urediniosporas requerida para el montaje y así evaluar cada metodología de manera simultánea, los tratamientos se establecieron en tiempos diferentes. Estas muestras fueron sometidas a un choque térmico de 40°C por 10 minutos.

La evaluación de la capacidad infectiva incluyó la determinación del Período de Incubación (PI) y del Período de Latencia

(PL). Para estos ensayos se emplearon tres hojas desprendidas por muestra, en las cuales se adicionaron cuatro gotas de una suspensión de urediniosporas ($0,5\text{mg/mL}$), dos a cada lado de la nervadura principal. Las hojas se mantuvieron en cámara húmeda en oscuridad, durante 22h. El cuarto de crecimiento donde se realizaron los ensayos tuvo una temperatura entre $19-23^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de 60%. Se empleó un inóculo fresco de urediniosporas de roya como control positivo y hojas sanas de variedad Caturra sin inocular, como control negativo; ambos controles se sometieron a las mismas condiciones de las muestras evaluadas. El PI se determinó tomando el tiempo en el cual al menos el 50% de las gotas inoculadas presentaron la aparición de síntomas, y para la evaluación del PL se registró para cada tratamiento el tiempo en el cual más del 50% de las lesiones presentó signos de esporulación.

A las urediniosporas conservadas a 4°C no se les evaluó el PI y el PL, debido a que para el tiempo de evaluación de estas variables no se contaba con muestras suficientes de este tratamiento.

Análisis estadístico. La determinación de la viabilidad de las urediniosporas se realizó con la variable porcentaje de germinación (PG), obtenida a partir de la sumatoria del total de esporas germinadas (TEG) sobre la sumatoria del número de esporas totales (TE) de la unidad experimental (hoja), en cada tiempo de evaluación.

En cada tratamiento, los promedios de los porcentajes de germinación de los tiempos evaluados se sometieron a análisis de varianza y al presentarse diferencias significativas fueron comparados mediante la prueba de Duncan al 5%. Adicionalmente, se estimó para cada tratamiento la tasa diaria de pérdida de viabilidad, a través del coeficiente de

regresión lineal de la relación inversa entre el porcentaje de germinación y el tiempo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos de viabilidad. La viabilidad de las urediniosporas de roya conservadas a 4°C mostró una tendencia a disminuir de manera más rápida que en los demás tratamientos (Figura 1). Se presentaron diferencias significativas en el promedio de germinación entre el día 19 y el día 90 (Tabla 2), con una reducción del 12%. Estudios realizados por Capucho y Zambolim¹ en Brasil, mostraron que a 4°C y con una humedad del 50%, la capacidad de germinación se conserva solamente en un 20% a los 75 días, y la pérdida completa de viabilidad ocurre a los 150 días. Debido

a la baja oferta de esporas disponibles para su recolección en el campo, esta metodología no pudo evaluarse por períodos más prolongados.

La conservación a -80°C mostró un comportamiento estable en el porcentaje de germinación, en los tiempos de evaluación, con valores superiores al 50% (Tabla 2 y Figura 1). Estudios similares, realizados en Brasil, demostraron también que este tratamiento es eficiente y mantiene la viabilidad de las urediniosporas por encima del 40%, después de 360 días del inicio de las pruebas¹. Estos resultados indican que la conservación a -80°C podría ser una opción muy promisoriosa para la conservación de urediniosporas de roya a largo plazo.

¹ CAPUCHO, A.; ZAMBOLIM L. Preservação de uredosporos da ferrugem do caféiro (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.) *in vitro*. 2005. Comunicación personal.

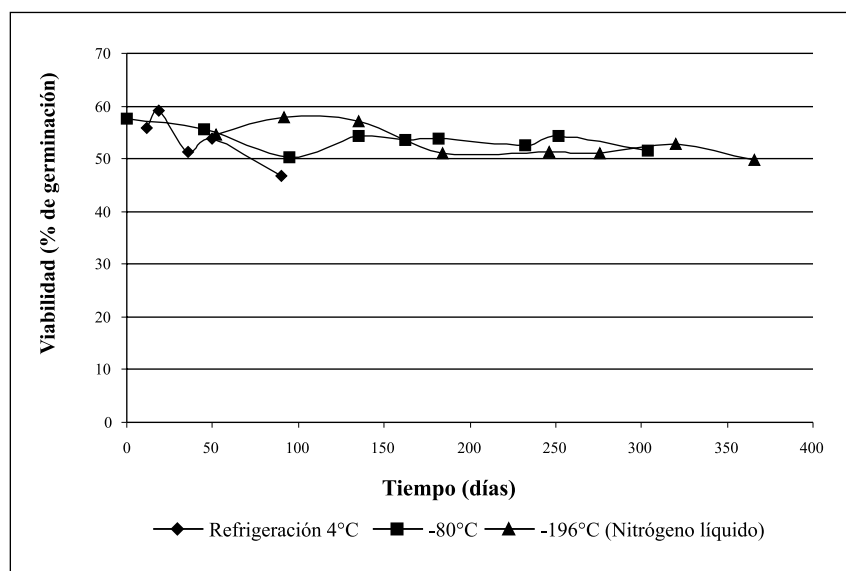


Figura 1. Viabilidad de las urediniosporas de *H. vastatrix* a tres temperaturas de almacenamiento.

En el tratamiento a -196°C no se registraron diferencias estadísticamente significativas entre las germinaciones obtenidas a los 184 y 366 días, y después de un año la disminución en el porcentaje de germinación fue solo del 4,8%. Esta metodología permitió conservar la capacidad de germinación de las urediniosporas en niveles cercanos al 50%, durante un año, lo cual indica que este tratamiento también estaría dentro de las alternativas viables para la conservación a largo plazo (Tabla 2). Uno de los aspectos importantes que se comprobó durante el desarrollo del estudio es la importancia de la calidad del inóculo inicial (datos no publicados). En ensayos preliminares se determinó que las urenidiosporas provenientes de cafetales en los cuales se realizaba algún

tipo de aplicación de productos químicos, presentaron porcentajes de germinación por debajo del 50%, lo cual afectó la eficiencia de las metodologías a través del tiempo.

Es de anotar que aunque la prueba de Duncan mostró diferencias significativas entre los promedios de cada uno de los tres tratamientos al comienzo y al final de los periodos de almacenamiento (Tabla 2), los ensayos de la capacidad infectiva mostraron que los aislamientos permanecían infectivos para los tratamientos a -80°C y -196°C .

Las tasas de pérdida diaria de viabilidad fueron de $0,130\pm 0,055$ para el tratamiento a 4°C , de $0,015\pm 0,005$ para el tratamiento a -80°C y de $0,020\pm 0,005$ para el tratamiento

Tabla 2. Promedios y variaciones del porcentaje de germinación de urediniosporas de *Hemileia vastatrix*, conservadas a diferentes temperaturas a lo largo del tiempo.

Tratamiento	Día	\bar{X}	C.V.
4°C (n=16)	12	55,94 ab	8,59
	19	59,24 a	6,18
	36	51,28 c	6,65
	50	53,89 bc	4,83
	90	46,80 d	10,39
-80°C (n=12)	0	57,49 a	8,85
	45	55,48 ab	6,36
	95	50,42 b	6,3
	135	54,22 ab	4,96
	162	53,45 ab	4,55
	182	53,81 ab	6,03
	232	52,59 ab	5,18
	304	51,59 b	7,45
-196°C (n=12)	52	54,57 bc	4,51
	92	57,84 a	4,02
	135	57,11 ab	6,62
	184	50,99 d	7,34
	246	51,22 d	3,07
	276	51,10 d	2,47
320	52,88 dc	4,65	
366	49,77 d	2,01	

* Para cada tratamiento, letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Duncan al 5%. \bar{X} : Promedio; C.V.: Coeficiente de variación.

a -196°C . La viabilidad se perdió de una manera significativa cuando las urediniosporas de roya se conservaron a 4°C , dado que la tasa de cambio es la mayor, comparada con los demás tratamientos, de acuerdo con la prueba de t al 5% (Figura 2), lo que confirma lo reportado por Capucho y Zambolim¹.

Los tratamientos a -80°C y -196°C presentaron las menores tasas de pérdida diaria de viabilidad a través del tiempo y son estadísticamente iguales hasta los 304 y 366 días, respectivamente (prueba t al 5%) (Figura 2); esto indica que son metodologías que permiten conservar urediniosporas de roya de manera exitosa por largos períodos.

Ensayos de la capacidad infectiva. Los resultados muestran que para los tratamientos a -80°C y -196°C se mantuvo la capacidad de inducir síntomas visibles (manchas cloróticas) sobre hojas desprendidas, a los 14 y 17 días (Tabla 3). Al comparar estos PI con el obtenido en el control positivo, se puede observar que la diferencia en el tiempo de aparición de los síntomas no difiere de forma significativa, si se tiene en cuenta que se empleó inóculo fresco recolectado

e inoculado el mismo día del desarrollo de la prueba, en tanto que las urediniosporas conservadas a bajas temperaturas ya tenían 252 y 320 días de almacenamiento. Mediciones de PI de roya en la zona cafetera sobre plantas en el invernadero demostraron que el tiempo en el cual el 50% del material vegetal presenta la sintomatología esperada fluctuó entre 18 y 24 días, sujeto a cambios medioambientales (2).

Para el caso de la estimación del PL, la esporulación del patógeno se registró a los 28 y 31 días de haber sido inoculadas en hojas desprendidas, en los tratamientos a -80°C y -196°C , respectivamente (Tabla 3); alrededor del 50% de las muestras evaluadas tuvieron el mismo tiempo de PL que el control positivo, esto indica que a pesar de los períodos de conservación bajo el cual estuvieron las muestras (indistintamente del tratamiento), éstas mantienen de forma satisfactoria sus características biológicas y fisiológicas. De igual forma la determinación de PL en la zona cafetera demuestra que esta condición se obtiene de 32 a 36 días; al igual que el PI, la aparición del PL está altamente relacionada con factores medioambientales (2).

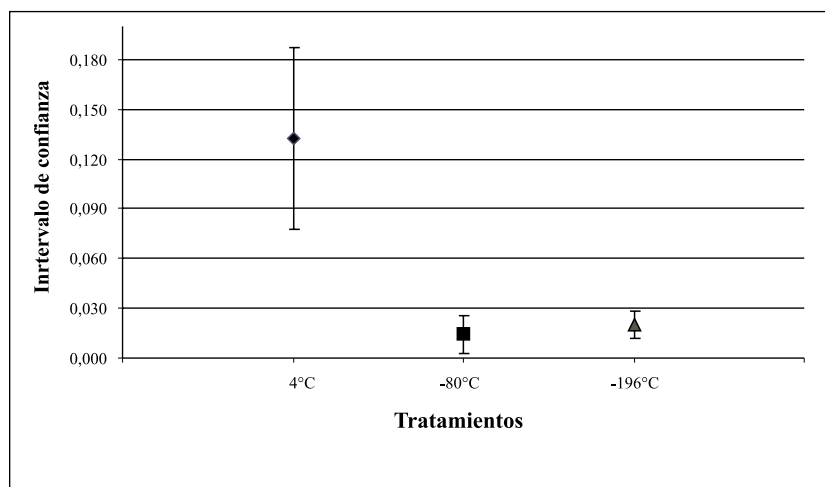


Figura 2. Intervalos de confianza para la estimación de la tasa de pérdida diaria de viabilidad para los tres tratamientos evaluados.

La variación en los tiempos de aparición de los síntomas y los signos puede deberse a que estas características están muy ligadas a factores ambientales, como se mencionó anteriormente, y probablemente el microclima generado dentro las cámaras húmedas influyó en la aparición temprana de cada uno de ellos, en comparación con lo reportado en el campo.

Estudios relacionados con la capacidad infectiva de *H. vastatrix*¹ determinaron que el mejor índice de capacidad infectiva (75% a los 210 días) se obtuvo en aquellas muestras que se conservaron a -80°C, con un tratamiento previo en nitrógeno líquido, perdiendo completamente su infectividad a los 20 días, lo cual es un resultado contrastante con lo obtenido en este estudio, ya que los ensayos demostraron que a los 252 días las urediniosporas mantienen un índice aceptable tanto de viabilidad como de capacidad infectiva. Es importante resaltar que el promedio del porcentaje de germinación del inóculo con el cual se partió en el presente

estudio fue superior al 50% para los tres tratamientos, comparado con el estudio realizado en Brasil, en el cual el inóculo inicial tenía un porcentaje de germinación cercano al 40%. Este resultado muestra la importancia de iniciar el almacenamiento de aislamientos de roya que tengan una calidad inicial óptima y que presenten porcentajes de germinación superiores al 50%. Otro aspecto que se debe tener en cuenta en la recolección de razas del patógeno en plantas en el campo o en el invernadero es evitar la presencia de hiperparásitos, los cuales pueden afectar la viabilidad de manera significativa (1), por lo que se debe evitar recolectar muestras con cualquier tipo de aparición de *Lecanicillium lecanii*, ácaros u otro organismo. Las muestras recolectadas deben provenir de hojas que posean lesiones jóvenes bien esporuladas.

Es importante haber desarrollado una metodología eficiente para la conservación de urediniosporas de *H. vastatrix* que logre mantener estables las características a nivel

Tabla 3. Determinación del Período de Incubación (PI) y el Período de Latencia (PL) de las urediniosporas inoculadas en hojas desprendidas de *Coffea arabica* variedad Caturra, para los tratamientos a -80°C y -196°C.

Tratamiento	Muestra	PI (días)	PL (días)
-80°C	MA-1	17	31
	MA-2	17	31
	MC-1	17	31
	MC-2	17	31
	MF-1	14	28
	MF-2	14	28
-196°C	M1-1	17	28
	M1-2	17	28
	M2-1	14	28
	M2-2	14	28
	M3-1	14	28
	M3-2	14	28
Control (+)		12	28

fisiológico, patogénico y genético. Hasta el momento se ha podido comprobar que temperaturas de congelación a -80°C y -196°C son alternativas viables para ser adoptadas en Cenicafé para el mantenimiento del patógeno, aspecto clave en estudios de razas fisiológicas del microorganismo y de mejoramiento genético de café, relacionados con resistencia a la roya.

A nivel práctico, la adopción de cualquiera de estas metodologías está sujeta al tipo de experimento que determine el tiempo de conservación deseado, a los costos de mantenimiento y a la disponibilidad de cada uno de los elementos implicados. Para el caso del tratamiento a 4°C el costo total aproximado es de \$650.000 por año, para el tratamiento a -80°C , excluyendo el valor del congelador el cual ya está disponible en las instalaciones de Cenicafé, el costo aproximado es de \$900.000 por año, y finalmente, el tratamiento a -196°C tiene un costo aproximado de \$3.000.000 por año, incluyendo el valor del tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido de una capacidad de 22-25L y una cantidad aproximada de 104L de N_2 líquido; sin embargo este valor se reduce a la mitad si no se incluye el valor del tanque.

Al tener en cuenta estas consideraciones, la metodología más indicada para la conservación de urediniosporas de *H. vastatrix* es la congelación a -80°C , evaluada hasta los 304 días, y el único requerimiento especial es disponer de un compartimento exclusivo para ensayos de conservación, con el fin de evitar los cambios de temperatura al abrir y cerrar permanentemente el congelador. El tratamiento de congelación a -196°C requiere una revisión constante de los niveles de

nitrógeno líquido y el espacio suficiente en el tanque para el almacenamiento seguro de las muestras, factores que hacen que este tratamiento no sea muy promisorio en el largo plazo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Jorge D. Ocampo y Carlos A. González su colaboración durante el desarrollo del estudio. A la doctora Esther Cecilia Montoya de la Disciplina de Biometría. Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por la cofinanciación del estudio.

LITERATURA CITADA

1. KUSHALAPPA, A.C.; ESKES, A.B. Advances in coffee rust research. Annual Review of Phytopathology 27: 503-531. 1989.
2. LEGUIZAMÓN C., J.E.; OROZCO G., L.; GÓMEZ G., L. Periodos de Incubación (PI) y de latencia (PL) de la roya del café en la zona cafetera central de Colombia. Cenicafé 49 (4): 325-339. 1998.
3. ROMEIRO, R. Germinacao e poder infectivo dos uredosporas de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. mantenidos sobre diferentes produtos vegetais o susceptive. Vicosá, Universidade Federal de Vicosá, 1971. p. 41. (Tesis: M.S)
4. SMITH, D.; ONIONS, A. The preservation and maintenance of living fungi. Surrey, Commonwealth Mycological Institute, 1093. p. 5.
5. ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G. Efeito de baixas temperaturas e do binómio temperatura-umidade relativa sobre a viabilidade dos uredosporas de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. e *Uromyces phaseoli typica* Arth". Experimentiae 17 (7): 151-184. 1974.