

EVOLUCIÓN DE RAZAS DE *Hemileia vastatrix* EN COLOMBIA

Marco Aurelio Cristancho-Ardila*; Carolina Escobar-Ochoa**;
Jorge Dickson Ocampo-Muñoz*

RESUMEN

CRISTANCHO A., M.; ESCOBAR O., C.; OCAMPO, J.D. Evolución de razas de *H. vastatrix* en Colombia. Cenicafé 58(4): 340-359.2007.

Se estudió la evolución de la roya del café en materiales susceptibles a la enfermedad, en derivados del Híbrido de Timor y en plantas diferenciales en Colombia; también se investigó la diversidad genética del patógeno por medio del análisis de secuencias de ADN ribosomal. Este estudio permitió observar el incremento de plantas en el campo susceptibles a la enfermedad a través de los años. La identificación de roya en ciertos materiales diferenciales desarrollados en el CIFC confirma la presencia de la raza XXIX en Colombia o una raza con un genotipo muy similar. El análisis de agrupamiento de las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 de *H. vastatrix* aislados de materiales de las variedades Caturra y Colombia, reveló la diversidad genética de las razas de roya en Colombia. La secuencia encontrada con mayor frecuencia en la población estudiada está distante de las secuencias de las razas II y XXII, por tanto se presume que el tiempo que han permanecido estas razas en el país ha permitido su diversidad en nuevas razas. Los resultados confirman que *H. vastatrix* es un hongo con una alta tasa de mutación, con una alta probabilidad de adaptación para superar los genes de resistencia de su hospedero.

Palabras clave: Roya del café, virulencia, incidencia de roya, diversidad genética, ADN ribosomal, marcadores ITS.

ABSTRACT

The evolution of coffee leaf rust in susceptible materials, in Timor Hybrid derivatives and in differential plants in Colombia was studied; the genetic diversity of the pathogen was also examined by analyzing ribosomal DNA sequences. This study showed the increase of plants susceptible to the disease through the years. The coffee leaf rust identification in certain differential materials developed at CIFC confirms the presence of race XXIX in Colombia or a race with a similar genotype. The clustering analysis of the regions ITS1, 5.8S and ITS2 isolated from Caturra and Colombia varieties revealed the genetic diversity of coffee leaf rust races in Colombia. The sequence with the highest frequency in the studied population is distant from race II and race XXII sequences, which indicates that the time that these races have been in the country has led to their diversity in new races. The results confirm *H. vastatrix* is a high-rate mutation fungus with an ever higher probability of adaptation to overcome resistance of its host.

Keywords: Coffee leaf rust, virulence, rust incidence, genetic diversity, ribosomal DNA, ITS markers.

* Investigador Científico II, Investigador Asociado y Auxiliar III de Investigación, respectivamente. Fitopatología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

La roya del cafeto, causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, es la principal enfermedad que ataca al cultivo, y en Colombia puede causar pérdidas hasta del 23% en variedades susceptibles de la especie *Coffea arabica*, si no se efectúa control (20). La evolución de la aparición de razas del patógeno ha tenido un progreso muy similar en la mayoría de países productores de café en el mundo, debido a que en todos los casos se identificó la presencia inicial de la raza II, con el posterior desarrollo de otras razas diferentes genéticamente, a partir de este inóculo inicial (29). Las razas del patógeno han sido estudiadas en el CIFC (Centro de Investigaciones de las Royas del Café), en Portugal, en colaboración con varios países productores, y estos estudios han demostrado la presencia de más de 30 razas del patógeno, identificadas a partir de una serie de más de 40 diferenciales de café (21). La raza II ha sido históricamente la raza prevalente en la mayoría de países y ataca todas las variedades cultivadas de la especie *C. arabica* que no han sido mejoradas genéticamente por resistencia al patógeno (21).

La presencia de múltiples razas de la roya, en cada uno de los países productores de café en el mundo, es una realidad bien establecida (3, 21). Solamente en algunos países como Venezuela, parece encontrarse muy poca variabilidad del patógeno, dado que sólo se han identificado las razas I y II (24); aunque esto puede deberse a la reciente introducción del patógeno a este país al momento de la realización del estudio, lo que podría significar que las nuevas razas del patógeno apenas estaban evolucionando allí.

Muchos programas de mejoramiento de café en el mundo tienen como objetivo el desarrollo de materiales resistentes a la roya anaranjada. Uno de los materiales de café más utilizados en estos programas

es el Híbrido de Timor, una colección de plantas resultado de un cruce natural entre *C. arabica* y *C. canephora*, en la isla portuguesa de Timor. En general, se han utilizado tres introducciones del Híbrido, realizadas por el CIFC, denominadas 832, 2252 y 1343 (21). En Colombia se utilizó la introducción del Híbrido de Timor 1343 para el programa de mejoramiento y para la producción de la variedad Colombia (5). Derivados de cruces del Híbrido de Timor 832/1 con otros materiales de *C. arabica* han dado lugar a algunos diferenciales del CIFC y la introducción original de este Híbrido es representativo del grupo A de plantas diferenciales, grupo que es resistente a todas las razas de roya conocidas (21).

Las plantas diferenciales para la roya en café son un grupo de plantas, aproximadamente 40, que han sido desarrolladas en el CIFC, para la identificación de razas del patógeno. Estas plantas están compuestas por variedades de café de diferentes especies, que poseen entre uno y cinco genes de resistencia al patógeno, y de acuerdo a este número de genes se clasifican en grupos fisiológicos (21).

Para el programa de mejoramiento en Cenicafé, es importante conocer la composición de razas de la roya en el país y su evolución en el tiempo (1). En Colombia se identificó inicialmente la raza II (16) a la llegada del patógeno al país, posteriormente se identificaron cuatro razas de genotipos complejos (4), así como la raza XXII (11), y existe evidencia de la presencia de las razas XXV, XXIII, XVII y XXX en materiales derivados del Híbrido de Timor (1). Cabe anotar que las plantas diferenciales no han permitido la identificación de nuevas razas de la roya presentes en Colombia en materiales derivados del Híbrido de Timor (13), y se estima que deben existir más de diez razas distintas atacando estas plantas derivadas en el país.

Los cambios en la virulencia del patógeno se han reflejado en la aparición de nuevos aislamientos del patógeno, capaces de infectar materiales que en un principio eran resistentes (1). Los estudios de evolución e identificación de nuevas razas de patógenos de plantas tienen gran importancia, ya que no se debe descartar la aparición de razas hipervirulentas que pueden ser devastadoras para un cultivo; el reciente caso de la aparición de la raza *ug99* de la roya negra del trigo *Puccinia graminis*, que ha tenido efectos dramáticos en la reducción de la producción del cultivo en África (26), ilustra la precaución que se debe tener en la vigilancia del desarrollo de razas de los microorganismos fitopatógenos.

Gouveia *et al.* (13) demostraron la diversidad genética de las nuevas razas de roya de Colombia, utilizando marcadores moleculares RAPD, pero no pudieron asociar los patrones de bandas obtenidos con el origen geográfico de las razas, con su espectro de virulencia o con las razas fisiológicas individuales. Es necesario por tanto, desarrollar nuevos marcadores moleculares para *H. vastatrix*, que permitan estudiar la población del patógeno y su evolución en los materiales de café sembrados en Colombia. Varios tipos de marcadores moleculares se han utilizado para la diferenciación de aislamientos de una gran diversidad de hongos, incluidas las royas, y dentro de las secuencias más utilizadas se encuentra el ADN ribosomal (2, 6).

Existen en la red bases de datos públicas especializadas en el almacenamiento y el estudio de secuencias de ADN ribosomal (<http://www.psb.ugent.be/rRNA/>), y estos marcadores ya han sido utilizados en estudios de diversidad de patógenos del café como el hongo *Ceratocystis fimbriata*, agente causal de la llaga macana del café (18).

Debido a la preocupación por el aumento de materiales derivados del Híbrido de Timor

con presencia de roya, y con el objetivo de estudiar la diversidad de las razas de roya del café presentes en Colombia se ensayaron marcadores moleculares ITS, y sus secuencias se compararon con las obtenidas en otras razas estudiadas en el CIFC. En el presente trabajo se muestra la evolución de la roya del café en materiales de café susceptibles a la enfermedad, en derivados del Híbrido de Timor y en plantas diferenciales en Colombia, y la diversidad genética del patógeno estudiada por medio del análisis de secuencias de ADN ribosomal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudios en el campo

Material de café. Se emplearon genotipos diferenciales desarrollados en el CIFC, así como plantas derivadas del cruce entre la variedad Caturra y el Híbrido de Timor 1343 (Tabla 1), los cuales se propagaron por vía vegetativa a partir de estacas, y se sembraron en La Granja en Cenicafé, en la Estación Central Naranjal y en las Subestaciones La Catalina, Paraguaicito y El Rosario. El desarrollo de lesiones de roya se determinó realizando tres lecturas por año, en las cuales se registró la presencia o ausencia de la enfermedad en todas las hojas de los árboles, y por medio de lectura del desarrollo de la enfermedad usando la escala (0-9), de Eskes y Toma-Braghini (8), la cual mide cero en plantas libres de roya y nueve en plantas atacadas completamente.

Los materiales diferenciales que se escogieron para este estudio se definieron basados en el hecho de que sirven para la identificación de las razas que pueden atacar a la especie *C. arabica* y derivados del Híbrido de Timor.

Los genes de resistencia que presentan estos materiales diferenciales están presentes en los derivados del Híbrido de Timor que componen las variedades comerciales resistentes que se siembran en Colombia.

Estudios moleculares

Extracción de ADN de la roya. Las muestras de roya utilizadas en los estudios moleculares se recolectaron en la Estación Central Naranjal, en la Subestación Paraguaicito y en la Finca Santa Bárbara en Sasaima (Cundinamarca), durante los años 2005 y 2006, a partir de los genotipos de *C. arabica* var. Caturra y var. Colombia, así como de razas referencia enviadas por el CIFC (Tabla 2). Las extracciones de roya se realizaron por medio de una modificación del protocolo descrito por Goodwin y Lee (12).

Para la extracción de ADN, las urediniosporas de cada aislamiento de roya se depositaron en tubos Eppendorf, se adicionaron 300µL de buffer de lisis (50mM

de tris HCl pH 7,5; 50mM de EDTA pH 8,0; 3% de SDS; 1% de Mercaptoetanol) y se maceró la solución. Una vez se fraccionaron totalmente las urediniosporas, se destapó el tubo Eppendorf y se introdujo en un horno microondas, al nivel máximo de poder, durante 20s, luego por 15s y por último por 10s, y se tuvo cuidado de que no se presentara ebullición.

Posteriormente, se adicionaron 300µL adicionales de buffer de lisis, el tubo se agitó en un Vortex, y se incubó en un baño María a 80°C durante 10min. Una vez los tubos se enfriaron, hasta llegar a una temperatura de 50°C, se agregaron 10µL de proteinasa K (0,5mg.mL⁻¹), se agitaron en Vortex y se incubaron a 50°C durante 30min. Se agregaron 700µL de Fenol:Cloroformo:Isoamilalcohol (25:24:1), se mezcló suavemente hasta obtener una emulsión y se centrifugó a 10.000rpm durante 10min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se adicionó el mismo volumen de Cloroformo:Isoamilalcohol (24:1). Se hizo una mezcla suave y se centrifugó a 10.000

Tabla 1. Plantas diferenciales desarrolladas en el CIFC en Portugal y utilizadas para la identificación de posibles nuevas razas de *H. vastatrix* en Colombia.

Selección de café	Genotipo	Grupo fisiológico	Susceptibilidad a la roya
Caturra	SH5	E	Susceptible a 22 razas (incluyendo la raza II)
HdT (1343/269)	SH6	R	XXII - XXV - XXVI - XXVII - XXVIII - XXIX - XXXI
H.420/2*	SH5,8	2	XXIX - XXX
H.419/20*	SH5,6,9	3	XXIX - XXXI
H.420/10*	SH5,6,7,9*	1	XXIX
HDT (832/1)	SH5,6,7,8,9 + ?	A	
HDT (832/2)	SH5,6,7,8,9 + ?	A	

* H.420 = Mundo Novo 1535/33 x HW 26/14
H.419 = Mundo Novo 1535/33 x HW 26/13

Tabla 2. Origen geográfico y genotipos de café a partir de los cuales se aislaron las muestras de roya utilizadas en los estudios moleculares.

Identificación	Material de café	Origen geográfico
HvCTInNa1	<i>C. arabica</i> var. Caturra	1
HvCTInNa2	<i>C. arabica</i> var. Caturra	1
HvCTInNa3	<i>C. arabica</i> var. Caturra	1
HvCTSas4	<i>C. arabica</i> var. Caturra	2
HvCTCat2-2	<i>C. arabica</i> var. Caturra	1
HvCTSol_1	<i>C. arabica</i> var. Caturra	4
HvCTSol_2	<i>C. arabica</i> var. Caturra	4
Hv_2_N	<i>C. arabica</i> var. Caturra	1
Hv_3_N	<i>C. arabica</i> var. Caturra	1
Hv_3	<i>C. arabica</i> var. Caturra	1
Hv_4-8	<i>C. arabica</i> var. Caturra	1
Hv_7_N	<i>C. arabica</i> var. Caturra	1
Hv_8	<i>C. arabica</i> var. Caturra	1
Hv_9-8	<i>C. arabica</i> var. Caturra	3
Hv_9_N	<i>C. arabica</i> var. Caturra	1
Hv_12-v	<i>C. arabica</i> var. Caturra	3
Hv_13-v	<i>C. arabica</i> var. Caturra	3
Hv_18_N	<i>C. arabica</i> var. Caturra	1
Hv_21_N	<i>C. arabica</i> var. Caturra	1
Hv_22-8	<i>C. arabica</i> var. Caturra	3
Hv_28_v	<i>C. arabica</i> var. Caturra	3
Hv11	<i>C. arabica</i> var. Caturra	3
HV_12	<i>C. arabica</i> var. Caturra	3
Hv13	<i>C. arabica</i> var. Caturra	3
Hv16	<i>C. arabica</i> var. Caturra	3
HvVColPa4_2	<i>C. arabica</i> var. Colombia	3
HvVColPa3_4	<i>C. arabica</i> var. Colombia	3
HvVColPa3_3	<i>C. arabica</i> var. Colombia	3
HvVColPa3_2	<i>C. arabica</i> var. Colombia	3
HvVColPa3_1	<i>C. arabica</i> var. Colombia	3
HvVColPa1_3	<i>C. arabica</i> var. Colombia	3
HvVColPa1_2	<i>C. arabica</i> var. Colombia	3
HvVColSol_3	<i>C. arabica</i> var. Colombia	4
RazaXXII-535	CIFC-Portugal	5
RazaXXII-637	CIFC-Portugal	5
RazaII-1126	CIFC-Portugal	5

1. Estación Central Naranjal, Chinchiná, Caldas
2. Finca Santa Bárbara, Sasaima, Cundinamarca
3. Subestación Experimental Paraguaicito, Buenavista, Quindío
4. Finca La Soledad, Buenavista, Quindío
5. Origen geográfico desconocido

rpm por 10min; este procedimiento se repitió dos veces. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se adicionaron dos volúmenes de isopropanol frío para precipitar durante 16 horas. El *pellet* resultante se obtuvo centrifugando los tubos a 10.000rpm durante 5min, se descartó el sobrenadante, y los *pellets* se lavaron con 480μL de etanol al 70% y 120μL de NaCl 5M. El precipitado se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 40μL de buffer EB. Se adicionaron 12μL de RNAsa A y se incubó a 37°C por 30 min, finalmente para desactivar la enzima se incubó a 65°C por 10 min.

PCR de regiones ribosomales. Se utilizaron los cebadores universales (*primers*) ITS1 e ITS4 para la amplificación de regiones del ADN ribosomal, que comprende las regiones ITS1, 5.8S e ITS2, y parte de la región 28S (27). Esta región se ha usado ampliamente en estudios de diversidad genética de hongos y otros grupos de organismos.

Las reacciones de PCR se realizaron por medio de la adición de 2mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 0,4μM de cada primer, 1X Buffer PCR, 1,25 de Taq DNA polimerasa (GIBCO BRL, Carlsbad, CA, USA) y 25ng de ADN de cada muestra de roya. Las reacciones de amplificación se realizaron usando una temperatura inicial de denaturación a 95°C por 5min, seguido por 30 ciclos de 1,5min a 94°C, 1 min a 55°C, y 2 min a 72°C. El ciclo final de elongación se realizó a 72°C por 5min. Los fragmentos de las regiones ITS amplificadas se separaron en geles de agarosa al 1,5%, se visualizaron por medio de luz ultravioleta con 2μL de bromuro de etidio, se clonaron en un vector p-GEM-T (Promega), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los fragmentos clonados se secuenciaron en un analizador Applied Biosystems 3730xl por la compañía Macrogen (Woore Building, Seoul, Korea).

Análisis de agrupamiento. Las secuencias de ADN se alinearon usando el programa CLUSTAL W usando la matriz de identidad, y los valores GAPOPEN= 15, ENDGAP=-1, GAPEXT=6,66, GAPDIST=4 (25). El análisis cladístico de los datos (917 caracteres que incluyeron las regiones completas ITS1, 5.8S e ITS2 y parte de la región 28S) se realizó por medio del cálculo de la matriz de distancias entre todos los pares de secuencias y la aplicación del método Neighbor Joining a la matriz de distancias del programa PHYLIP (10). Para el análisis se incluyó la secuencia publicada de la región del rRNA ribosomal de *H. vastatrix* (GenBank DQ022191) y como *outgroup* se utilizó la secuencia de la misma región de *Puccinia allii* (AY187091).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios en el campo. En materiales derivados de los Híbridos de Timor 1343, 832/1, 832/2 y 2252 se observa el incremento de las plantas atacadas por las razas de roya, a lo largo del período 2000 a 2006 (Tabla 3), aunque algunos derivados de estas introducciones han permanecido libres del patógeno. Es notable la inestabilidad de muchas de las nuevas razas que atacan estas introducciones, ya que en algunos años aparece roya en plantas resistentes y en los años siguientes desaparece; dentro de estos casos se puede observar la dinámica de la enfermedad en las introducciones 1343/1450, 1343/1492, 1343/1653 y 1343/1655. De acuerdo a datos obtenidos por Alvarado y Moreno (1), plantas originales (generación S₀) de las introducciones 832/1, 832/2 y 1343 del Híbrido de Timor, permanecieron libres de la enfermedad hasta el año 2004, en tanto que la introducción original 2252 ya presentaba roya antes de ese año. Es de anotar que la introducción 2252/2, incluida en este estudio, permanece libre de roya hasta el año 2006.

Tabla 3. Evolución en la presencia (+) o (ausencia (-) de lesiones esporuladas de roya en materiales de Híbrido de Timor ubicados en la Estación Central Naranjal (Chinchiná, Caldas).

Introducción Híbrido de Timor	Clon	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
H T 1343	334	-	+	-	-	+	+	+
H T 1343	439	-	+	-	+	+	+	+
H T 1343	493	-	-	-	-	-	-	+
H T 1343	506	-	-	-	-	+	+	+
H T 1343	525	-	-	-	-	-	-	+
H T 1343	539	-	-	-	+	-	+	+
H T 1343	584	+	-	-	-	+	+	+
H T 1343	589	-	-	-	-	-	-	+
H T 1343	597	-	-	-	-	-	-	+
H T-1343 (CV2)	674	-	-	-	-	+	-	+
H T-1343 (CV1)	1420	-	+	-	+	+	+	+
H T-1343 (CV2)	1421	-	-	-	+	+	+	+
H T-1343 (CV9)	1422	-	-	-	-	+	+	+
H T-1343 (CV7)	1449	-	-	-	-	+	+	+
H T-1343 (CV4)	1491	-	-	-	+	-	+	+
H T 1343	1609	-	+	+	+	+	+	+
H T 1343	2007	-	-	-	+	+	+	+
H T 1343	489	-	-	-	-	-	-	-
H T 1343	490	-	-	-	-	-	-	-
H T 1343	491	-	-	-	-	-	-	-
H T 1343	492	-	-	-	-	-	-	-
H T 1343	503	-	-	-	-	-	-	-
H T 1343	526	-	-	-	-	-	-	-
H T 1343	528	-	-	-	-	-	-	-
H T 1343	537	-	-	-	-	-	-	-
H T 1343	538	-	-	-	-	-	-	-
H T 1343	540	-	-	-	-	+	-	-
H T 1343	541	-	-	-	-	-	-	-
H T 1343	542	-	-	-	-	-	-	-
H T 1343	543	-	-	-	-	-	+	-
H T 1343	582	-	-	-	-	-	-	-
H T 1343	585	-	-	-	-	-	-	-
H T 1343	586	-	-	-	-	-	-	-
H T 1343	587	-	-	-	-	-	-	-
H T 1343	588	-	-	-	-	-	-	-
H T 1343	599	-	-	-	-	-	-	-
H T 1343	600	-	-	-	-	-	-	-
H T-1343 (CV3)	1450	-	-	-	+	-	+	-
H T-1343 (CV6)	1492	-	-	-	-	+	-	-

Continúa...

HT 1343	1653	-	-	-	+	-	-	-
HT 1343	1655	-	+	-	+	+	-	-
HT 1343	1659	-	-	-	+	-	-	-
HT 1343	1660	-	-	-	-	-	-	-
H.832/1	417	+	+	+	+	+	+	+
H.832/1	426	-	+	-	+	+	+	+
H.832/1	416	-	-	-	-	-	-	-
H.832/1	1654	-	-	-	+	-	-	-
H.832/1	1656	-	-	-	+	-	-	-
H.832/1	1658	-	-	-	-	-	-	-
H.832/1	1661	-	+	-	+	+	+	-
H.832/2	1657	-	-	-	-	-	-	-
H.2252/2	332	-	-	-	-	-	-	-
H.2252/57	333	+	+	+	-	+	+	-

De manera similar, es notable el incremento de plantas susceptibles en materiales diferenciales del CIFC y en derivados del cruce entre el Híbrido de Timor y la variedad Caturra, en diversas localidades de Colombia durante el período de observación (Tablas 4 a la 7). Estos materiales corresponden a plantas de generación F3 (marcadas como DH) y generación F5 (marcadas como CU, BG, BH, BI y BK). En las Tablas 6 y 7 se detalla la evolución de la aparición de razas de roya en los genotipos estudiados en Chinchiná (Caldas) y Buenavista (Quindío); es evidente la mayor cantidad de genotipos atacados por roya en Chinchiná (97,9%) que en Buenavista (75,3%), lo cual podría indicar una mayor diversidad de razas en la primera localidad. Este resultado es de esperarse ya que en Chinchiná se encuentra la mayor diversidad de genotipos de café, representados en las colecciones ubicadas en La Granja de Cenicafé y en la Estación Central Naranjal. De igual forma la cantidad de genotipos que presentan un grado de roya mayor a cuatro es mayor en Chinchiná 75,8%, contra 65% de genotipos registrados en La Catalina (Pereira) y 52,6% en Paraguaicito (Buenavista).

Este incremento en el número de plantas que son atacadas por la enfermedad muestra la aparición de razas nuevas, que probablemente han evolucionado por mutaciones genéticas a partir de las razas presentes en el país. La combinación de genes de resistencia introducida en la variedad Colombia, impide la presencia de grandes cantidades de huéspedes genéticamente idénticos y geográficamente cercanos en el mismo lote, lo cual afecta la multiplicación indiscriminada de nuevas razas. Cabe resaltar que la presencia de lotes de variedad Caturra cercanos a lotes de variedad Colombia también puede diluir la presión de selección, al ser más difícil para las nuevas (y probablemente más complejas) razas, competir en este huésped con las razas ya establecidas.

En las diferentes localidades en Colombia, el único material de los diferenciales del CIFC que permanece libre de la enfermedad en todas las localidades es el 832/2 (Tabla 8). Sin embargo es de anotar que el diferencial 832/1 presenta roya en la Estación Central Naranjal, lo cual confirma la presencia de razas nuevas en Colombia no identificadas en el CIFC, dado que este material es resistente

Tabla 4. Evolución de la presencia de lesiones esporuladas de roya en materiales diferenciales y en derivados del cruce entre el Híbrido de Timor (HdT) y *C. arabica* var. Caturra, ubicados en la Subestación Experimental La Catalina (Pereira, Risaralda). **A.** Presencia de roya en los 80 materiales de café estudiados en esta Subestación. **B.** Frecuencia de genotipos en cada grado de la escala de Eskes (9).

	2004	2005	2006	2006 (Eskes)
A.				
Diferenciales CIFC				
H 419/20	+	+	+	4
H 420/1			+	3
HdT (1343/269)				0
H 420/2				0
H 832/2				0
Caturra x HdT				
S 5	+	+	+	5
CU 0622		+	+	4
CU 0638	+	+	+	4
DH 0664	+	+	+	5
CU 0200	+	+	+	5
BI 0111	+		+	3
BG 0502	+	+	+	5
CU 0101	+	+		0
BG 0366	+	+	+	2
BG 0238	+	+	+	6
BI 0244	+	+	+	3
BH 0993	+	+	+	6
BI 0243	+	+	+	4
CU 0844	+	+	+	3
BG 0012	+		+	3
BI 0492	+	+	+	4
CU 0741	+	+	+	4
BG 0499	+	+	+	5
BI 0327	+	+	+	5
CU 0811	+	+	+	3
DH 0632		+	+	4
CU 0442		+	+	6
CU 0294	+	+	+	5
BI 0715	+	+	+	5
CU 0607	+	+	+	4
CU 1381	+	+	+	3
CU 0797	+	+	+	5

Continúa...

...Continuación				
BG 0496	+	+	+	6
BK 0281	+	+	+	3
BI 0196	+	+	+	5
CU 0970	+	+	+	5
CU 0968	+	+	+	4
CU 0864	+	+	+	3
CU 0848	+	+	+	2
CU 0753	+	+	+	4
CU 0590	+	+	+	3
CU 0391	+	+	+	3
CU 0308	+	+	+	5
CU 0284	+	+	+	3
CU 0213	+	+	+	3
CU 0049	+	+	+	4
BH 1072	+	+	+	4
BI 0719	+	+	+	5
CU 0285	+	+	+	3
DH 0780	+	+	+	3
CU 0834	+	+	+	3
CU 0790	+	+	+	4
CU 0412	+	+	+	3
BI 0163	+	+	+	4
CU 0912	+	+	+	4
CU 1458	+	+	+	2
CU 1167	+	+	+	4
CU 0783	+	+	+	4
CU 1397	+	+	+	4
BI 0390	+	+	+	5
CU 0057	+	+	+	5
CU 1488	+	+	+	4
CU 0589	+	+	+	5
DH 0761	+	+	+	6
CU 0468	+	+	+	4
CU 1021	+	+	+	6
CU 0231	+	+	+	3
BI 0111	+	+	+	3
CU 0454	+	+	+	6
BH 0993	+	+	+	2

Continúa...

...Continuación

CU 0950	+	+	+	3
CU 1387	+	+	+	6
CU 0181	+	+	+	4
CU 1147	+	+	+	4
BH 1073	+	+	+	5
BK 0114	+	+	+	5
BG 0553	+	+	+	4
BH 1284	+	+	+	4
BG 0238	+	+	+	5
CU 0036	+	+	+	4

B.

Grado	Frecuencia (No. de genotipos)	%
0	4	5
1	0	0
2	4	5
3	20	25
4	25	31,25
5	19	23,75
6	8	10

a todos los aislamientos de roya que han ensayado en este centro.

La presencia de roya en los diferenciales H.420/10, H.420/2 y H.419/20 confirma la presencia de la raza XXIX en Colombia, dado que es la única raza capaz de atacar estos diferenciales en las pruebas realizadas en el CIFC (21). Esta raza solamente ha sido identificada en aislamientos de Timor, y no ha sido detectada en otros países productores de café, como Brasil o India (3, 21). La confirmación de la presencia de esta raza sería para nuestro conocimiento el primer reporte de la misma fuera de la isla de Timor. Hasta 1992, solamente se poseían en Cenicafé clones diferenciales que permitían la identificación de genes de

avirulencia que podían atacar los genes de resistencia SH1, SH2, SH3, SH4, SH5 y SH6, pero no los genes SH7, SH8 y SH9. Con la introducción al país en ese año de nuevas plantas diferenciales, ha sido posible identificar la presencia de nuevas razas que pueden atacar los genes SH7 a SH9 y también ha sido posible confirmar la presencia de razas con genotipos que han perdido algunos o muchos genes de avirulencia. Es importante anotar que se están desarrollando nuevas plantas diferenciales junto con investigadores del CIFC para la identificación de las razas presentes en Colombia.

Estudios moleculares. La secuencia completa de la región entera del ITS de *H. vastatrix*, que incluye la subunidad 5.8S y parte de la

Tabla 5. Evolución de las lesiones esporuladas de roya en materiales diferenciales y en derivados del cruce entre el Híbrido de Timor (HdT) y *C. arabica* var. Caturra ubicados en la Subestación Experimental El Rosario (Venecia, Antioquia).

Progenie	2002	2006	2006 (Eskes)
Diferenciales CIFIC			
H-420/2			0
HdT (1343/269)		+	7
H-420/1		+	4
H-832/1			0
Caturra x HdT			
BH-993			0
CU-975		+	5
CU-553		+	4
CU-57		+	4
CU-530		+	5
S-5		+	5
CU-622		+	6
BG-502		+	6
BH-993			0
BI-243		+	5
BH-0114		+	6
BI-492		+	5
CU-1485			0
BI-390		+	5
CU-101		+	3
BG-129		+	5
CU-864	+	+	4
CU-1021		+	3
CU-1147	+	+	5
CU-848		+	5
CU-590	+	+	5
CU-213	+	+	5
CU-454		+	5
CU-284		+	5
CU-753		+	1
BG-366		+	5

Tabla 6. Desarrollo de las lesiones de roya en materiales derivados del cruce entre el Híbrido de Timor (HdT) y *C. arabica* var. Caturra ubicados en La Granja (Chinchiná, Caldas). Se detalla el grado máximo de la enfermedad durante el año 2006, medido con la escala de Eskes. **A.** Presencia de roya en los 95 materiales de café estudiados. **B.** Frecuencia de genotipos en cada grado de la escala de Eskes.

A.			
Progenie	Roya (Eskes)	Progenie	Roya (Eskes)
CU. 0308	3	CU. 0753	4
CU. 0530	5	CU. 0454	6
BG. 0366	4	CU. 0213	4
CU. 0284	5	DH. 0903	3
BI. 0196	5	DH. 0780	6
CU. 0590	5	CU. 1488	4
BG. 0553	4	CU. 1485	4
BH. 0993	4	CU. 0776	1
CU. 0975	4	CU. 0036	5
BI. 0719	6	CU. 0049	5
CU. 0797	4	CU. 0748	5
CU. 0101	1	CU. 0790	5
CU. 0968	1	CU. 1458	2
CU. 1326	5	DH. 0632	4
CU. 1381	4	DH. 0761	5
BG. 0129	5	DH. 0908	1
CU. 0607	5	DH. 0912	0
CU. 0647	4	DH. 0752	4
CU. 0874	4	DH. 0645	4
CU. 0844	4	CU. 1429	4
CU. 0620	4	CU. 0834	3
CU. 0057	5	CU. 0571	5
BI. 0327	1	CU. 0200	4
CU. 0811	5	CU. 0204	5
BG. 0502	3	CU. 0294	4
CU. 0638	4	CU. 0950	3
CU. 0181	0	DH. 0648	4
CU. 0970	2	DH. 0672	4
CU. 0589	4	BG. 0237	5
BG. 0238	4	DH. 0667	3
BI. 0715	1	DH. 0664	5
CU. 0391	4	CU. 1397	4
BI. 0321	1	CU. 1149	5
BK. 0114	4	CU. 0285	4
CU. 0761	4	BH. 0963	4
BG. 0496	4	BI. 0055	5
BG. 0012	1	BI. 0492	5
BG. 0499	4	BI. 0596	5
CU. 1387	5	BI. 0244	6
BG. 0216	3	BI. 0111	3
CU. 0848	2	BH. 1366	6
BG. 0024	4	BH. 1073	5
BK. 0281	3	BH. 1284	4
CU. 0912	5	BH. 1361	6
CU. 1301	5	BI. 0163	4
CU. 0878	2	BI. 0243	4

Continúa...

...Continuación

B.

Grado	Frecuencia (No. de genotipos)	%
0	2	2,1
1	8	8,4
2	4	4,2
3	9	9,5
4	38	40,0
5	28	29,5
6	6	6,3

Tabla 7. Incidencia de la roya en materiales diferenciales y en derivados del cruce entre el Híbrido de Timor y *C. arabica* var. Caturra ubicados en la Subestación Experimental Paraguaicito (Buenavista, Quindío). Se detalla el grado máximo de la enfermedad durante el año 2006 medido con la escala de Eskes. **A.** Presencia de roya en los 97 materiales de café estudiados. **B.** Frecuencia de genotipos en cada grado de la escala de Eskes.

A.

Progenie	Incidencia	Progenie	Incidencia
Diferenciales CIFC		CU 0590	5
HdT (1343/269)	0	CU 0213	4
H419/2	0	CU 0970	5
H832/2	0	BG 0496	4
H420/1	3	CU 0049	2
H420/2	4	CU 0968	3
Caturra x HdT		CU 0864	4
S5	4	CU 0878	3
BI 0196	5	BI 0719	1
BG 0502	5	CU 0589	3
CU 0530	4	CU 0647	0
BG 0216	5	BG 0496	4
CU 1381	6	CU 0970	4
CU 0231	5	CU 0874	4
CU 0878	0	CU 0391	4
CU 0753	0	CU 1147	2
BI 0321	1	CU 0231	4
BI 0492	0	CU 0308	4
BI 0327	0	CU 0101	0
BI 0243	4	CU 0783	0
CU 0057	5	CU 0036	5
CU 0844	5	BI 0163	3
BI 0390	0	DH 0761	6
BG 0024	2	CU 0912	5
BG 0499	4	CU 0607	5

Continúa...

...Continuación

CU 0741	3	CU 0220	4
BG 0012	1	CU 0049	0
BH 0993	0	CU 0776	1
CU 0811	3	CU 1301	6
BK 0114	4	CU 1021	4
CU 0975	5	BG 0366	1
BH 0993	0	BK 0281	0
CU 0622	6	CU 1488	3
BG 0553	3	CU 1149	4
CU 0101	0	CU 0790	5
BG 0216	0	CU 0620	5
BG 0366	0	CU 0815	4
BK 0281	0	DH 0780	6
BG 0238	3	BH 1366	6
BI 0163	5	CU 0412	5
BI 0111	2	BG 0024	0
BG 0502	5	CU 0834	0
CU 0391	5	CU 1167	5
CU 0284	4	BI 0111	0
CU 0848	4	CU 0864	5
CU 0797	3	CU 0811	5
CU 0454	0	CU 0181	2
CU 0308	0	DH 0632	5
CU 1301	3	BI 0243	6

B.

Grado	Frecuencia (No. de genotipos)	%
0	24	24,7
1	5	5,2
2	5	5,2
3	12	12,4
4	22	22,7
5	22	22,7
6	7	7,2

Tabla 8. Presencia de roya en diferentes Subestaciones Experimentales de Cenicafé, en materiales diferenciales desarrollados por el CIFC, a partir del año 2000.

Selección de café	La Catalina	Naranjal	El Rosario	Paraguaicito
Caturra	+	+	+	+
HdT (1343/269)		+		
H.420/2				+
H.419/20	+			
H.420/10	+		+	+
HDT (832/1)		+		
HDT (832/2)				

subunidad 28S, amplificada por medio de PCR, tuvo una longitud entre 909-917 pares de bases (bp); las regiones estaban comprendidas entre los siguientes nucleótidos: ITS1 = 1-224; 5.8S = 225-377; ITS2 = 378-862; 28S = 863-917. Las secuencias completas se depositaron en el GenBank con los números de acceso EF394118– EF394132.

Para los análisis filogenéticos solo se tuvieron en cuenta los primeros 600-602 pares de bases que incluyen las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 completas, de la secuencia de *H. vastatrix* depositada en el Genbank (DQ022191, descrita en este estudio como HvSwiss) y se descartó para este análisis el resto de la secuencia de la región ITS2, que se obtuvo a partir de ADN de los aislamientos de roya colombianos y del CIFC (nucleótidos 601-862). Se identificó un total de 15 secuencias únicas dentro del grupo de 36 secuencias de ITSs de *H. vastatrix* analizadas. Ninguna secuencia analizada procedente de Colombia o del CIFC presentó identidad total con la secuencia HvSwiss depositada en el GenBank (Figura 1). La secuencia parcial de la región 28S (nucleótidos 863-917) es idéntica a la misma región ribosomal de *H. vastatrix* depositada en el GenBank (DQ354566). Aunque la región comprendida

entre los nucleótidos 601-862 no presenta homología con alguna secuencia depositada en las bases de datos públicas y no hace parte de la secuencia de *H. vastatrix* (HvSwiss) depositada en el GenBank, es factible que sea parte de la región ITS2 de *H. vastatrix* que sea inusualmente más larga que otras secuencias de esta región descritas en otros organismos. Las secuencias de las regiones ITS2 depositadas en las bases de datos de la gran mayoría de eucariontes no supera las 250bp (23) y el análisis de más de 20.000 secuencias de diversos organismos reveló que el promedio del tamaño para esta región fue de 208 pares de bases (28).

Las secuencias de las subunidades 5.8S y 28S tuvieron tres cambios con la secuencia HvSwiss y fueron idénticas entre todas las secuencias de aislamientos colombianos. En las región ITS1 se detectaron diez cambios en total, y en la región ITS2 se detectaron 11 cambios, cuando se alinearon todas las secuencias. La secuencia HvSwiss tuvo un total de ocho diferencias con respecto a todas las secuencias de Colombia; este resultado hace pensar que muy probablemente se trate de una raza que aún no se encuentra en el país; infortunadamente no se tiene registro del origen de este aislamiento¹(14).

¹ Grasso V., Syngenta, Schaffhauserstrasse, Suiza, comunicación personal. 2006.

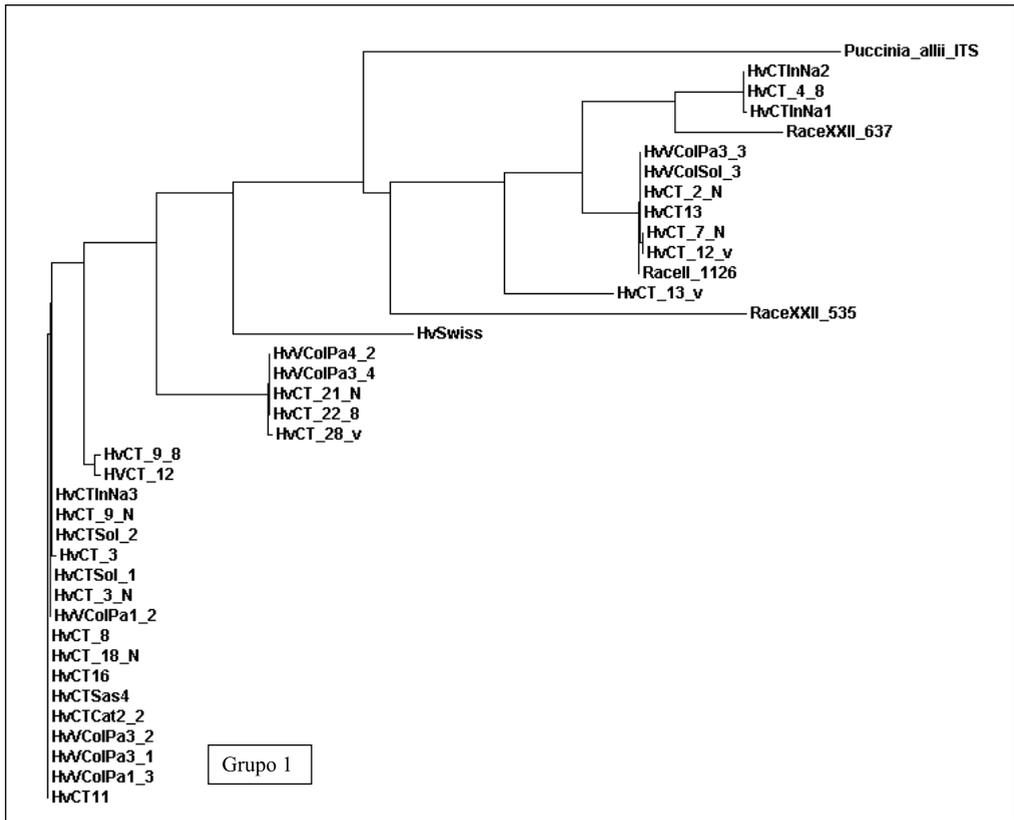


Figura 1. Dendrograma generado a partir de datos de secuencia de las regiones ITS1 e ITS 2 de los aislamientos de *H. vastatrix*.

Las dos secuencias de la raza XXII obtenidas del CIFIC variaron en un nucleotido en la región ITS1, aunque se detectaron otros dos cambios en la región comprendida entre el ITS2 y el gen 28S; estas diferencias explican la separación de las dos secuencias (Figura 1) y también puede estar indicando la presencia de subpoblaciones genéticamente diferentes dentro de una misma raza. Entre las secuencias de la raza II y las dos secuencias de la raza XXII se identificaron tres cambios en total, dos en la región ITS1 y un cambio en la región ITS2.

Las secuencias de los aislamientos de la variedad Colombia y Caturra no forman agrupamientos distintos en el dendrograma; es muy probable que todos los aislamientos que atacan la variedad Colombia sean capaces de atacar la variedad Caturra. La secuencia que se encuentra con mayor frecuencia en la población estudiada (Grupo 1, Figura 1) está distante de las secuencias de las razas II y XXII, por lo que se presume que el tiempo que han permanecido estas razas en el país ha permitido su diversidad en una raza que predomina en los materiales de café sembrados. Es probable también que

las razas de roya estén conformadas por subpoblaciones de una misma raza, distintas genéticamente.

Es improbable que se hayan introducido al país gran número de aislamientos de roya desde otros países, dados los controles para el ingreso de material vegetal por parte del servicio de cuarentena del ICA, por lo que podemos pensar que la alta variabilidad del patógeno se debe a una alta tasa de mutación a partir de una o pocas introducciones del microorganismo. No se han encontrado evidencias sólidas de la presencia de un estado sexual del patógeno por lo que se considera que mutaciones o recombinaciones asexuales están ocurriendo a una tasa muy elevada en *H. vastatrix*, lo cual ocasiona la alta variabilidad detectada (13). Sin embargo, la roya del café puede catalogarse como un patógeno con alto potencial evolutivo, de acuerdo a la clasificación de MacDonald y Linde (17), dado que tiene un alto potencial de flujo de genes, grandes tamaños efectivos poblacionales y aparentemente una alta tasa de mutación. Los patógenos que presentan estas características tienen además, mayor probabilidad de superar los genes de resistencia de sus hospederos.

Los resultados obtenidos indican que es necesario continuar con el seguimiento de la evolución de las razas de roya presentes en Colombia y desarrollar herramientas, en lo posible moleculares, que permitan la identificación de las razas presentes en Colombia. Esta identificación y el conocimiento del número y la composición genética de estas razas permitirá al programa de mejoramiento de Cenicafé, desarrollar variedades cuya composición de genes de resistencia podrá ser manipulada con genes de resistencia que prevengan ataques de las razas más prevalentes y virulentas en el país. En la actualidad, se desarrollan estudios con marcadores moleculares AFLP y SSR, los cuales se espera

que sirvan para el propósito de identificar razas específicas del patógeno.

Es importante anotar que se espera identificar en un futuro los genes de avirulencia que poseen cada una de las razas, y esto permitirá conocer los genes de avirulencia con mayor prevalencia en Colombia. Con este conocimiento será posible determinar los genes de resistencia más efectivos para ser incluidos en las variedades resistentes. También será importante estudiar los niveles de virulencia (agresividad) de cada una de las razas presentes en el país.

Es interesante notar que otras royas similares a *H. vastatrix* del género *Puccinia* muestran también cierto nivel de variación entre aislamientos, en otras regiones ribosomales no codificantes (15, 22). La evolución rápida de nuevas razas en pocos años, ha sido detectada en royas que atacan otros cultivos como el trigo (7). Se espera que en un patógeno especialista como *H. vastatrix* la resistencia de su hospedante tenga menor durabilidad. Este fenómeno parece darse ya que la pérdida de uno o varios genes de avirulencia en este tipo de microorganismos fitopatógenos tiene un efecto mínimo sobre la supervivencia del mismo (19).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los doctores Vitor Varzea y Ana Isabel Ribeiro del CIFC en Portugal, por el envío de tres muestras de ADN de roya utilizadas en este estudio. Al señor Carlos Arturo González por su colaboración en los experimentos de campo e invernadero, al doctor Álvaro Gaitán por la rigurosa revisión del manuscrito y sus oportunas sugerencias. A todo el personal de las Subestaciones Experimentales de Cenicafé que colaboraron en la toma de datos y mantenimiento de las plantas de café en el

campo, y al Ministerio de Agricultura por la financiación parcial de este estudio.

LITERATURA CITADA

1. ALVARADO A., G.; MORENO R., L.G. Cambio de la virulencia de *Hemileia vastatrix* en progenies de Caturra x Híbrido de Timor. *Cenicafé* 56(2):110-126. 2005.
2. ANIKSTER, Y.; SZABO, L.J.; EILAM, T.; MANISTERSKI, J.; KOIKE, S.T.; BUSHNELL, W.R. Morphology, life-cycle biology and DNA analysis of rust on garlic and chives from California. *Phytopathology* 94:569-577. 2004.
3. CARVALHO, A.; ESKES, A.B.; CASTILLO Z., J.; SREENIVASAN, M.; ECHEVERRI, J.; FERNÁNDEZ, C.; FAZUOLI, L. Breeding programs In: Kushalappa., A.C.; Eskes., A.B. (Eds.). *Coffee rust: Epidemiology, resistance, and Management*. Boca Raton, CRC Press, 1987. p. 293-336.
4. CASTILLO Z., J.; LEGUIZAMÓN C., J.E. Virulencia de *Hemileia vastatrix* determinada por medio de plantas diferenciales de café en Colombia. *Cenicafé* 43(4):114-124. 1992.
5. CASTILLO Z., J. Breeding for rust resistance in Colombia. In: Kushalappa., A.C.; Eskes., A.B. (Eds.). *Coffee rust: epidemiology, resistance and management*. Boca Raton, CRC Press, 1989. p. 307-316.
6. CHATASIRI, S.; KITADE, O.; ONO, Y. Phylogenetic relationships among *Puccinia hemerocallidis*, *P. funkiae*, and *P. patriniae* (Uredinales) inferred from ITS sequence data. *Mycoscience* 47:123-129. 2006.
7. DANIAL, D.L.; STUBBS, R. W.; PARLEVLIET, J.E. Evolution of virulence patterns in yellow rust races and its implications for breeding for resistance in wheat in Kenya. *Euphytica* 80:165-170. 1994.
8. ESKES, A.B.; TOMA B., M. Métodos de evaluación de la resistencia contra la roya del caféto (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.). *Boletín Fitosanitario FAO* 29:56-66. 1981.
9. ESKES, A. B. Qualitative and quantitative variation in pathogenicity of races of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) detected in the State of São Paulo, Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 89:31-45. 1983.
10. FELSENSTEIN, J. P. Phylogeny inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166. 1989.
11. GIL V., L.F.; OCAMPO M., J.D. Identificación de la raza XXII (V5-6) de *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. en Colombia. *Cenicafé* 49(4):340-344. 1998.
12. GOODWIN, D.C.; LEE, S.B. Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *BioTechniques* 15:438-444. 1993.
13. GOUVEIA, M. M.; RIBEIRO, A.; VÁRZEA, V.M.P.; RODRIGUES JR., C. J. Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. *Mycologia* 97: 396-404. 2005.
14. GRASSO, V.; SIEROTZKI, H.; GARIBALDI, A.; GISI, U. Relatedness among agronomically important rusts based on mitochondrial cytochrome b gene and ribosomal ITS sequences. *Journal of Phytopathology* 154: 110-118. 2006.
15. JENNINGS, J.M.; NEWTON, A.C.; BUCK, K.W. Detection of polymorphism in *Puccinia hordei* using RFLP and RAPD markers, differential cultivars, and analysis of the intergenic spacer region of rDNA. *Journal of Phytopathology* 145, 511-519. 1997.
16. LEGUIZAMÓN C., J.E.; BAEZA A., C.A.; FERNÁNDEZ B., O.; MORENO R., L.G.; CASTILLO Z., J.; OROZCO C., F.J. Identificación de la Raza II de *Hemileia vastatrix* Berk y Br. en Colombia. *Cenicafé* 35(1):26-28. 1984.
17. McDONALD, B.A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40:349-379. 2002.
18. MARÍN M., M.; CASTRO C., B.L.; GAITÁN B., A.L.; PREISIG, O.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Relationships of *Ceratocystis fimbriata* isolates from colombian coffee-growing regions based on molecular data and pathogenicity. *Journal of Phytopathology* 151: 395-405. 2003.
19. PARLEVLIET, J.E. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica* 124:147-156. 2002.
20. RIVILLAS O., C.A.; GIL V., L.F.; LEGUIZAMÓN C., J.E. Recomendaciones para el manejo de la roya del caféto en Colombia. *Boletín Técnico Cenicafé* 19:7-36. 1999.

21. RODRIGUES JR., C.J.; BETTENCOURT, A.J.; RIJOL. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. *Annual Review Phytopathology* 14: 49–70. 1975.
22. ROOSE–AMSALEG, C.; VALLAVIEILLE-POPE, C. DE; BRYGOO, Y.; LEVIS, C. Characterization of a length polymorphism in the two intergenic spacers of ribosomal RNA in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the causal agent of wheat yellow rust. *Mycological Research* 106: 918-924. 2002.
23. SCHULTZ, J.; MÜLLER, T.; ACHTZIGER, M.; SEIBEL, P.M.; DANDEKAR, T.; WOLF, M. The internal transcribed spacer 2 database—a web server for (not only) low level phylogenetic analyses. *Nucleic Acids Research* 34(Web Server issue): W704–W707. 2006.
24. SILVAA., R.; ZAMBOLIM, L.; PÉREZ, E. Identificación de razas fisiológicas de la roya del café en el estado Táchira, Venezuela. *BioAgro* 9:95-98. 1997.
25. THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-80. 1994.
26. WANYERA, R.; KINYUA, M.G.; JIN, Y.; SINGH, R.P. The spread of stem rust caused by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, with virulence on Sr31 in wheat in eastern Africa. *Plant Disease* 90:113. 2006.
27. WHITE, T. J. ; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. (Eds.). *PCR protocols: A guide to methods and applications*. San Diego, Academic Press, 1990. p. 315-322.
28. WOLF, M.; ACHTZIGER, M.; SCHULTZ, J.; DANDEKAR, T.; MÜLLER, T. Homology modeling revealed more than 20,000 rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) secondary structures. *RNA* 11: 1616–1623. 2005.
29. ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E.M; VÁRZEA, V.M.P. Durable resistance to coffee leaf rust. Vicoso, Universidade Federal de Viçosa, 2005. 450 p.