



ISSN 2215-2202

AGRONOMÍA COSTARRICENSE

REVISTA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

<https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost>



Nota técnica

Conservación de *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome con adición de dispersantes en condiciones de frío

Kevin Matamoros-Moya¹, Eduardo Granados-Brenes^{2/*}

*Autor para correspondencia. Correo electrónico: eduardo.granados@ucr.ac.cr

¹Universidad de Costa Rica, Sede del Atlántico, Laboratorio de Fitopatología, Turrialba, Costa Rica.



²Universidad de Costa Rica, Sede del Atlántico, Laboratorio de Fitopatología, Turrialba, Costa Rica.



DOI: <https://doi.org/10.15517/3g9m3m24>

Recibido el 24 de julio del 2024; Aceptado el 09 de junio del 2025

Resumen

Introducción. *Hemileia vastatrix*, agente causal de la roya del café, es un parásito obligado. La preservación en laboratorio bajo condiciones de frío (rangos de 2-8 °C) puede reducir la germinación y viabilidad de las uredosporas por tiempos prolongados. Esto es una limitante al momento de realizar investigaciones *in vitro*. **Objetivo.** Determinar el tiempo viable de conservación de uredosporas en frío, mediante la evaluación del porcentaje de germinación, utilizando dos dispersantes para la germinación de forma artificial en medio de cultivo. **Materiales y métodos.** Se evaluó cuatro períodos de 22 días de diferencia entre cada uno de los tratamientos, se preservó inóculo de roya a temperatura de 4 y -30 °C, por ser temperaturas utilizadas en el almacenaje de fitopatógenos en diferentes laboratorios. La dispersión de uredosporas se realizó de manera *in vitro* en placas Petri con medio de cultivo agar-agua, se utilizó agua desionizada y Tween[®] 20 como dispersante. Se incubaron las placas por 12 horas a 21 °C y se realizó el conteo de uredosporas viables. **Resultados.** Se obtuvo un porcentaje de germinación a los 0 días después de almacenamiento (DDA) de 58,0% con Tween[®] 20 y 36,2% con agua desionizada. Realizadas las cuatro evaluaciones, se determinó que la temperatura de almacenamiento a 4 °C mantiene constante la germinación hasta los 88 DDA, mientras que el inóculo preservado a -30 °C redujo significativamente la germinación de uredosporas a partir de los 44 DDA. El uso del dispersante Tween[®] 20 mantuvo un porcentaje de germinación superior en los períodos de 22, 44 y 88 DDA, al tratamiento de agua desionizada.

Conclusión. El Tween® 20 genera una mayor dispersión de la uredosporas, lo que inhibe la germinación. El choque térmico de los uredosporas, al pasar de temperaturas ambientales cálidas a preservación a -30 °C, disminuye la germinación *in vitro*.

Palabras clave: *Coffea arabica* L.; uredosporas; germinación; roya del café.

Technical note

Abstract

Conservation of *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome with the addition of dispersants under cold conditions

Introduction. *Hemileia vastatrix*, the causal agent of coffee rust, is an obligatory parasite. Preservation in the laboratory under cold conditions (ranges of 2-8 °C) can reduce the germination and viability of uredospores for extended periods, which is a limiting factor when conducting in vitro research. **Objective.** To determine the viable storage time of uredospores under cold conditions by evaluating the germination percentage, using two dispersants for artificial germination in a culture medium. **Materials and methods.** Four periods, 22 days apart, were evaluated for each treatment. Rust inoculum was preserved at temperatures of 4 °C and -30 °C, as these are commonly used temperatures for storing phytopathogens in different laboratories. Uredospores were dispersed in vitro on Petri dishes with agar-water culture medium, using deionized water and Tween 20 as dispersants. The plates were incubated for 12 hours at 21 °C, and the number of viable uredospores was counted. **Results.** A germination percentage of 58.0% with Tween 20 and 36.2% with deionized water was obtained on the 0 days after storage (DAS). After the four evaluations, it was determined that the storage temperature at 4 °C maintained constant germination up to 88 DAS, while the inoculum preserved at -30 °C significantly reduced uredospore germination from 44 DAS onward. The use of Tween 20 dispersant maintained a higher germination percentage at the 22, 44 and 88 DAS periods compared to the deionized water treatment. **Conclusion.** Tween 20 generates greater dispersion of the uredospores, which inhibits germination. The thermal shock to the uredospores when transitioning from warm ambient temperatures to preservation at -30 °C reduces in vitro germination.

Keywords: *Coffea arabica* L.; uredospores; germination; coffee rust.

Introducción

La roya del café, causada por el hongo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., afecta principalmente las hojas de las plantas de café (*Coffea* sp.). Este patógeno sobrevive durante períodos determinados, siempre y cuando las hojas permanezcan viables. La infección se manifiesta con la aparición de lesiones amarillas en el haz foliar, mientras que en el envés se forman pústulas anaranjadas, resultado de la acumulación de uredosporas. Estas uredosporas tienen una vida útil limitada. En condiciones de alta severidad (>40%), la roya provoca la defoliación de las ramas, lo que afecta significativamente la salud y productividad de la planta (Rojo Jiménez 2014).

Este fitopatógeno biotrófico requiere un hospedero vivo para su desarrollo, lo que dificulta la preservación y la viabilidad germinativa de sus uredosporas. La conservación artificial de estas puede realizarse solo por períodos relativamente cortos, generalmente entre 2 y 6 meses. En contraste, otros hongos fitopatógenos, como *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp. y *Sclerotinia* sp., entre otros, pueden conservarse viablemente durante varios años (Capucho *et al.* 2005).

Los principales factores que determinan la viabilidad germinativa de las uredosporas de *Hemileia vastatrix* son la humedad y la temperatura. Estudios han demostrado que, bajo condiciones de cámara fría en oscuridad a 5 °C y con una humedad relativa entre 50 y 80%, las uredosporas pueden mantenerse viables hasta por 100 días (Escobar Ochoa y Cristancho Ardila 2007).

Otro factor que influye en la germinación de las uredosporas es la presencia de componentes hidrofóbicos en su capa externa, los cuales facilitan la adhesión a las superficies foliares y previenen pérdidas por escorrentía al entrar en contacto con el agua (Zuluaga *et al.* 2009). En condiciones artificiales, la evaluación de la viabilidad germinativa se realiza en medios de cultivo, donde esta propiedad hidrofóbica representa un desafío para su manipulación. Para superar esta dificultad, se emplean dispersantes, el polisorbato (comercialmente conocido como Tween®) es uno de los más utilizados, ya que permite la formación de una emulsión homogénea entre las uredosporas y el medio de cultivo (Mamani Huayhua *et al.* 2021).

Determinar los tiempos y condiciones óptimas de almacenamiento de las uredosporas de *Hemileia vastatrix* es fundamental para facilitar investigaciones con cultivares de café prometedores que puedan presentar resistencia a este fitopatógeno. Al considerar las variaciones en temperatura, humedad y precipitación, resulta imprescindible desarrollar estrategias que permitan comprender la respuesta de las plantas frente a posibles cambios ambientales que puedan favorecer o inhibir la proliferación del patógeno.

Establecer las condiciones adecuadas de almacenamiento en frío para las uredosporas de *H. vastatrix* contribuirá significativamente a la toma de decisiones, lo que permitirá diseñar y aplicar estrategias de manejo de la enfermedad en laboratorio, que luego se podrán trasladar al campo, en beneficio de los caficultores que enfrentan esta problemática.

El objetivo de la investigación fue determinar el tiempo de viabilidad de las uredosporas de *H. vastatrix* Berk. & Br. almacenadas en frío, mediante la evaluación de dos temperaturas de conservación y el efecto de dos dispersantes sobre su germinación en medio de cultivo artificial.

Materiales y métodos

El ensayo fue realizado en el Laboratorio de Fitopatología, Sede del Atlántico, de la Universidad de Costa Rica (UCR), Turrialba, Cartago.

El inóculo utilizado se obtuvo de plantas de café (*Coffea arabica* cv. Catuai) ubicadas en la Finca Experimental Interdisciplinaria de Modelos Agroecológicos (FEIMA) de la Universidad de Costa Rica (UCR), que presentaban síntomas de la enfermedad. Para la recolección, se seleccionaron hojas enfermas, las cuales fueron almacenadas en bolsas plásticas y transportadas en hieleras al laboratorio, con un tiempo estimado de traslado de 30 minutos desde el sitio de recolección (**Figura 1A**).

Las uredosporas recolectadas de las pústulas presentaban una coloración naranja intensa y un tamaño homogéneo. Para evitar la disminución en la tasa de germinación debido a la recolección de uredosporas envejecidas producidas por el fitopatógeno en condiciones naturales, se excluyeron aquellas pústulas que mostraban parasitismo por agentes de control biológico natural.

Las uredosporas recolectadas fueron almacenadas en cápsulas de gelatina (**Figura 1 A y B**). La mitad de estas cápsulas se colocaron en un desecador con una solución de ácido sulfúrico al 40% y posteriormente se conservaron en una cámara fría a 4 °C. La otra mitad del inóculo, almacenada en cápsulas similares, fue transferida a tubos de microcentrífuga y preservada en una cámara de conservación a -30 °C.



Figura 1. Recolección de hojas con roya en campo (A), raspado del inóculo (B) y almacenaje en cápsulas en laboratorio (C).

Figure 1. Collection of coffee leaves with rust in the field (A), scraping of inoculum (B), and storage in capsules in the laboratory (C).

Se evaluaron dos temperaturas de almacenamiento (4 °C y -30 °C) y dos dispersantes utilizados durante la inoculación: Tween® 20 y agua desionizada. Esto generó cuatro tratamientos, cada uno con tres repeticiones, consistentes en placas Petri con agar-agua (AA) como medio de cultivo sólido. Para cada placa, se contabilizaron 100 uredosporas por campo de visión al microscopio óptico de luz, examinando un total de cinco campos por placa. Las muestras fueron incubadas durante 24 horas en una cámara de crecimiento a 21 °C, temperatura recomendada para la germinación de las uredosporas. Las pruebas de germinación de uredosporas se realizaron mediante la metodología descrita por Zambolim y Chaves (1974). Para evaluar la viabilidad germinativa inicial, se llevó a cabo una prueba sin someter previamente las uredosporas a almacenamiento en frío. El inóculo proveniente de cápsulas almacenadas a distintas temperaturas fue colocado sobre placas Petri con agar-agua (AA) como medio de cultivo.

Las uredosporas almacenadas a -30 °C fueron sometidas a un tratamiento de calentamiento a 35 °C durante 3 minutos para romper la dormancia. Posteriormente, las uredosporas se dispersaron sobre las placas con AA; se utilizó agua destilada y Tween 20 como dispersantes.

Después de 24 horas de incubación, se procedió al conteo de uredosporas germinadas mediante el uso de un microscopio de luz con un aumento de 10X (Capucho *et al.* 2005). Para calcular el porcentaje de germinación se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de germinación} = \frac{\text{uredosporas germinadas}}{\text{uredosporas totales}} * 100$$

Se consideraron como uredosporas germinadas aquellas que su tubo germinativo poseía el doble de longitud del tamaño de la uredosporas.

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2015), mediante un análisis de varianza (ANOVA) factorial. Se evaluaron de forma independiente los efectos de cada variable (temperatura y dispersante), así como su posible interacción. Para identificar diferencias significativas entre las medias, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher (p -valor $< 0,05$).

Resultados y discusión

Porcentaje de germinación

La prueba de germinación realizada a temperatura de 21 °C y a 0 días de almacenamiento (DDA), sin aplicación de tratamientos térmicos, mostró un porcentaje de germinación del 58,0% para el tratamiento con el dispersante Tween 20, y del 36,2% para el tratamiento con agua desionizada (Figura 2).

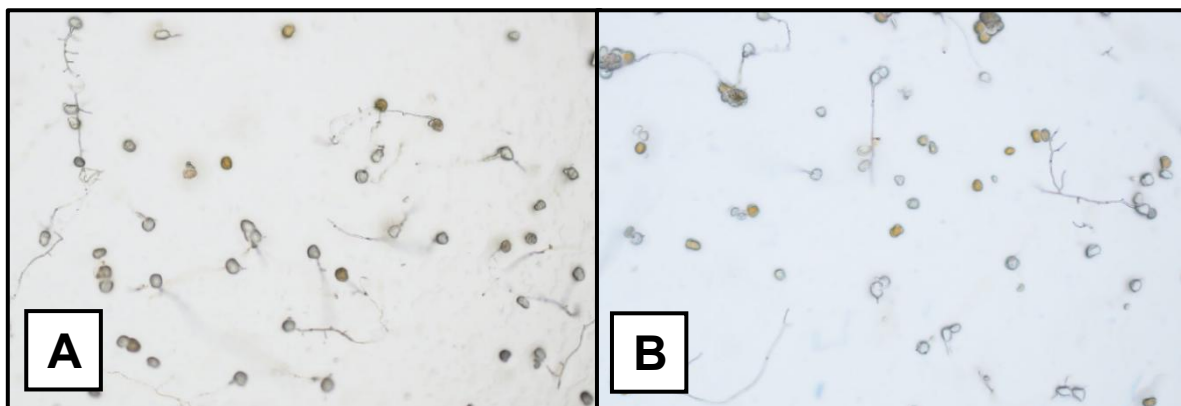


Figura 2. Germinación inicial de uredosporas de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. a temperatura ambiente (0 DDA).

Figure 2. Initial Germination of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. uredospores at ambient temperature (0 DAA).

Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Deepak *et al.* (2012), quienes observaron una germinación del 30% en uredosporas sin preservar, mediante el uso de agar-agua (AA) como medio de cultivo artificial y manteniéndolas en cámara de crecimiento durante 16 horas a 23 °C. El porcentaje de germinación varía según las condiciones de incubación. Por ejemplo, Morales Antonio *et al.* (2021) reportaron una germinación que osciló entre 41,70% y 44,95% en uredosporas almacenadas por 24 horas en medio PDA, bajo condiciones de oscuridad, pH 5,7 y temperaturas entre 18 y 24 °C.

Los tratamientos almacenados a 4 °C mantuvieron un porcentaje de germinación constante (**Figura 3**), sin mostrar diferencias significativas entre el uso o no de dispersante. En contraste, para los tratamientos a -30 °C, la germinación comenzó a disminuir a partir de los 44 días de almacenamiento (DDA) (**Figura 3**). Aunque no se observaron diferencias estadísticas significativas entre los dispersantes en esta temperatura, el uso de Tween® parece favorecer la germinación cuando las uredosporas se conservan a -30 °C.

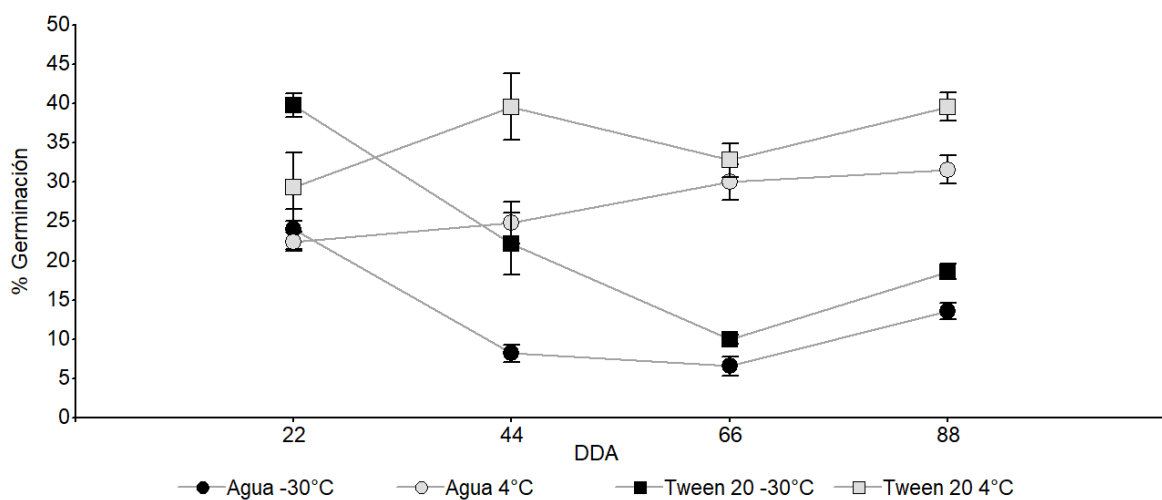


Figura 3. Efecto del almacenamiento prolongado en la germinación de *Hemileia vastatrix*: evaluación a los 22, 44, 66 y 88 días. DDA: días después de almacenamiento.

Figure 3. Impact of long-term storage on the germination of *Hemileia vastatrix*: assessment at 22, 44, 66 and 88 days. DDA: days after storage.

Efecto de la temperatura

Se evaluó la relación entre la temperatura de conservación del inóculo y el porcentaje de germinación de *Hemileia vastatrix*, observándose diferencias significativas entre los tratamientos sometidos a dos temperaturas de almacenamiento (4 °C y -30 °C). A los 22 días de almacenamiento (DDA). La germinación a -30 °C fue estadísticamente inferior en comparación con el tratamiento a 4 °C, donde se registró un mayor porcentaje de germinación (**Figura 4**).

Además, se observó un aumento en el porcentaje de germinación para las uredosporas almacenadas a 4 °C, mientras que en las almacenadas a -30 °C el porcentaje disminuyó notablemente a los 66 DDA (**Figura 4**). En el tratamiento a 4 °C, la germinación incrementó a los 44 DDA y se mantuvo estable en las evaluaciones posteriores (**Figura 4**).

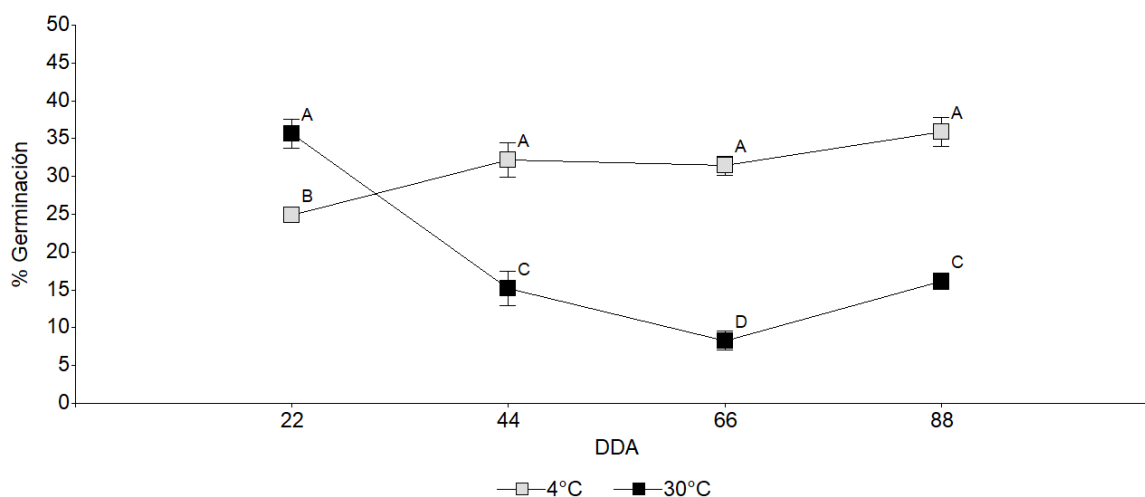


Figura 4. Evaluación del efecto de tratamientos térmicos sobre la germinación de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. en distintos períodos de almacenamiento. DDA: días después de almacenamiento

Figure 4. Evaluation of the effect of thermal treatments on the germination of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. at different storage periods. DDA: days after storage.

En cuanto al efecto de la temperatura sobre el porcentaje de germinación de uredosporas, el almacenamiento a 4 °C no mostró cambios significativos, manteniéndose la germinación constante durante el período evaluado. Estos resultados contrastan con los reportados por Capucho *et al.* (2005) y Escobar Ochoa y Cristancho Ardila (2007), quienes observaron una reducción acelerada en el porcentaje de germinación a partir de los 30 días de almacenamiento a 4 °C.

Se observaron diferencias significativas a -30 °C, donde el porcentaje de germinación disminuyó en la segunda evaluación, a los 44 días de almacenamiento (DDA). Resultados similares fueron reportados por Capucho *et al.* (2005) y Deepak *et al.* (2012), quienes observaron reducciones en la germinación a partir de los 60 días de conservación a -20 °C. Estos hallazgos sugieren que la degradación del núcleo de las uredosporas limita su capacidad para llevar a cabo procesos biológicos esenciales, como la germinación.

Efecto del dispersante

Se estimaron las relaciones entre los porcentajes de germinación para cada tratamiento por separado (**Figura 5**). Para el dispersante Tween® 20, se observó un porcentaje significativamente mayor en las evaluaciones a los 22, 44 y 88 días de almacenamiento (DDA). En cambio, a los 66 DDA, el porcentaje fue similar al registrado a los 22 y 88 DDA para el tratamiento con agua desionizada.

En ambos tratamientos (**Figura 5**) se identificó una disminución inicial en el porcentaje de germinación, seguida de un aumento, donde este último fue a los 66 DDA para Tween 20 y a los 44 DDA para agua desionizada.

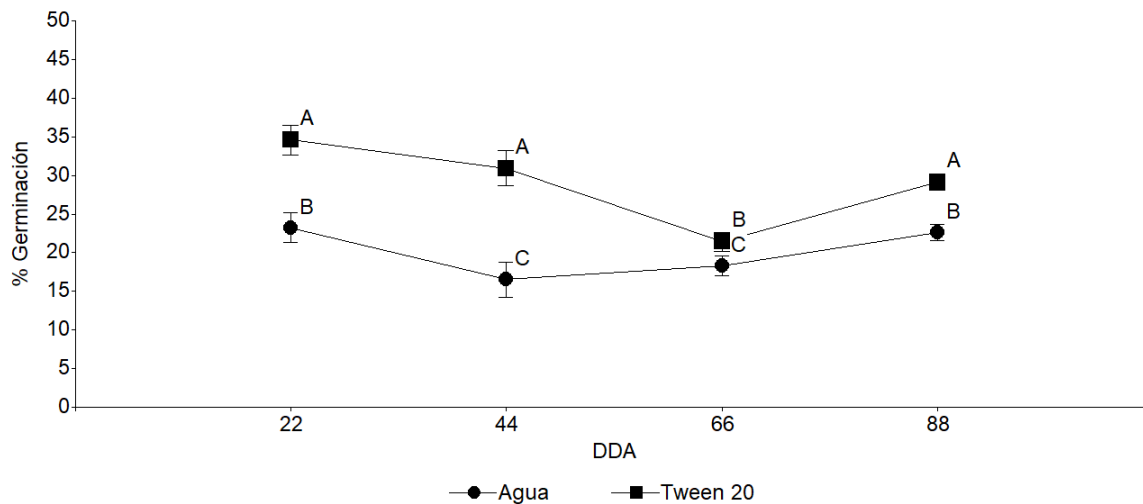


Figura 5. Efecto de dispersantes en la germinación de *Hemileia vastatrix* durante distintos períodos de almacenamiento. DDA: días después de almacenamiento.

Figure 5. Influence of dispersants on the germination of *Hemileia vastatrix* across various storage durations. DDA: days after storage.

El efecto del Tween[®] 20 sobre el inóculo se atribuye, principalmente, a su función como emulsionante, lo que reduce la tensión superficial de las esporas de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., y permite una mejor dispersión sobre la placa de agar-agua (AA). Esto ocurre a pesar de que el polisorbato puede presentar un efecto fungistático (Mwamburi *et al.* 2015).

La adecuada dispersión del inóculo en la placa evita la acumulación de esporas, lo cual previene la producción de sustancias inhibitorias, como ácidos orgánicos, secretados por las uredosporas para impedir la germinación prematura y facilitar una dispersión óptima sobre el cultivo de café (Chitarra 2003).

Los hallazgos obtenidos sugieren que las uredosporas, estructuras asexuales del patógeno biotrófico causante de la roya del café, pueden almacenarse durante distintos períodos manteniendo su viabilidad germinativa. Esto facilita realizar experimentos a lo largo del tiempo y garantiza la disponibilidad de inóculo con porcentajes de germinación superiores al 30% (Granados *et al.* 2025).

La preservación a 4 °C por períodos superiores a tres meses resulta especialmente relevante, dado que la mayoría de los laboratorios cuentan con equipos de refrigeración que mantienen esta temperatura, lo que favorece la conservación práctica y accesible del material biológico.

Con los resultados obtenidos sobre la preservación y el uso de agentes que aseguran una germinación viable superior al 30%, será posible realizar estudios clave, como la evaluación de la variabilidad del patógeno y la posible pérdida de patogenicidad del inóculo almacenado (Granados *et al.* 2025, Ramírez *et al.* 2024a, Ramírez *et al.* 2024b). Dado que *Hemileia vastatrix* es un parásito obligado que requiere de un hospedero vivo (hojas de café), contar con métodos eficaces de almacenamiento que mantengan sus características biológicas es fundamental para los investigadores. Esto facilita la realización de pruebas en materiales genéticamente promisorios que puedan presentar resistencia o tolerancia al patógeno, tal como lo han demostrado Granados *et al.* (2025).

Conclusiones

El choque térmico generado al almacenar el inóculo a -30 °C, especialmente cuando proviene de condiciones ambientales cálidas con temperaturas promedio de 26 °C, puede provocar una disminución significativa en el porcentaje de germinación de las uredosporas. Es importante evitar dicho choque térmico al pasar de condiciones ambientales cálidas a temperaturas extremadamente bajas (-30 °C), ya que esto afecta negativamente la germinación de las uredosporas.

El almacenamiento prolongado a -30°C induce una reducción paulatina en la viabilidad germinativa de las uredosporas de *Hemileia vastatrix*.

El uso del dispersante Tween 20 reduce la acumulación de inóculo sobre la superficie de agar-agua (AA), lo que disminuye la producción de ácidos orgánicos por parte de las uredosporas, favoreciendo así un mayor porcentaje de germinación.

El almacenamiento a 4 °C demuestra ser una estrategia más efectiva para conservar la viabilidad del inóculo, ya que mantiene porcentajes más elevados de germinación en comparación con temperaturas más bajas. Se recomienda priorizar el almacenamiento del inóculo de *Hemileia vastatrix* a 4 °C para maximizar la viabilidad y facilitar estudios posteriores relacionados con la patogenicidad y resistencia del patógeno.

Literatura citada

Capucho, A; Souza, A; Zambolim, E; Caixeta, E; Rufino, R; Barbosa, J; Alvarenga, S; Zambolim, L. 2005. Viabilidade de uredosporos da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.) sob diferentes métodos de preservação in vitro. Brasil, Embrapa. s. p.

Chitarra, G. 2003. Germination inhibitors of fungal spores: identification and mode of action. Tesis Ph.D. Wageningen, Países Bajos, Wageningen University. 110 p.

Deepak, K; Hanumantha, B; Sreenath, H. 2012. Viability of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) Urediniospores stored at different temperatures. Journal of Biotechnology & Biomaterials 02:143.

Di Rienzo, JA; Casanoves, F; Balzarini, MG; Gonzalez, L; Tablada, M; Robledo, CW. 2015. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>

Escobar Ochoa, C; Cristancho Ardila, MA. 2007. Estudio de metodologías para la conservación de urediniosporas de la roya del cafeto. Cenicafé 58(4):324-332.

Granados, E; Zambolim, L; Almeida, D; Ribeiro, P; Mariz, B; Teixeira, E. 2025. Assisted Stacking of fungal disease resistance genes in Central American coffee cultivars. Agronomy 15:230.

Mamani Huayhua, G; Leon Ttacca, B; Palao Iturregui, L; Borja Loza, Y. 2021. Biocontrol de la roya amarilla del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) con cepas de *Trichoderma* sp. endófito. Cultivos Tropicales 42:4.

Morales Antonio, M; Santiago Martínez, G; Vásquez López, A; Rodríguez Ortiz, G; Soto Castro, D; Soto Castro, D; Lozano Trejo, S; Castañeda Hidalgo, E. 2021. Uredospore germination of *Hemileia vastatrix* and its inhibition by the effect of plant extracts *in vitro*. International Journal of Agriculture and Natural Resources 48(2):108-117.

Mwamburi, LA; Laing, MD; Miller, RM. 2015. Effect of surfactants and temperature on germination and vegetative growth of *Beauveria bassiana*. Brazilian Journal of Microbiology 46(1):67-74.

Ramírez, E; Rodríguez, D; Hernández, A. 2024 (a). Reaction of coffee cultivars to *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome strains in Venezuela, under controlled conditions. Revista Facultad de Agronomía Universidad de Zulia 42(1):e254210.

Ramírez, E; Rodríguez, D; Zambolim, L; Granados, E. 2024 (b). Identificación de cepas fisiológicas de *Hemileia vastatrix* en el estado Táchira, Venezuela. Biagro 36(3):277-286.

Rojo Jiménez, E. 2014. Café I (G. *Coffea*). Reduca (Biología). Serie Botánica 7(2):113-132.

Zambolim, L; Chaves, M. 1974. Efeito de baixas temperaturas e do binomio temperatura-umidade relativa sobre a viabilidade dos uredosporos de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. e *Uromyces phaseoli* typica arth. Experientiae 17(7):151-184.

Zuluaga, CM; Buriticá Céspedes, P; Marín Montoya, M; Marín Montoya, M. 2009. Generalidades de los uredinales (Fungi: Basidiomycota) y de sus relaciones filogenéticas. Acta Biológica Colombiana 14(1):41-56.



Agronomía Costarricense, Universidad de Costa Rica.

Se encuentra licenciada con [Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr